

УДК 577.214

## ПРОКАРИОТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ-АРГОНАВТЫ КАК ИНСТРУМЕНТ БИОТЕХНОЛОГИИ

© 2022 г. Е. В. Кропачева<sup>а, #</sup>, Л. А. Лисицкая<sup>а, #</sup>, А. А. Агапов<sup>а, #</sup>, А. А. Мусабилов<sup>а</sup>,  
А. В. Кульбачинский<sup>а</sup>, Д. М. Есюнина<sup>а, #, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”,  
Москва, 123182 Россия

\*e-mail: es\_dar@inbox.ru

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 20.04.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

Программируемые нуклеазы — важнейший инструмент для манипуляций с генами и геномами прокариот и эукариот. С конца XX века ведется разработка подходов к направленному изменению конкретных участков генома без модификации остальной ДНК. В обзоре кратко рассмотрены достоинства и недостатки основных известных на сегодня генетических редакторов. Основное внимание уделено программируемым нуклеазам из семейства прокариотических белков-Аргонавтов. Эти белки узнают и расщепляют определенные последовательности ДНК с использованием коротких комплементарных молекул-гидов и играют важную роль в защите клеток прокариот от чужеродной ДНК. Белки-Аргонавты уже нашли применение в биотехнологии для направленного расщепления и детекции нуклеиновых кислот и потенциально могут быть использованы для редактирования геномов.

**Ключевые слова:** программируемые нуклеазы, белки-Аргонавты, направляющая ДНК, биосенсоры, редактирование генома

DOI: 10.31857/S0026898422060131

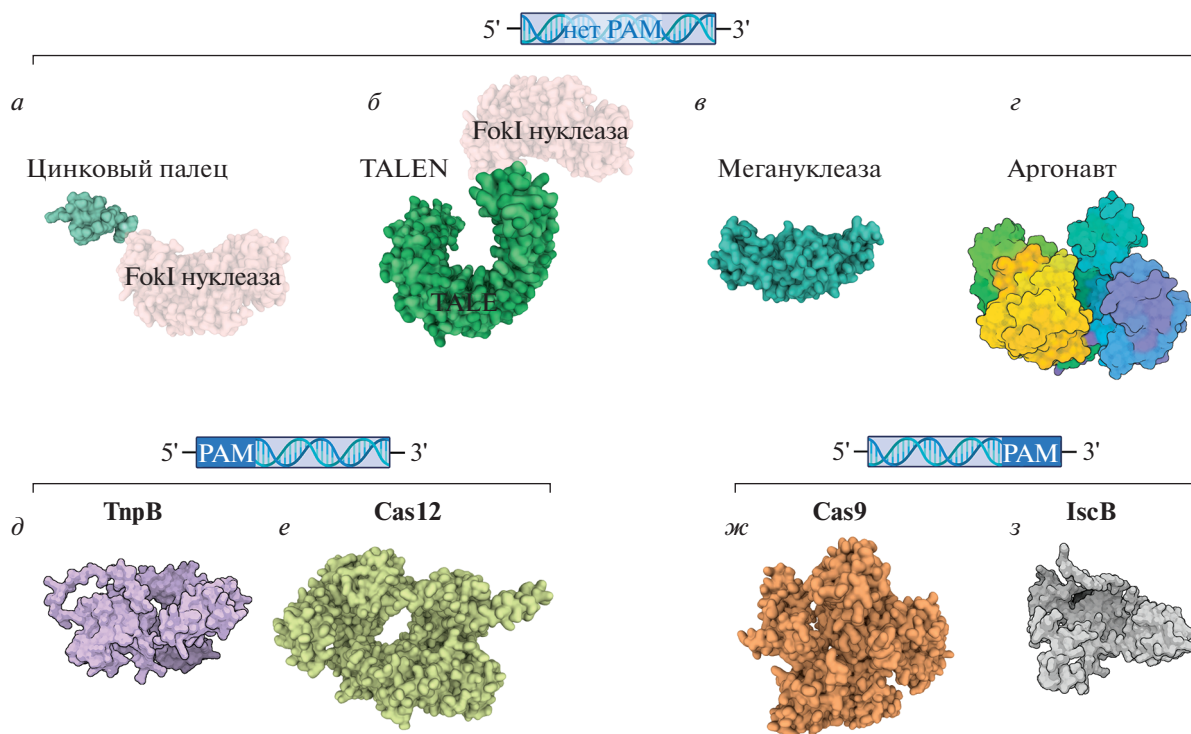
### ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ПРОГРАММИРУЕМЫХ НУКЛЕАЗ

Направленные изменения последовательности ДНК на уровне конкретных генов и регуляторных участков генома имеют ключевое значение как для фундаментальных исследований механизмов работы генома и изучения функций определенных белков, так и для решения прикладных задач — от создания штаммов-продуцентов до лечения генетических заболеваний. Важнейшим инструментом в этих исследованиях служат программируемые нуклеазы — ферменты, которые могут быть направлены в определенное место генома для внесения изменений в последовательность ДНК. Каталитически неактивные варианты программируемых нуклеаз могут использоваться для редактирования эпигенетических меток и регуляции экспрессии генов за счет привлечения в определенные участки генома различных функциональных доменов и для визуализации целевых участков генома в клетках. Программируемые нуклеазы также применяют для идентификации целевых последовательностей в

биологических образцах и для расщепления нуклеиновых кислот *in vitro*.

К настоящему времени известно несколько групп программируемых нуклеаз природного и синтетического происхождения, различающихся по механизму распознавания и разрезания ДНК и потенциалу практического применения. Во всех случаях внесение разрывов в целевой участок ДНК может затем приводить к потере функциональности данного гена либо к требуемому изменению его последовательности в ходе репарации. Можно выделить две большие группы таких ферментов: нуклеазы, узнающие сайт расщепления с помощью ДНК-белковых взаимодействий, и нуклеазы, узнающие ДНК посредством связанной короткой комплементарной РНК или ДНК. Хотя исторически ферменты первой группы были найдены и использованы раньше, ферменты второй группы обладают гораздо большей гибкостью в узнавании целевых участков ДНК и именно их используют в качестве основных инструментов редактирования генома в последние годы. Сравнение разных классов программируемых нуклеаз приведено на рис. 1.

<sup>#</sup> Эти авторы внесли равный вклад.



**Рис. 1.** Разнообразие программируемых нуклеаз. (а–г) – Эндонуклеазы, не требующие для каталитической активности наличия последовательности PAM (protospacer adjacent motif) в мишени; д, е – эндонуклеазы, требующие наличия PAM в 5'-области от сайта узнавания; ж, з – эндонуклеазы, требующие наличия PAM в 3'-области от сайта узнавания. а – химерная эндонуклеаза на основе ДНК-связывающего домена цинкового пальца (PDB ID: 7ZNF) и FokI (PDB ID: 2FOK) (структуры белков объединены для иллюстрации); б – химерная эндонуклеаза на основе ДНК-связывающего домена TALE (PDB ID: 4HPZ) и FokI (PDB ID: 2FOK) (структуры белков объединены для иллюстрации); в – мегануклеаза I-AabMI (PDB ID: 4YIT); г – белок-Аргонавт, может быть РНК- или ДНК-зависимой эндонуклеазой и проявлять каталитическую активность в отношении РНК или ДНК (TtAgo, PDB ID: 4NCB); д – РНК-зависимая ДНК-эндонуклеаза TnpB (структура TnpB ISDra2 предсказана с использованием алгоритма AlphaFold2 [1]); е – РНК-зависимая ДНК-эндонуклеаза Cas12 (PDB ID: 7EU9) [2]; ж – РНК-зависимая ДНК-эндонуклеаза Cas9 (PDB ID: 6M0X) [3]; з – РНК-зависимая ДНК-эндонуклеаза IscB (структура предсказана с использованием алгоритма AlphaFold2 [1]).

### Мегануклеазы

Мегануклеазы распознают длинные (от 12 до 44 п.н.) участки ДНК [4, 5]. Встречающиеся в природе мегануклеазы относятся к группе хоуминг-эндонуклеаз (homing endonucleases), обеспечивающих перенос мобильных элементов. Мегануклеазы расщепляют цепи ДНК в области четырех центральных нуклеотидов в сайте узнавания с образованием двухцепочечного разрыва с 3'-концевыми 4-нуклеотидными выступающими концами [6, 7]. Небольшой размер этих белков с длинным ДНК-узнающим сайтом привлекает к ним внимание как к инструментам для манипуляций с геномом. Ограничение заключается в том, что сайт узнавания должен быть искусственно внесен в геном. К началу 2000-х было открыто и описано несколько сотен эндонуклеаз с различными сайтами узнавания [5], а также созданы ферменты с измененной специфичностью [8–10].

### Химерные нуклеазы

Идея создания химерных нуклеаз путем соединения в одной белковой молекуле нуклеазного домена одного белка и ДНК-распознающего домена другого белка была высказана в 1994 году Kim & Chandrasegaran [11]. Исследователи объединили нуклеазный домен эндонуклеазы рестрикции *Flavobacterium okeanoikoites* FokI, не обладающий специфичностью к определенной последовательности ДНК, и гомеодомен регуляторного белка Ultrathioгах дрозофилы, распознающий последовательность длиной 9 нуклеотидов. Авторы также предложили варианты ДНК-распознающих доменов из других белков, которые позже, действительно, были использованы для создания новых химерных нуклеаз.

### SGN

SGN (structure-guided endonuclease) – это специфичная к структурам эндонуклеаза. Нуклеазы

могут быть направлены к определенному месту в геноме с помощью распознавания определенных структур в ДНК. Примером может быть нуклеаза, состоящая из flap-эндонуклеазы (flap endonuclease-1) FEN1 археи *Archaeoglobus fulgidus* и нуклеазного домена FokI [12, 13]. Для внесения разрыва в нужное место в ДНК используют ДНК-гиды, комплементарные необходимому участку за исключением одного 3'-концевого нуклеотида. Этот нуклеотид распознается FEN1 в составе SGN, далее FokI вносит разрыв в ДНК на расстоянии 9–10 нуклеотидов от 3'-конца гида. Однако SGN может узнавать и 3'-выступающие односторонние фрагменты, возникающие при репарации и репликации. Это приводит к значительным нецелевым перестройкам генома [12, 13]. Наряду с невысокой эффективностью это стало весомым ограничением развития технологии SGN.

### Цинковые пальцы

Впервые домен типа “цинковый палец” (ZF, zinc finger) был описан J. Miller и соавт. в 1985 году [14] при изучении транскрипционного фактора TFIIIA из ооцитов лягушки. TFIIIA представляет собой 9 повторяющихся мотивов длиной 30 аминокислотных остатков (а.о.), содержащих два консервативных гистидина и два цистеина, на вершине каждого “пальца” сконцентрированы полярные и основные аминокислоты, которые отвечают за взаимодействие с нуклеиновыми кислотами [14, 15]. Один цинковый палец отвечает за узнавание 3-нуклеотидной последовательности [16, 17]. Первая сайт-специфическая нуклеаза, содержащая цинковые пальцы в качестве ДНК-распознающего домена и нуклеазный домен FokI (ZFN, zinc finger nuclease), получена и описана Y. Kim и соавт. в 1996 году [18]. Распознавание отдельных нуклеотидов с помощью отдельных аминокислот внутри цинкового пальца и способность последних работать как независимые модули при узнавании протяженных последовательностей ДНК позволяют использовать эти домены для программирования искусственных белковых инструментов, предназначенных для работы с нуклеиновыми кислотами. В ходе исследований химерных молекул ZFN в клетках дрозофилы и млекопитающих выявлена их высокая цитотоксичность, обусловленная неспецифическим распознаванием и разрезанием ДНК (off-target effect) [16]. Очевидный способ повысить специфичность узнавания мишени с помощью ZFN – увеличить число цинковых пальцев. Однако Y. Shimizu и др. [19], обнаружили, что активность нуклеаз с пятью или шестью цинковыми пальцами гораздо ниже в сравнении с белками с одним таким доменом. Таким образом, создание функциональных нуклеаз с несколькими

цинковыми пальцами представляет собой сложную задачу.

### TALEN

TALEN (transcription activator-like effectors nuclease) – это эффекторная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции. TALE – большое семейство транскрипционных активаторов, которые относятся к факторам вирулентности фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas*. Еще в 1989 году U. Bonas и др. [20] показали, что они содержат повторяющиеся элементы. Повторы имеют одинаковую последовательность, за исключением аминокислот в позициях 12 и 13 (repeat variable di-residues, RVDs). Именно эта пара аминокислот отвечает за специфическое распознавание единичного нуклеотида в ДНК [21–23]. Модульное строение и специфичность к отдельным нуклеотидам ДНК-распознающих доменов TALE открывает возможность их применения в качестве компонента химерных нуклеаз. Первые химерные нуклеазы на основе TALE (TALEN – TALE nuclease) были сконструированы на основе фрагмента TALE-белка, содержащего повторы, и нуклеазного домена FokI [24].

### Cas-нуклеазы

В последние годы наиболее широко в геномном редактировании используют Cas-нуклеазы, которые являются частью CRISPR-Cas-систем адаптивного иммунитета прокариот (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами). Системы CRISPR-Cas имеют модульную организацию. Два основных компонента – модуль, ответственный за адаптацию (вставку в CRISPR-кассету новых спейсеров), и эффекторный модуль, ответственный за интерференцию. Модули представлены комплексами белков Cas, гены которых находятся в одном опероне. На основе строения эффекторного модуля выделяют два класса CRISPR-Cas систем. В системах Класса 1 эффекторный модуль представлен многосубъединичным комплексом, в который входит несколько Cas-белков. В системах Класса 2 его функцию выполняет один крупный белок, включающий большое число доменов. Класс 1 включает CRISPR-Cas системы I, III, IV типов, Класс 2 – II, V и VI [25]. Наибольший интерес для практического применения представляют эффекторные модули Класса 2, так как они представлены единой белковой молекулой с нуклеазной активностью.

Наиболее полно изучена нуклеаза Cas9 бактерии *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), представитель II типа CRISPR-Cas систем. Для работы Cas9 необходимы две РНК: crРНК (CRISPR RNA),

содержащая последовательность спейсера, и *tracr*РНК (*trans-activating crRNA*). Cas9, загруженная *cr*РНК-*tracr*РНК, вносит двунитевой разрыв в последовательность, соответствующую спейсеру, в ДНК-мишени. Для удобства практического применения Cas9 в качестве сайт-специфической программируемой нуклеазы *cr*РНК и *tracr*РНК объединяют в одну молекулу РНК – *single guide RNA* (*sg*РНК). Cas9 – крупная ДНК-эндонуклеаза (*SpCas9* состоит из 1368 а.о.), вносящая двухцепочечный разрыв с образованием тупого конца внутри участка, узнаваемого *sg*РНК, на расстоянии 3 нуклеотидов от его правого конца. Расщепление ДНК осуществляется двумя нуклеазными доменами. HNH-подобный домен разрезает нить ДНК, комплементарную РНК-гиду (целевая нить). RuvC-подобный домен имеет укладку, подобную РНКазе H, и разрезает противоположную нить (нецелевая цепь) [26]. В начале 2013 года было опубликовано три исследования, в которых показана возможность применения Cas9 в качестве программируемой ДНКазы для внесения изменений в геном в культурах клеток человека [27–29]. Это положило начало использованию нуклеазы Cas9 в науке и биотехнологии.

*sg*РНК позволяет направлять Cas9 к любой последовательности ДНК, но при условии наличия в ней мотива PAM (*protospacer adjacent motif*, прилегающий к протоспейсеру мотив) справа от узнаваемой последовательности. PAM, распознаваемый *SpCas9*, представляет собой тринуклеотид 5'-NGG-3', где N – любой из четырех нуклеотидов ДНК [30], для разных белков семейства Cas длина и последовательность этого мотива могут отличаться. Для расширения спектра последовательностей, доступных для распознавания Cas9, были сконструированы варианты фермента с измененной специфичностью к PAM [31, 32], а также использованы белки Cas9 из других бактерий [33–40].

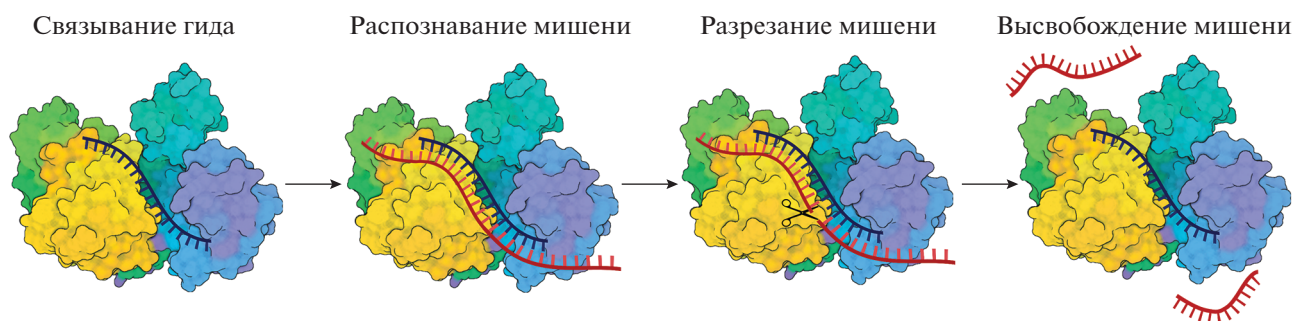
Вторая проблема применения Cas9 – разрезание нецелевой частично комплементарной ДНК. Ошибки в распознавании ДНК могут быть следствием неточного спаривания гена и мишени вне района первичного связывания (*seed*) [40, 41]. Существуют два принципиальных подхода к снижению нецелевых эффектов: повышение специфичности Cas9 [42] и ограничение времени ее воздействия на ДНК [40, 43–47].

Практическое применение нашли и другие представители CRISPR-Cas-систем II класса. В 2015 году была описана эффекторная нуклеаза Cas12a (также известная как *Cpf1*) из системы V типа бактерий *Acidaminococcus* и *Lachnospiraceae bacterium* [48]. Cas12a расщепляет обе цепи двунитевой ДНК с помощью одного нуклеазного домена RuvC, что приводит к образованию двунитевого разрыва с 4–5-нуклеотидными 5'-липкими

концами [48, 49]. Как и в случае Cas9, для узнавания мишени необходимо наличие в ней PAM – в данном случае слева от узнаваемой последовательности. После разрезания ДНК-мишени и высвобождения одного из продуктов Cas12a может осуществлять неспецифическое экзонуклеазное расщепление однонитевых ДНК. Это явление было названо “коллатеральной активностью”. В клетке такое расщепление может нарушать различные процессы метаболизма ДНК. На основе коллатеральной активности Cas12a разработаны системы детекции целевых последовательностей ДНК в биологических образцах HOLMES (*an one-Hour Low-cost Multipurpose highly Efficient System*) [50] и DETECTR (*DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter*) [51].

Эффекторная нуклеаза VI типа CRISPR-Cas-систем – Cas13 (также известная как C2c2) – имеет два РНКазных домена HEPN (*higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide binding*). Впервые нуклеаза этого типа была выделена в 2016 году из бактерии *Leptotrichia shahii* [52]. Cas13 с помощью *cr*РНК распознает целевую однонитевую РНК и расщепляет ее, при этом также проявляется неспецифическая коллатеральная активность. Cas13 может быть направлена к целевым транскриптам в клетках бактерий, растений и млекопитающих [53]. Эффективность разрушения целевой РНК сравнима с активностью РНК-интерференции с помощью коротких РНК (см. ниже). Однако для Cas13 показано значительно меньше нецелевых эффектов. На основе коллатеральной активности Cas13 создан высокочувствительный метод детекции нуклеиновых кислот SHERLOCK (*Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking*) [54, 55]. В настоящее время технологии детекции с помощью Cas-нуклеаз продолжают разрабатываться и совершенствоваться. Так, в 2020–2021 гг. на этой платформе разработано множество систем для обнаружения коронавируса-2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) – возбудителя COVID-19 [56].

В конце 2021 года описаны две группы программируемых нуклеаз транспозонов прокариот. Транспозоны группы IS200/IS605 кодируют белки IcsB – предковые формы Cas9 – и TnpB, от которых произошли нуклеазы Cas12. Они могут направляться к целевой последовательности ДНК с помощью гидовой РНК: *ω*РНК в случае IcsB и *re*РНК (*right end RNA*) для TnpB. Как и в случае Cas-нуклеаз, для взаимодействия данных нуклеаз транспозонов с целевой ДНК необходимо наличие в ней определенной короткой последовательности TAM (*target-adjacent motif*, или *transposon-associated motif*) справа или слева от узнаваемой последовательности для IcsB и TnpB соответственно. Показана возможность внесения направленных изменений в геном клеток с помощью описанных нуклеаз [57, 58].



**Рис. 2.** Расщепление нуклеиновых кислот белками-Аргонавтами. Аргонавт загружается гидовой одноцепочечной молекулой нуклеиновой кислоты (связывание гида), после чего происходит поиск мишени на основании комплементарного соответствия (распознавание мишени). Если мишень комплементарна гиду, конформация фермента меняется, происходит катализ (разрезание мишени) и разрезанная мишень высвобождается (высвобождение мишени).

## БЕЛКИ-АРГОНАВТЫ – НОВАЯ ГРУППА ПРОГРАММИРУЕМЫХ НУКЛЕАЗ

### *Аргонавты эукариот – ключевые белки РНК-интерференции*

Белки-Аргонавты (Ago), как и Cas-белки, узнают и разрезают мишень, будучи загруженными комплементарной гидовой нуклеиновой кислотой (рис. 2). В отличие от Cas-нуклеаз, никаких дополнительных последовательностей в мишени (таких как PAM) для этого не требуется. Белки-Аргонавты найдены во всех доменах жизни: у многих бактерий, архей и практически у всех эукариот, из чего следует вывод об их древнем происхождении и функциональной важности [59–61]. У эукариот белки-Аргонавты участвуют в процессе регуляции экспрессии генов малыми РНК, подавлении активности транспозонов и защите клеток от вирусных инфекций [62–68]. Они связывают короткие интерферирующие РНК (siРНК), микроРНК (miРНК) или РНК, ассоциированные с белком PIWI (piРНК), и координируют последующие события сайленсинга генов, взаимодействуя с другими белковыми факторами [68–71]. Образующиеся эффекторные комплексы распознают комплементарные РНК-мишени и могут расщеплять их благодаря эндонуклеазной активности Аргонавтов. Также для них описана не зависящая от расщепления дестабилизация РНК, репрессия транскрипции и трансляции через взаимодействия с другими белками [72, 73].

Среди эукариотических белков-Аргонавтов выделяют три группы [74–76]. Первая включает AGO-подобные белки, которые участвуют в цитоплазматическом посттранскрипционном сайленсинге генов. Вторая группа включает PIWI-подобные белки, которые встречаются преимущественно в герминальных клетках животных; они подавляют экспрессию мобильных генетических элементов и тем самым вносят вклад в поддержание целостности генома [69, 77–79]. Третья группа, WAGO, представлена исключительно белками

червей и исследована на примере *Caenorhabditis elegans*. У разных видов организмов встречается разное число белков-Аргонавтов разных групп. Например, у человека известно четыре белка, относящихся к группе AGO, и четыре – к группе PIWI [68, 80]. Различные пути РНК-интерференции могут работать в одном и том же организме и даже в одной клетке [81].

РНК-интерференция с участием белков группы AGO реализуется по двум альтернативным путям: на уровне РНК или хроматина [80, 82–85]. Собирается комплекс, отвечающий за подавление экспрессии генов с участием РНК (RISC – RNA induced silencing complex). siРНК образуются в цитоплазме в результате процессинга экзогенных и эндогенных двухцепочечных РНК под действием фермента Dicer и представляют собой двухцепочечные РНК длиной 20–30 нуклеотидов. miРНК образуются в ядре из РНК-предшественников, содержащих структуру шпильки, эндонуклеазой Drosha [70, 77, 86–90]. После загрузки короткими двухцепочечными РНК белка-Аргонавта происходит диссоциация одной из цепей дуплекса siРНК, после чего такой комплекс может распознавать полностью или частично комплементарную мРНК-мишень. В результате происходит ингибирование трансляции, эндонуклеазное расщепление мишени Аргонавтом или экзонуклеазная деградация мРНК другими нуклеазами [59, 91–93]. РНК-интерференция может проходить и на уровне хроматина с помощью модификации гистонов или метилирования ДНК, что также позволяет подавить экспрессию генов или в редких случаях приводит к активации транскрипции [80, 94, 95]. Белки группы PIWI также транслоцируются в ядро при загрузке piРНК и подавляют экспрессию транспозонов с помощью транскрипционного сайленсинга генов [69, 84, 96, 97]. В целом, пути РНК-интерференции вовлечены в широкий спектр клеточных функций, включая рост, развитие, апоптоз, а также в патофизиологические процессы, такие как канцерогенез [98].



Все эукариотические Аргонавы имеют в своем составе четыре домена: N-концевой, PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), MID (middle) и PIWI (P-element Induced Wimpy Testis), — они образуют канал, в котором располагаются нуклеиновые кислоты [83, 99–101].

PIWI-домен белков-Аргонавов содержит консервативную тетраду аминокислотных остатков DEDX (где X, как правило, остаток аспарагиновой кислоты, гистидина или лизина), которая координирует два двухвалентных катиона, необходимых для катализа [59]. Многие белки-Аргонавы содержат замены отрицательно заряженных аминокислотных остатков каталитической тетрады и не способны к расщеплению мишени [59–61].

В MID-домene находится карман для связывания 5'-конца молекулы-гида. В ряде случаев 5'-концевой нуклеотид гидовой цепи связывается специфично. Так, hAgo2 человека, KrAgo из дрожжей *Kluyveromyces polysporus* и SIWI из шелкопряда *Bombyx mori* связывают гиды, содержащие остаток уридина на 5'-конце [99, 102, 103]. Соответствующий неспаренный нуклеотид цепи-мишени может специфически распознаваться в отдельном кармане домена PIWI [104].

PAZ — небольшой домен (~140 а.о.), который участвует в связывании 3'-конца гидовой цепи, однако не является для этого абсолютно необходимым. Интересно, что PAZ присутствует не только в Аргонавах, но и в белке Dicer. Вероятно, PAZ-домен предка современных эукариотических Аргонавов претерпел дубликацию и попал в Dicer [105].

N-концевой домен наименее консервативен и, по-видимому, способствует разделению РНК-дуплекса [99, 106–108].

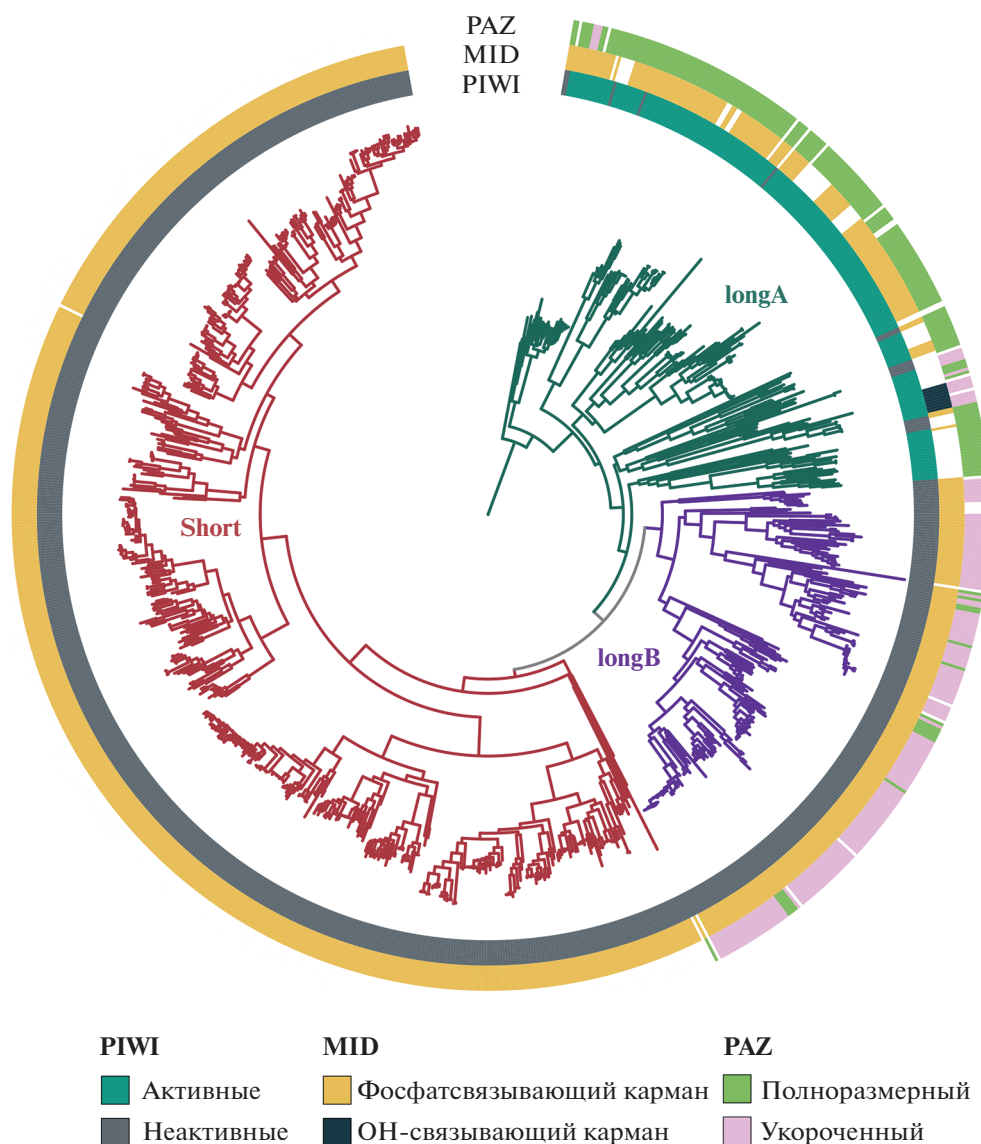
#### *Аргонавы прокариот: разнообразие структур*

О существовании генов Аргонавов у бактерий и архей было известно достаточно давно, и белки AfAgo из археи *Archaeoglobus fulgidus* [109–112] и AaAgo из бактерии *Aquifex aeolicus* [113–115] даже использовали в качестве модели для структурных исследований РНК-интерференции. Первое описание разнообразия прокариотических Аргонавов выполнено в 2009 году [59]. К. Макарова и соавт. обнаружили в невырожденной белковой базе данных RefSeq 85 гомологов эукариотических Аргонавов, закодированных в 80 прокариотических геномах. Быстрый рост числа секвенированных геномов бактерий и архей в последние годы позволил найти намного больше Аргонавов: 487 в 2014 году [61], 1010 в 2018 [60] и 1711 в 2020 [116]. В целом, около 10–20% геномов бактерий и около четверти архейных геномов кодируют хотя бы один Аргонавт, а в редких случаях прокариотиче-

ский геном содержит сразу несколько генов Аргонавов.

На филогенетическом дереве белков-Аргонавов (рис. 3) выделяют две большие группы: длинные Аргонавы, содержащие те же 4 домена, что и эукариотические белки, и короткие (“short”), в которых отсутствуют домены N-концевой и PAZ [59–61]. Все короткие Аргонавы имеют замены в активном центре в домене PIWI, что свидетельствует об отсутствии у них каталитической активности. Длинные Аргонавы подразделяются на две группы, названные “longA” и “longB” [60]. Все представители группы B относятся к неактивным Аргонавам и зачастую имеют укороченный домен PAZ, в то время как большинство длинных Аргонавов группы A обладает каталитической тетрадой и полноразмерным PAZ. Тем не менее некоторые представители различных ветвей группы A также содержат замены в каталитической тетраде, что указывает на многократное появление неактивных форм в ходе эволюции [59–61]. Филогенетический анализ показал, что эукариотические Аргонавы являются монофилетической группой и происходят из длинных прокариотических Аргонавов группы A [59–61]. Интересно, что филогенетическое дерево прокариотических Аргонавов не соответствует таксономическому дереву живых организмов. Из этого можно сделать вывод о существенном вкладе горизонтального переноса в распространении генов Аргонавов среди бактерий и архей [59–61].

К настоящему моменту охарактеризовано несколько десятков Аргонавов прокариот из разных ветвей филогенетического дерева. В таблице 1 приведено описание свойств большинства исследованных к настоящему времени прокариотических белков-Аргонавов. Внимание большей частью сфокусировано на изучении в системе *in vitro* Аргонавов бактерий и архей, обладающих нуклеазной активностью. В отличие от Аргонавов эукариот, работающих в клетке с РНК-гидами и РНК-мишенями, прокариотические Аргонавы преимущественно распознают ДНК-мишени. Некоторые из них расщепляют и РНК-мишени, хотя и менее эффективно; функциональная значимость этого феномена до сих пор не выяснена [100, 126, 148]. Большинство прокариотических Аргонавов связывают ДНК-гида, но некоторые (MrAgo из бактерии *Marinitoga piezophila* и его ближайшие гомологи) предпочитают РНК-гида [130]. Стоит сказать, что некоторые Аргонавы эукариот тоже могут использовать ДНК-гида для распознавания мишеней *in vitro* (например, hAgo2) [107, 156] и даже участвовать в репарации ДНК (AGO1 из *Arabidopsis thaliana*) [157], но, способны ли они при этом взаимодействовать с ДНК *in vivo*, пока неизвестно.



**Рис. 3.** Филогенетическое дерево прокариотических белков-Аргонавтов. Дерево построено по данным, опубликованным в статье [59]. Множественное выравнивание доменов MID и PIWI выполнено в программе MAFFT (v7.487) [117]. Для построения дерева использовали программу IQ-TREE (v2.1.4-beta) [118–120]. Цвета ветвей соответствуют группам Аргонавтов: longA (темно-зеленый), longB (фиолетовый), short (бордовый). В кругах цветом отмечены особенности устройства доменов PIWI (внутренний круг; активные белки – зеленый, неактивные – серый), MID (второй круг; фосфатсвязывающий домен – желтый, ОН-связывающий домен – черный) и PAZ (внешний круг; полноразмерный PAZ – светло-зеленый, укороченный – розовый); в коротких Аргонавтах домен PAZ отсутствует.

В отличие от Аргонавтов эукариот, прокариотические Аргонавты не нуждаются во вспомогательных белках для загрузки гидовыми нуклеиновыми кислотами. Для TtAgo из бактерии *Thermus thermophilus*, MjAgo из археи *Methanocaldococcus jannaschii*, SeAgo из бактерии *Synechococcus elongatus*, CbAgo из бактерии *Clostridium butyricum* и LrAgo из бактерии *Limnithrix rosea* показан независимый от гида процессинг плазмидной ДНК *in vitro* и загрузка фрагментами плазмиды в качестве гидов без дополнительных белковых факторов [122, 132, 142, 145].

Домены MID и PIWI наиболее консервативны и присущи всем белкам-Аргонавтам. MID-домен играет ключевую роль в связывании 5'-конца гидовой нуклеиновой кислоты. У прокариот и PIWI-белков эукариот аминокислотные остатки MID-кармана координируют двухвалентный катион ( $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ ), участвующий в связывании 5'-концевого фосфата гида [100, 103, 110, 111, 148, 158]. Однако среди активных Аргонавтов прокариот есть небольшая группа белков с гидрофобным карманом в MID-домене. Структурный анализ одного из представителей этой группы,

Таблица 1. Характеристика активных белков-Аргонавтов прокариот и эукариот

Организм	Аргонавт, protein ID	Гид, длина <sup>a</sup>	5'-конец гига <sup>b</sup>	Мишень	Температура реакции <sup>c</sup>	Ион	Мисматчи в дуплексе <sup>d</sup>	Каталитическая активность	Источник
<b>Аргонавты прокариот</b>									
<i>Aquifex aeolicus</i>	AaAgo, WP_010880937.1	ДНК 18–24	5'-P; ?	РНК, (ДНК ?)	опт. 55°C; до 75°C	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	?	При загрузке гидом	[113–115]
<i>Clostridium butyricum</i> (штаммы ТК520, CWBI 1009)	CbAgo, WP_058142162.1; CbсAgo, WP_045143632.1	ДНК <sup>e</sup> (РНК слабо) 16–18	5'-P; нет	ДНК* (РНК слабо)	опт. 37°C; 30–60°C (CbсAgo опт. 37–42°C; 25–55°C)	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	↓5, 6, 12–15 н	При загрузке гидом; без гига	[116, 121– 123]
<i>Clostridium perfringens</i>	CrAgo, WP_003477422.1	ДНК 15–30 (≥12)	5'-P; нет	ДНК (РНК)	опт. 37°C; 4–70°C	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	↓12–15 н	При загрузке гидом	[124]
<i>Ferroplasma placioides</i>	FpAgo, WP_012966655.1	ДНК 15–16	5'-P; G1	ДНК	75–99°C	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	↑7 н; ↓3,8,11–15 н	При загрузке гидом	[125]
<i>Intestinibacter bartlettii</i>	IbAgo, WP_007287731.1	ДНК 15–30 (≥14)	5'-P; нет	ДНК	опт. 37°C; 4–60°C	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	↓14–16 н	При загрузке гидом	[124]
<i>Kurtzia massiliensis</i>	KmAgo, WP_010289662.1	ДНК (РНК) 16–20 (≥12)	5'-P; нет	ДНК (РНК)	опт. 37–60°C; от 25°C	Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , слабо Co <sup>2+</sup>	↓4, 5, 10–15 н (ДНК–ДНК); ↓4, 8–11 н (ДНК–РНК); ↓3–11 н (РНК–ДНК)	При загрузке гидом; без гига (37°C)	[126, 127]
<i>Limothrix rosea</i>	LrAgo, WP_075892274.1	ДНК <sup>e</sup> 16–18 (≥10)	5'-P; нет	ДНК	опт. 37°C; 30–54°C	Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , очень слабо Co <sup>2+</sup>	↑4–8; ↓10–15 н	При загрузке гидом; без гига	[122]
<i>Methanocaldococcus fervens</i>	MfAgo, WP_015791216.1	ДНК, РНК 16	5'-P-ДНК и РНК; 5'-ОН-ДНК	ДНК	опт. 80–90°C; от 54°C	Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	?	При загрузке гидом	[128]
<i>Marinotoga piezophila</i>	MpAgo, WP_014295921.1	РНК 16–40	5'-ОН; нет	ДНК (РНК)	37, 55, 60°C	Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , слабо Ni <sup>2+</sup>	↓5, 7, 8 н; ↓5–15 н динук- леотидные замены	При загрузке гидом	[129–131]
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	MjAgo, WP_010870838.1	ДНК 15–41	5'-P; пуринны	ДНК	опт. 75–95°C; от 37°C	Mg <sup>2+</sup>	? ↓10–11 динуклеотид	При загрузке гидом; без гига	[101, 132, 133]



Таблица 1. Окончание

Организм	Аргонавт, protein ID	Гид, длина <sup>a</sup>	5'-конец гида <sup>b</sup>	Мишень	Температура реакции <sup>c</sup>	Ион	Мисматчи в дуплексе <sup>d</sup>	Каталитическая активность	Источник
<i>Naerobacterium gregoryi</i>	NgAgo, WP_005580376.1	ДНК 22–24	5'-P; ?	ДНК? (РНК?)	37°C	Mg <sup>2+</sup>	?	При загрузке гидом	[134–138]
<i>Ryrococcus furiosus</i>	RfAgo, WP_011011654.1	ДНК 15–31	5'-P; нет	ДНК	опт. 87–99.9°C; от 37°C	Mn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	?	При загрузке гидом; без гида	[139–141]
<i>Syrtexhocosoccus elongatus</i>	SeAgo, WP_011244830.1	ДНК <sup>e</sup> 14–24	5'-P; нет	ДНК <sup>e</sup>	опт. 37°C	Mn <sup>2+</sup> , слабо Mg <sup>2+</sup>	↑5, 6, 10; ↓7, 12–15, 18 н	При загрузке гидом; без гида	[142]
<i>Thermotoga profunda</i>	TrAgo, WP_041081268.1	РНК 21	5'-ОН; ?	ДНК	60°C	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	?	При загрузке гидом	[130]
<i>Thermus thermophilus</i>	TtAgo, WP_011174533.1	ДНК <sup>e</sup> 13–25	5'-P; C1 G1'	ДНК <sup>e</sup> (РНК)	опт. 73–75°C; ≥20°C; оцДНК; ≥65°C плазмиды	Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	↓12–15 н	При загрузке гидом; без гида	[100, 106, 143–149]
<b>Аргонавты эукариот</b>									
<i>Homo sapiens</i>	hAgo2, NP_036286.2	РНК <sup>e</sup> (ДНК) 20–21	5'-P; U1 A1'	РНК <sup>e</sup>	37°C	Mg <sup>2+</sup>	↓2–8 н (связывание мишени); ↓8–11 н тройной мисматч	При загрузке гидом	[99, 139, 150–152]
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	KrAgo, XP_001644461.1	РНК <sup>e</sup> (ДНК) 12–17 (11–25)	5'-P; U1	РНК <sup>e</sup>	25–30°C	Mg <sup>2+</sup>	↓7–14 н (↓↓9–13)	При загрузке гидом	[102, 153]
<i>Vombex mori</i>	SIWI, NP_001098066.2	РНК <sup>e</sup> 28–30	5'-P; U1	РНК <sup>e</sup>	26, 37°C	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	↓2–7 н (связывание мишени)	При загрузке гидом	[103, 154, 155]

<sup>a</sup> Тип гидовой нуклеиновой кислоты и ее длина (число нуклеотидов).

<sup>b</sup> Характеристика 5'-конца гида: P – фосфатная группа, OH – гидроксильная группа; наличие специфичности к азотистому основанию: нет – нет специфичности, A/U/G/C – типы азотистых оснований, 1 – первый нуклеотид гидовой цепи; 1' – первый нуклеотид цепи-мишени. Здесь и далее: ? – неизвестно.

<sup>c</sup> Температура, при которой Аргонавт способен к разрезанию мишени; опт. – температурный оптимум, также приведен диапазон температур, при которых Аргонавт разрезает мишень. Дискретные значения температуры приведены для публикаций, где измерения проводились только в данных условиях.

<sup>d</sup> Влияние мисматчей (несопаренных нуклеотидов дуплекса гид–мишень) на эффективность разрезания мишени; позиции нуклеотидов (н) пронумерованы относительно 5'-конца гида. ↑ – увеличение эффективности расщепления, ↓ – снижение эффективности расщепления.

<sup>e</sup> Как *in vitro*, так и *in vivo*.

MrAgo из *Marinitoga piezophila*, показал, что такие Аргонавты не связывают двухвалентный катион в MID-кармане и “предпочитают” нефосфорилированные по 5'-концу гиды [60, 130].

Некоторые Аргонавты бактерий и архей дискриминируют гиды по азотистому основанию 5'-концевого нуклеотида: RsAgo из бактерии *Rhodobacter sphaeroides* связывает гиды, содержащие урацил на 5'-конце, TtAgo из бактерии *Thermus thermophilus* – цитозин, FpAgo из археи *Ferroplasma acidophilum* – гуанин, MjAgo из археи *Methanocaldococcus jannaschii* – пурины. В то же время другие исследованные Аргонавты прокариот не проявляют специфичности в связывании 5'-концевого нуклеотида (табл. 1) [101–103, 122, 124, 125, 130, 141, 142, 146, 159]. Соответствующий неспаренный нуклеотид цепи-мишени может специфически распознаваться в отдельном кармане домена PIWI (G – для TtAgo, A – для RsAgo) [145, 158].

Будучи связанным в MID-кармане, 5'-концевой нуклеотид молекулы-гида не участвует в образовании водородных связей с мишенью и называется якорным (“anchor”). Также в гиде выделяют район первичного связывания (“seed”) – 2–8 нуклеотидов, сайт расщепления – 10–11 нуклеотидов, 3'-дополнительный (“supplementary”) сайт – 12–16 нуклеотидов и 3'-концевой участок, последний нуклеотид которого обычно связывается в кармане PAZ-домена [151, 160–164]. Большинство активных Аргонавтов расщепляет мишень между позициями, комплементарными 10 и 11 нуклеотидам гидовой цепи [100, 101, 132, 133, 148]. Некоторые прокариотические Аргонавты, в норме связывающие 5'-фосфорилированные гиды, также могут использовать и 5'-ОН гиды, например CbAgo, LrAgo, KmAgo, SeAgo, однако в этом случае сайт расщепления сдвигается на один нуклеотид [122, 123, 126, 142].

Связывание комплементарной мишени Аргонавтом, загруженным гидом, сопровождается структурными перестройками, которые включают вращение домена PAZ и изменение взаиморасположения нескольких петель в домене PIWI [100, 129, 144, 148]. 3'-Конец гидовой цепи высвобождается из PAZ и образуется каталитически активный тройной комплекс Аргонавта с гидом и мишенью [165, 166].

Для эукариотических Аргонавтов показана важность комплементарности гида и мишени в позициях 2–8 дуплекса, считая от 5'-конца гида в районе первичного связывания (“seed”). Некомплементарные нуклеотиды и инсерции в гиде напротив места разрезания мишени также значительно уменьшают эффективность расщепления мишеней, а мисматчи в 3'-концевом участке не оказывают значительного влияния [151, 163, 167]. Такую общую закономерность нельзя выявить для Аргонавтов прокариот, вероятно, в связи с их

большим разнообразием. Взаимодействия гидов с не полностью комплементарными мишенями могут по-разному влиять на активность прокариотических Аргонавтов. Показано, что TtAgo и RsAgo могут связывать дуплекс гида с мишенью с инсерциями в seed-районе без существенных изменений структуры [158, 168, 169]. У LrAgo и SeAgo некомплементарные взаимодействия в районе первичного связывания даже стимулируют расщепление ДНК [122, 142]. Интересно отметить, что наличие дополнительных или некомплементарных нуклеотидов в seed-районе стимулирует высвобождение гибрида “гид–мишень” из hAgo2 и прокариотического RsAgo, что может быть механизмом замены молекул гида, связанных с Аргонавтом [150, 158]. В отличие от Аргонавтов эукариот, CbAgo, LrAgo, SeAgo и TtAgo чувствительны к наличию неспаренного участка в 3'-дополнительной области ДНК-гида [122, 142, 143]. В целом, подобные эксперименты необходимы для понимания специфичности выбора и разрезания мишени при изучении новых прокариотических Аргонавтов разных групп.

Остается открытым вопрос о том, какие именно особенности строения прокариотических Аргонавтов отвечают за дискриминацию РНК/ДНК-гидов и мишеней, а также за чувствительность к нарушениям комплементарности в дуплексе гид–мишень. Вероятно, эти особенности, в первую очередь, определяются различиями в строении доменов MID и PIWI. Для ответа на поставленный вопрос необходимы дальнейшие исследования активности и структур прокариотических белков-Аргонавтов.

#### *Белки-Аргонавты защищают клетки прокариот от чужеродных нуклеиновых кислот*

Еще в 2009 году было высказано предположение о возможной роли прокариотических Аргонавтов в защите клеток от вирусов [59]. В то же время экспериментальные данные, подтверждающие эту гипотезу, появились совсем недавно.

Во-первых, показано, что гены Аргонавтов часто находятся в так называемых “защитных островах” (defence islands) – участках генома с повышенной мобильностью, в которых кодируются различные системы, защищающие бактерии и археи от чужеродных нуклеиновых кислот. Наиболее известные защитные механизмы прокариот – это системы рестрикции-модификации и CRISPR-Cas. На сегодняшний день известно более сотни таких систем, и это число продолжает расти [170–173]. Гены с неизвестной функцией, часто закодированные в защитных островах, с высокой вероятностью также вовлечены в работу защитных систем [59, 174–176]. Интересно, что некоторые группы прокариотических Аргонавтов ассоциированы с определенными защитными системами.

Так, использующий РНК-гиды MrAgo и его ближайшие гомологи кодируются вблизи систем CRISPR-Cas [130]. Более обширный анализ показал, что активные Аргонавты бактерий и архей в большинстве случаев кодируются в геномах, содержащих также CRISPR-Cas-системы, в то время как геномы без Аргонавтов или с неактивными Аргонавтами содержат CRISPR-Cas-системы намного реже [116]. Более подробный анализ ассоциации различных групп Аргонавтов с другими защитными системами прокариот — предмет дальнейших исследований.

Во-вторых, некоторые прокариотические Аргонавты ассоциированы с дополнительными доменами, выполняющими защитные функции. Так, многие короткие Аргонавты имеют в своем составе домены SIR2 (silent information regulator 2) или TIR (Toll/interleukin-1 receptor) или кодирующие их последовательности находятся в соседнем гене [59, 60]. Эти домены также входят в защитную систему Thoeris, найденную у бактерий: в ответ на заражение клетки вирусом они расщепляют  $NAD^+$ , что приводит к смерти клетки и остановке распространения вируса в популяции [175, 177, 178]. Недавно показано, что системы SIR2/Ago и TIR/Ago защищают клетки бактерий от фагов и плазмид: MID-PIWI домены Аргонавтов узнают чужеродную ДНК, а SIR2 или TIR расщепляет  $NAD^+$  [178, 179]. Система TIR/Ago также участвует в защите от плазмид. Некоторые Аргонавты ассоциированы в оперонах с нуклеазами из разных семейств, которые, предположительно, участвуют в продукции гидов или выполняют роль белков-эффекторов защитных систем [59, 60].

Наконец, в последние годы получены прямые экспериментальные подтверждения защитной роли длинных Аргонавтов в бактериях. Так, белок CbAgo защищает клетки от фагов [116], белки CbAgo [116], PfAgo (из археи *Pyrococcus furiosus*) [141] и RsAgo [159] снижают эффективность трансформации и способствуют деградации плазмид в бактериальных клетках.

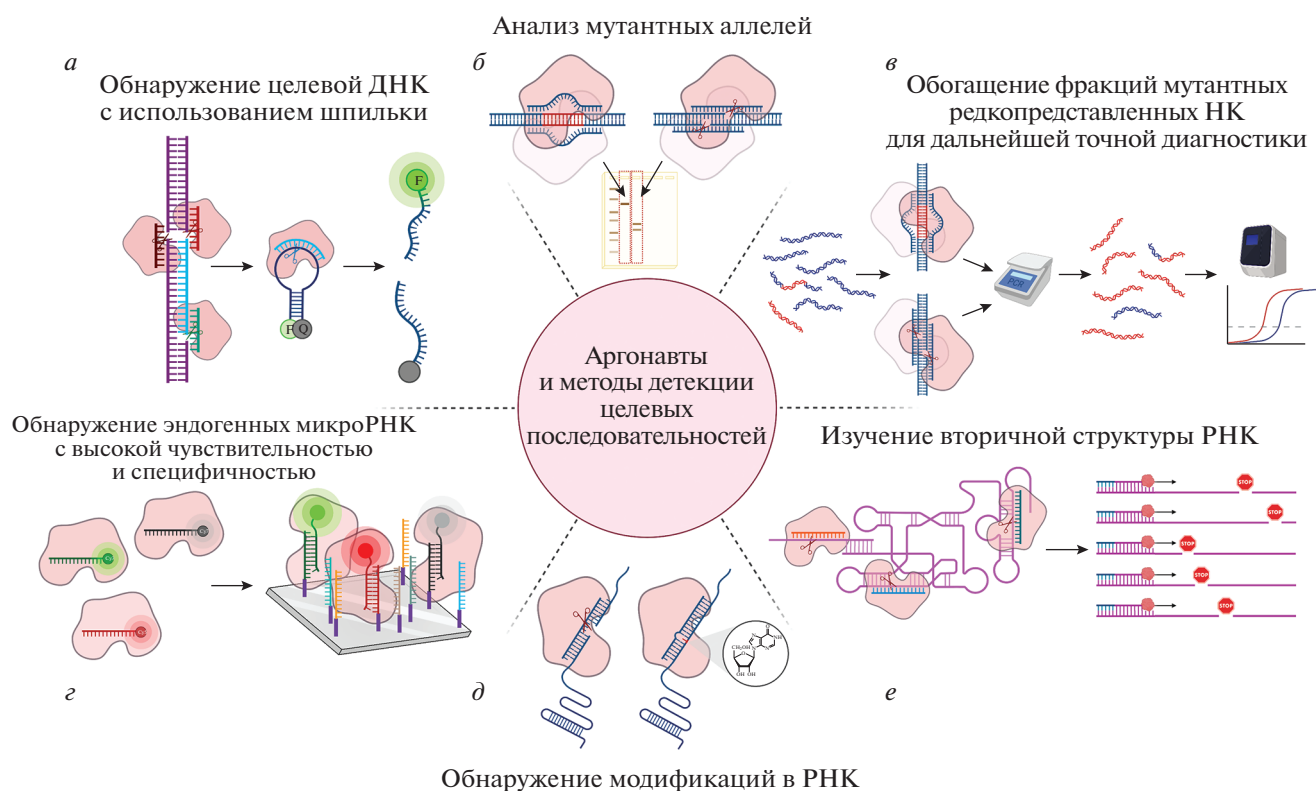
Помимо защиты клеток от чужеродной ДНК Аргонавты могут выполнять и другие функции. К настоящему моменту известен один такой пример: показано, что в отсутствие гиразы TtAgo участвует в клеточном делении, разрешая катенаны хромосом после репликации в клетках *Thermus thermophilus* [149]. Разнообразие строения и особенностей активности прокариотических Аргонавтов может свидетельствовать о том, что их функциональная роль в клетках бактерий и архей не ограничивается известными на сегодняшний день примерами.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ-АРГОНАВТОВ

Белки-Аргонавты считаются перспективными кандидатами для направленных манипуляций с нуклеиновыми кислотами и редактирования геномов. Способность белков-Аргонавтов работать в качестве сайт-специфических программируемых нуклеаз открывает широкие возможности для их применения *in vitro*. Известные к настоящему моменту области применения белков-Аргонавтов бактерий суммированы на рис. 4.

В отличие от часто используемых в лабораторной практике эндонуклеаз рестрикции, с помощью белка-Аргонавта можно внести разрез потенциально в любую последовательность ДНК и получать фрагменты с “липкими” концами необходимой длины и нуклеотидного состава. В связи с тем, что Аргонавты имеют единственный активный центр и могут расщепить только одну цепь ДНК, для расщепления двунитевой ДНК необходимо загружать Аргонавты гидами, комплементарными противоположным цепям в районе сайта разрезания. Так, Аргонавт PfAgo термофильной бактерии успешно использован для сборки генетических конструкций, а также для их анализа [185]. В масштабном исследовании с использованием панели гидов для Аргонавта TtAgo определены закономерности предпочтения к последовательностям гидов. На основании результатов, полученных в ходе этой работы, можно существенно оптимизировать “работу” TtAgo в качестве программируемой эндонуклеазы [143, 186].

Важное направление применения белков-Аргонавтов — детекция целевых последовательностей и модификаций нуклеотидов в биологических образцах. Система обнаружения искомой последовательности в образце, разработанная на основе PfAgo, получила название PAND (PfAgo-mediated Nucleic acid Detection). В методике используют репортерную ДНК, при расщеплении которой Аргонавтом происходит разобщение флуоресцентной метки и гасителя и появляется флуоресцентный сигнал (рис. 4). Гидом для разрезания репортера служит фрагмент искомой последовательности ДНК, который вырезается из ДНК образца с помощью PfAgo и комбинации трех синтетических гидов. При использовании репортеров с различными флуоресцентными маячками возможна детекция нескольких последовательностей в одной пробирке [180]. Этот метод успешно адаптировали для идентификации РНК SARS-CoV-2 и его мутантного варианта (D614G в белке шипа) в образцах, полученных от пациентов [187]. Объединение двух методов: PAND и лигазной цепной реакции, позволило упростить процедуру детекции нуклеиновых кислот. Комбинированный протокол получил название



**Рис. 4.** Детекция целевых последовательностей в биологических образцах с использованием белков-Аргонавтов. *а* – Детекция нуклеиновых кислот с помощью Аргонавтов. Аргонавт программируют так, чтобы вырезать из ДНК целевую последовательность; кроме того, в образец добавляют комплементарный этой последовательности олигонуклеотидный зонд, имеющий структуру шпильки, к концам которой присоединены флуоресцентная метка (F) и гаситель (Q). При первом раунде катализа Аргонавт вырезает целевую последовательность в образце, после чего связывают ее в качестве гида и осуществляют второй раунд катализа, в результате чего происходит расщепление флуоресцентного зонда. По увеличению интенсивности свечения судят о наличии целевой последовательности [180, 181]. *б* – Анализ мутантных аллелей в биологических образцах. Для обнаружения мутантного аллеля ДНК сначала амплифицируют, а затем ПЦР-продукты инкубируют при 98°C с Аргонавтом с парными ДНК-гидами, соответствующими одному из вариантов целевой последовательности; продукты разделяют в агарозном геле [182]. *в* – Детекция редких вариантов ДНК. Образец с мутантной ДНК инкубируют с Аргонавтом, загруженным гидами к последовательности дикого типа; после катализа целыми остаются только мутантные ДНК; их количество можно оценить с помощью ПЦР в реальном времени или другими методами [183]. НК – нуклеиновая кислота. *г* – Для детекции микроРНК каталитически неактивный Аргонавт загружают гидом, соответствующим целевой последовательности и содержащим флуоресцентную метку; после инкубации с иммобилизованными на чипе miРНК детектируют сигнал флуоресценции гидов, иммобилизованных в комплексе с Аргонавтами и miРНК-мишенью [184]. *д* – Выявление модификаций в РНК (например, присутствие инозина в интересующей последовательности предотвращает разрезание мишени) [131]. *е* – Анализ вторичной структуры РНК. Структурированные РНК инкубируют с Аргонавтами, загруженными гидами к различным участкам последовательности; сайты разрезания можно детектировать напрямую или с помощью обратной транскрипции [126, 127, 153].

PLCR (PfAgo coupled with modified Ligase Chain Reaction for nucleic acid detection). Термостабильная лигаза соединяет две половины гида, используя целевую ДНК как матрицу. Далее в ходе нескольких циклов происходит амплификация гидов. Гид загружается в Аргонавт, происходит разрезание репортерной ДНК, в результате чего появляется флуоресцентный сигнал [181].

Другие предложенные методы основаны на принципе снижения активности Аргонавта при наличии в мишени замены или модификации – по сравнению с ситуацией, когда гид и мишень полностью комплементарны (рис. 4). Быстрый анализ наличия инсерций или делеций в одной

или двух аллелях целевого гена, возникающих при редактировании генома, возможен, если подобрать гида к месту расщепления ДНК редактирующей нуклеазой. В случае аллеля дикого типа произойдет разрезание ДНК Аргонавтом. Продукты реакции можно детектировать в геле [182]. Для обнаружения редких однонуклеотидных замен, возникающих, например, в раковых клетках, разработан метод NAVIGATER (Nucleic Acids of clinical interest Via DNA-Guided Argonaute from *Thermus thermophilus*). Для обнаружения ДНК или РНК с однонуклеотидной заменой нужно подобрать гид так, чтобы он был комплементарен преобладающим в образце последовательностям ди-

кого типа, а редкий вариант имел замену в 10 или 11 положении мишени, считая от 5'-конца гида. Наличие замены резко снижает нуклеазную активность TtAgo. В этом случае ДНК дикого типа будет расщеплена Аргонавтом и относительное содержание редкого варианта повысится. Такое обогащение дает возможность детектировать редкий вариант стандартными методами: различными вариантами ПЦР или секвенированием [183].

Для обнаружения замен и модификаций в РНК необходимо использовать Аргонавт с соответствующей специфичностью. MrAgo использует в качестве гидов РНК и может связывать комплементарную РНК-мишень. Для распознавания мишени наиболее важны 6 и 7 нуклеотид. С помощью определения прочности ассоциации гидовой РНК с мишенью возможно идентифицировать мисматчи, а также модифицированные нуклеотиды, такие как инозин (рис. 4) [131]. Разность в эффективности расщепления одно- и двунитевой РНК может быть использована для изучения строения высокоструктурированных РНК. Возможность направлять Аргонавт к определенным последовательностям РНК позволяет изучать структуру конкретных участков РНК в различных условиях [126, 127, 153].

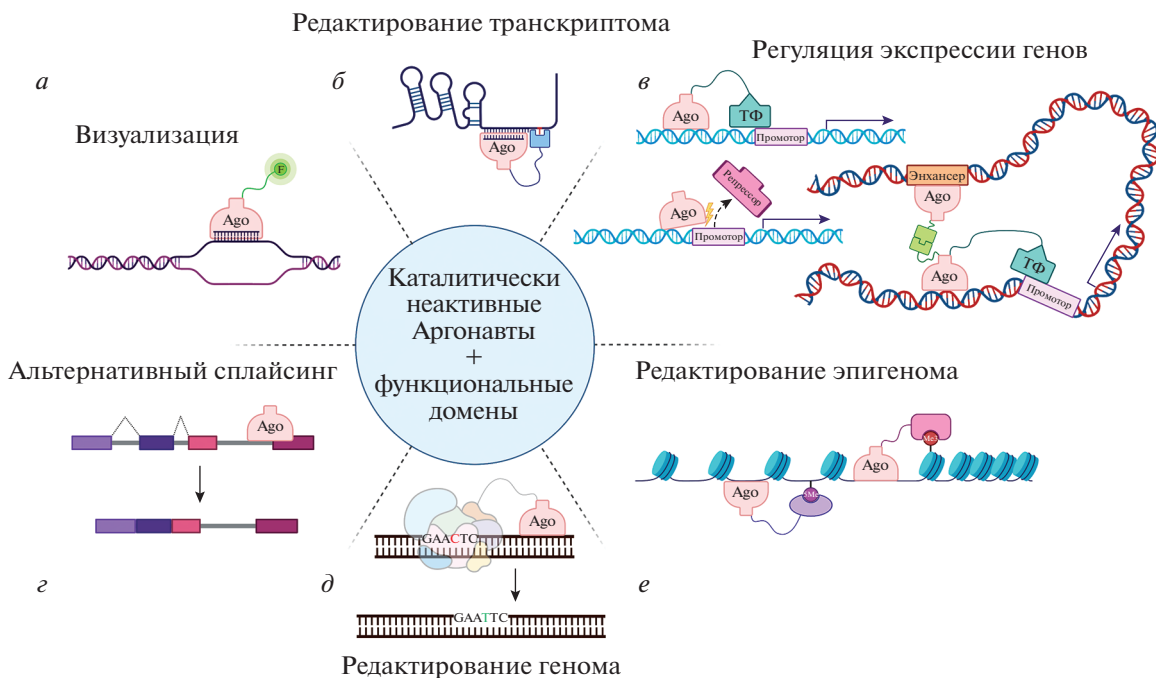
Аргонавты также нашли применение в микроскопии супер разрешения для визуализации структур, находящихся за дифракционным пределом микроскопии. Метод DNA-PAINT (DNA Point Accumulation In Nanoscale Topology) основан на детекции ассоциации и диссоциации флуоресцентного ДНК-зонда с закрепленной ДНК-мишенью. В случае, если меченый ДНК-гид загружен в Аргонавт CbAgo, скорость процесса повышается за счет того, что Аргонавт организует гидовую ДНК для оптимального связывания мишени [188]. Способность Аргонавта ускорять связывание флуоресцентно меченного ДНК-гида с РНК-мишенью также была использована для специфической визуализации miРНК. Авторы, S. Shin и др. [184], назвали эту технологию Ago-FISH (Argonaute-based Fluorescence In Situ Hybridization) (рис. 4).

Способность Аргонавтов вносить сайт-специфические разрезы в нуклеиновые кислоты позволяет рассматривать их как потенциальные инструменты для редактирования генома и транскриптома. В этом качестве Аргонавты могут иметь некоторые преимущества перед наиболее широко используемыми сейчас Cas-нуклеазами. Во-первых, Аргонавты не требуют наличия PAM-последовательности в целевой ДНК. Во-вторых, гиды большого размера Аргонавтов прокариот представляют собой короткие ДНК, в то время как для Cas необходимы длинные РНК-гиды. Синтез ДНК гораздо дешевле, это открывает возможности для широкого применения системы

редактирования генома, основанного на использовании Аргонавтов. В-третьих, размер молекулы Аргонавта меньше, чем Cas9, поэтому их легче доставлять внутрь клеток [189, 190].

В 2016 году опубликована работа по редактированию генома клеток человека с помощью Аргонавта из галофильной археи *Natronobacterium gregoryi* (NgAgo) [189]. Однако вскоре авторы отозвали статью, так как другие группы исследователей не подтвердили достоверность изложенных в ней результатов при попытках внести с помощью NgAgo изменения в геном клеток человека, эмбрионов мыши и эмбрионов *Danio rerio*, а также вируса гепатита В [135, 137, 138, 191–194]. Также не удалась попытка редактирования генома клеток человека с использованием Аргонавта TtAgo [135]. Таким образом, вопрос о возможности применения Аргонавтов в качестве инструмента редактирования генома остается открытым. Следует сказать, что выбор белка-Аргонавта может значительно повлиять на результаты таких экспериментов. В опубликованных работах использовали Аргонавты из термофильных микроорганизмов – с оптимумом работы при высоких температурах. Кроме того, NgAgo – белок из галофильной археи, а известно, что экспрессия и сворачивание таких белков происходит неэффективно в нормальных солевых условиях [195]. В некоторых исследованиях, не давших положительного результата, на С-конец Аргонавта был добавлен сигнал ядерной локализации (nuclear localization signal, NLS) [135, 137, 193]. Это могло повлиять на активность белка, так как С-конец Аргонавта важен для катализа [144]. Также использовали гиды к последовательностям, находящимся на противоположных цепях ДНК на большом расстоянии друг от друга [194]. В нескольких исследованиях с использованием NgAgo заметили снижение уровня мРНК целевого гена без внесения изменений в соответствующий участок генома, возможно, из-за взаимодействий Аргонавта с РНК-мишенями [137, 138]. Таким образом, для проведения дальнейших экспериментов по редактированию генома стоит выбирать высокоспецифичные к ДНК-мишеням Аргонавты, активность которых оптимальна при физиологических условиях.

Аргонавты с нефункциональным каталитическим центром – неактивные Аргонавты или мутантные формы активных Аргонавтов – также имеют большой потенциал практического применения. Такие Аргонавты распознают целевые последовательности ДНК или РНК с помощью гидов и потенциально могут быть использованы в качестве ДНК-распознающего домена при конструировании химерных белков с различными функциями. Ранее подобные подходы с успехом использовали в случае Cas-нуклеаз. Возможные области применения каталитически неактивных



**Рис. 5.** Перспективные направления применения каталитически неактивных Аргонавтов в биотехнологии. *a* – Аргонавт (Ago) может быть шит с флуоресцентной меткой (F) и загружен гидом, комплементарным интересующей последовательности. *б* – Аргонавт может быть объединен с ферментами, заменяющими или модифицирующими нуклеотиды в составе РНК. *в* – Объединение Аргонавта с транскрипционным фактором (ТФ) может усилить транскрипцию конкретного гена; сходный эффект достигается при конкуренции Аргонавта с белком-репрессором транскрипции; Аргонавт с дополнительными доменами может усилить связь энхансера с промотором интересующего гена и тем самым активировать транскрипцию. *г* – При нацеливании Аргонавта на конкретный участок пре-мРНК можно регулировать ее сплайсинг. *д* – Для программируемого изменения конкретных участков генома Аргонавт может быть шит с различными ферментами системы редактирования ДНК. *е* – Для редактирования эпигенома Аргонавт может быть соединен с ферментами, модифицирующими гистоны и ДНК (маленьким красным кругом обозначена модификация гистона, сиреневым – метилирование цитозина в ДНК).

белков-Аргонавтов бактерий суммированы на рис. 5. Например, соединение Аргонавтов с ферментами, модифицирующими азотистые основания, может быть использовано для внесения изменений в последовательность ДНК или РНК без образования двухцепочечного разрыва. Цитидиндезаминаза конвертирует цитидин в уридин, что приводит к замене пары С:G на Т:А при репликации ДНК [196]. Провести обратную замену – пары Т:А на С:G – может химерный белок, содержащий в качестве функционального домена аденозиндезаминазу, которая превращает аденин в инозин, распознаваемый полимеразой как гуанин [197].

Аргонавты могут использоваться как ДНК-распознающий домен для привлечения к нужным местам ДНК факторов, изменяющих эпигенетические метки и тем самым активирующих или инактивирующих экспрессию генов (рис. 5). Для этого могут быть использованы подходы, ранее предложенные для каталитически неактивных вариантов Cas-нуклеаз. Активации или подавления экспрессии генов можно добиться, соединив Аргонавт соответственно с транскрипционными акти-

ваторами или репрессорами. Например, направление цитозин-ДНК-метилтрансферазы DNMT3A к промотору целевого гена позволяет снизить его экспрессию. Использование домена KRAB (Krüppel-associated box), образующего комплекс с двумя ДНК-метилтрансферазами гистонов, приводит к репрессии целевых генов. Соединение с ацетилтрансферазой р300 приводит к ацетилрованию лизина в позиции 27 гистона H3 и, как следствие, к транскрипционной активации целевых генов [40, 198]. Изменение взаиморасположения участков ДНК в ядре может приводить к изменению экспрессии генов, например при сближении промоторов и энхансеров [199]. Для этого могут быть использованы неактивные Аргонавты, соединенные с гетеродимеризующимися белковыми доменами. Также Аргонавты могут быть использованы в качестве ДНК-распознающего домена для визуализации различных структур и процессов, происходящих в ядре в случае сшивок с флуоресцентными белками, как это было показано для нуклеаз TALEN [200], или в качестве РНК-распознающего домена для визуализации местонахождения целевых РНК в клетке (рис. 5).



Неактивные Аргонавты, взаимодействующие с РНК-мишенями, могут быть использованы для привлечения к РНК дополнительных функциональных доменов для регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Например, эффекторные домены белков YTHDF1 и YTHDF2 (YTHDF1-В Homology Domain Family) в эукариотических клетках распознают N6-метиладенозин в РНК. YTHDF1 активирует трансляцию целевой РНК, а YTHDF2, наоборот, приводит к ее деградации. Замена домена, распознающего N6-метиладенозин, на РНК-распознающий домен позволяет направить эти функции к произвольно выбранной РНК [201]. Также возможно точечное редактирование РНК с помощью дезаминазного домена белка ADAR1 (Adenosine Deaminase Acting on RNA) или ADAR2 человека. Этот белок превращает аденозин в инозин, преимущественно в тех случаях, когда аденозин стоит напротив цитидина в РНК-дуплексе [202]. Аналогично опубликованным экспериментам с использованием dCas9 (каталитически неактивным вариантом Cas-9), РНК-узнающие Аргонавты можно использовать и для регуляции альтернативного сплайсинга, изменяя эффективность включения в зрелую мРНК определенных экзонов (рис. 5) [203].

Эволюция инструментов для редактирования генома шла от поиска и создания белков, способных узнавать конкретные последовательности ДНК (мегануклеазы, TALEN, нуклеазы на основе цинковых пальцев) к открытию универсальных программируемых нуклеаз, специфичность которых определяется гидовыми нуклеиновыми кислотами. К таким направляемым нуклеазам относятся ферменты на основе Cas-белков, которые активно используют в настоящее время для редактирования генов, а также белки-Аргонавты. Хотя пока не удалось достичь успехов в использовании Аргонавтов для редактирования геномов, их разнообразие, как структурное, так и функциональное, позволяет надеяться, что в скором времени они составят конкуренцию нуклеазам Cas.

В настоящее время исследования белков семейства Аргонавтов прокариот уже привели к практическому применению результатов данных работ – в формате новых высокочувствительных методов детекции нуклеиновых кислот, в том числе РНК SARS-CoV-2. В ближайшее время стоит ожидать появления работ с использованием Аргонавтов как эффективных инструментов для манипуляций с нуклеиновыми кислотами *in vitro*, а затем и *in vivo*, в том числе для редактирования геномных последовательностей.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 19-14-00359.

В работе не проводились эксперименты с использованием лабораторных животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Židek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. **596**(7873), 583–589.
2. Zhang B., Luo D., Li Y., Perčulija V., Chen J., Lin J., Ye Y., Ouyang S. (2021) Mechanistic insights into the R-loop formation and cleavage in CRISPR-Cas12i1. *Nat. Commun.* **12**(1), 3476.
3. Zhang Y., Zhang H., Xu X., Wang Y., Chen W., Wang Y., Wu Z., Tang N., Wang Y., Zhao S., Gan J., Ji Q. (2020) Catalytic-state structure and engineering of *Streptococcus thermophilus* Cas9. *Nat. Catal.* **3**(10), 813–823.
4. Hafez M., Hausner G. (2012) Homing endonucleases: DNA scissors on a mission. *Genome*. **55**(8), 553–569.
5. Paques F., Duchateau P. (2007) Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **7**(1), 49–66.
6. Jurica M.S., Monnat R.J., Stoddard B.L. (1998) DNA recognition and cleavage by the LAGLIDADG homing endonuclease I-Crel. *Mol. Cell.* **2**(4), 469–476.
7. McMurrough T.A., Brown C.M., Zhang K., Hausner G., Junop M.S., Gloor G.B., Edgell D.R. (2018) Active site residue identity regulates cleavage preference of LAGLIDADG homing endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **46**(22), 11990–12007.
8. Smith J., Grizot S., Arnould S., Duclert A., Epinat J.C., Chames P., Prieto J., Redondo P., Blanco F.J., Bravo J., Montoya G., Pâques F., Duchateau P. (2006) A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**(22), e149.
9. Chevalier B.S., Kortemme T., Chadsey M.S., Baker D., Monnat R.J., Stoddard B.L. (2002) Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease. *Mol. Cell.* **10**(4), 895–905.
10. Li H., Pellenz S., Ulge U., Stoddard B.L., Monnat R.J. (2009) Generation of single-chain LAGLIDADG homing endonucleases from native homodimeric precursor proteins. *Nucleic Acids Res.* **37**(5), 1650–1662.
11. Kim Y.G., Chandrasegaran S. (1994) Chimeric restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**(3), 883–887.
12. Varshney G.K., Burgess S.M. (2016) DNA-guided genome editing using structure-guided endonucleases. *Genome Biol.* **17**(1), 187.
13. Xu S., Cao S., Zou B., Yue Y., Gu C., Chen X., Wang P., Dong X., Xiang Z., Li K., Zhu M., Zhao Q., Zhou G. (2016) An alternative novel tool for DNA editing with-

- out target sequence limitation: the structure-guided nuclease. *Genome Biol.* **17**(1), 186.
14. Miller J., McLachlan A.D., Klug A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4**(6), 1609–1614.
  15. Klug A. (2010) The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 213–231.
  16. Chandrasegaran S., Carroll D. (2016) Origins of programmable nucleases for genome engineering. *J. Mol. Biol.* **428**(5), 963–989.
  17. Pavletich N.P., Pabo C.O. (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science.* **252**(5007), 809–817.
  18. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**(3), 1156–1160.
  19. Shimizu Y., Şöllü C., Meckler J.F., Adriaenssens A., Zykovich A., Cathomen T., Segal D.J. (2011) Adding fingers to an engineered zinc finger nuclease can reduce activity. *Biochemistry.* **50**(22), 5033–5041.
  20. Bonas U., Stall R.E., Staskawicz B. (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *MGG Mol. Gen. Genet.* **218**(1), 127–136.
  21. Kay S., Hahn S., Marois E., Hause G., Bonas U. (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science.* **318**(5850), 648–651.
  22. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* **326**, 1509–1512.
  23. Moscou M.J., Bogdanove A.J. (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science.* **326**(5959), 1501.
  24. Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics.* **186**(2), 757–761.
  25. Koonin E.V., Makarova K.S. (2019) Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos. Trans. R Soc. B Biol. Sci.* **374**(1772), 20180087.
  26. Jiang F., Doudna J.A. (2017) CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529.
  27. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* **339**(6121), 819–823.
  28. Jinek M., East A., Cheng A., Lin S., Ma E., Doudna J. (2013) RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife.* **2**, e00471.
  29. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* **339**(6121), 823–826.
  30. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* **337**(6096), 816–821.
  31. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell.* **156**(5), 935–949.
  32. Chatterjee P., Lee J., Nip L., Koseki S.R.T., Tysinger E., Sontheimer E.J., Jacobson J.M., Jakimo N. (2020) A Cas9 with PAM recognition for adenine dinucleotides. *Nat. Commun.* **11**(1), 2474.
  33. Ran F.A., Cong L., Yan W.X., Scott D.A., Gootenberg J.S., Kriz A.J., Zetsche B., Shalem O., Wu X., Makarova K.S., Koonin E.V., Sharp P.A., Zhang F. (2015) *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature.* **520**(7546), 186–191.
  34. Hu Z., Wang S., Zhang C., Gao N., Li M., Wang D., Wang D., Liu D., Liu H., Ong S.G., Wang H., Wang Y. (2020) A compact Cas9 ortholog from *Staphylococcus auricularis* (*Sauricas9*) expands the DNA targeting scope. *PLoS Biol.* **18**, e3000686.
  35. Karvelis T., Gasiunas G., Young J., Bigelyte G., Silanskas A., Cigan M., Siksnys V. (2015) Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements. *Genome Biol.* **16**(1), 253.
  36. Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V.V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P.W., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.R.J., Aryee M.J., Joung J.K. (2015) Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature.* **523**(7561), 481–485.
  37. Heler R., Wright A.V., Vucelja M., Bikard D., Doudna J.A., Marraffini L.A. (2017) Mutations in Cas9 enhance the rate of acquisition of viral spacer sequences during the CRISPR-Cas immune response. *Mol. Cell.* **65**(1), 168–175.
  38. Hu J.H., Miller S.M., Geurts M.H., Tang W., Chen L., Sun N., Zeina C.M., Gao X., Rees H.A., Lin Z., Liu D.R. (2018) Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature.* **556**(7699), 57–63.
  39. Nakade S., Yamamoto T., Sakuma T. (2017) Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3 – What's next? *Bioengineered.* **8**(3), 265–273.
  40. Ribeiro L.F., Ribeiro L.F.C., Barreto M.Q., Ward R.J. (2018) Protein engineering strategies to expand CRISPR-Cas9 applications. *Int. J. Genomics.* **2018**, 1652567.
  41. Tsai S.Q., Joung J.K. (2016) Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat. Rev. Genet.* **17**(5), 300–312.
  42. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* **351**(6268), 84–88.
  43. Kim S., Kim D., Cho S.W., Kim J., Kim J.S. (2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* **24**(6), 1012–1019.
  44. Maji B., Moore C.L., Zetsche B., Volz S.E., Zhang F., Shoulders M.D., Choudhary A. (2017) Multidimensional chemical control of CRISPR-Cas9. *Nat. Chem. Biol.* **13**(1), 9–11.

45. Davis K.M., Pattanayak V., Thompson D.B., Zuris J.A., Liu D.R. (2015) Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat. Chem. Biol.* **11**(5), 316–318.
46. Zetsche B., Volz S.E., Zhang F. (2015) A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat. Biotechnol.* **33**(2), 139–142.
47. Nihongaki Y., Kawano F., Nakajima T., Sato M. (2015) Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat. Biotechnol.* **33**(7), 755–760.
48. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* **163**(3), 759–771.
49. Paul B., Montoya G. (2020) CRISPR-Cas12a: functional overview and applications. *Biomed. J.* **43**(1), 8–17.
50. Li L., Li S., Wu N., Wu J., Wang G., Zhao G., Wang J. (2019) HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation. *ACS Synth. Biol.* **8**(10), 2228–2237.
51. Chen J.S., Ma E., Harrington L.B., Da Costa M., Tian X., Palefsky J.M., Doudna J.A. (2018) CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science.* **360**(6387), 436–439.
52. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I.M., Cox D.B.T., Shmakov S., Makarova K.S., Semenova E., Minakhin L., Severinov K., Regev A., Lander E.S., Koonin E.V., Zhang F. (2016) C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science.* **353**(6299), 557–558.
53. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Essletzbichler P., Han S., Joung J., Belanto J.J., Verdine V., Cox D.B.T., Kellner M.J., Regev A., Lander E.S., Voytas D.F., Ting A.Y., Zhang F. (2017) RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature.* **550**(7675), 280–284.
54. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., Joung J., Collins J.J., Zhang F. (2018) Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a and Csm6. *Science.* **360**(3687), 439–444.
55. Kellner M.J., Koob J.G., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Zhang F. (2019) SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat. Protoc.* **14**, 2986–3012.
56. Freije C.A., Sabeti P.C. (2021) Detect and destroy: CRISPR-based technologies for the response against viruses. *Cell Host Microbe.* **29**(5), 689–703.
57. Altae-Tran H., Kannan S., Demircioglu F.E., Oshiro R., Nety S.P., McKay L.J., Dlakić M., Inskeep W.P., Makarova K.S., Macrae R.K., Koonin E.V., Zhang F. (2021) The widespread IS200/IS605 transposon family encodes diverse programmable RNA-guided endonucleases. *Science.* **374**(6563), 57–65.
58. Karvelis T., Druteika G., Bigelyte G., Budre K., Zedaveinyte R., Silanskas A., Kazlauskas D., Venclovas Č., Siksnys V. (2021) Transposon-associated TnpB is a programmable RNA-guided DNA endonuclease. *Nature.* **599**(7886), 692–696.
59. Makarova K.S., Wolf Y.I., van der Oost J., Koonin E.V. (2009) Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol. Direct.* **4**, 29.
60. Ryazansky S., Kulbachinskiy A., Aravin A.A. (2018) The expanded universe of prokaryotic Argonaute proteins. *MBio.* **9**(6), e01935–18.
61. Swarts D.C., Makarova K., Wang Y., Nakanishi K., Ketting R.F., Koonin E.V., Patel D.J., van der Oost J. (2014) The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**(9), 743–753.
62. Baulcombe D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature.* **431**(7006), 356–363.
63. Miesen P., Joosten J., van Rij R.P. (2016) PIWIs go viral: arbovirus-derived piRNAs in vector mosquitoes. *PLoS Pathog.* **12**(12), e1006017.
64. Miesen P., Ivens A., Buck A.H., van Rij R.P. (2016) Small RNA profiling in dengue virus 2-infected *Aedes* mosquito cells reveals viral piRNAs and novel host miRNAs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**(2), e0004452.
65. Mussabekova A., Daeffler L., Imler J.L. (2017) Innate and intrinsic antiviral immunity in *Drosophila*. *Cell Mol. Life Sci.* **74**(1), 2039–2054.
66. Pumplin N., Voinnet O. (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**(11), 745–760.
67. Hammond S.M., Boettcher S., Caudy A.A., Kobayashi R., Hannon G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science.* **293**(5532), 1146–1150.
68. Meister G. (2013) Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* **14**(7), 447–459.
69. Aravin A., Gaidatzis D., Pfeffer S., Lagos-Quintana M., Landgraf P., Iovino N., Morris P., Brownstein M.J., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Chien M., Russo J.J., Ju J., Sheridan R., Sander C., Zavolan M., Tuschl T. (2006) A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature.* **442**(7099), 203–207.
70. Brennecke J., Aravin A.A., Stark A., Dus M., Kellis M., Sachidanandam R., Hannon G.J. (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell.* **128**(6), 1089–1103.
71. Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Lührmann R., Tuschl T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* **110**(5), 563–574.
72. Moazed D. (2009) Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature.* **457**(7228), 413–420.
73. Pratt A.J., MacRae I.J. (2009) The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J. Biol. Chem.* **284**(27), 17897–17901.
74. Hutvagner G., Simard M.J. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**(1), 22–32.
75. Tolia N.H., Joshua-Tor L. (2007) Slicer and the Argonautes. *Nat. Chem. Biol.* **3**(1), 36–43.

76. Vaucheret H. (2008) Plant Argonautes. *Trends Plant Sci.* **13**(7), 350–358.
77. Aravin A.A., Naumova N.M., Tulin A.V., Vagin V.V., Rozovsky Y.M., Gvozdev V.A. (2001) Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr. Biol.* **11**(13), 1017–1027.
78. Girard A., Sachidanandam R., Hannon G.J., Carmell M.A. (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature.* **442**(7099), 199–202.
79. Lau N.C., Seto A.G., Kim J., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Bartel D.P., Kingston R.E. (2006) Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science.* **313**(5785), 363–367.
80. Ma X., Zuo Z., Shao W., Jin Y., Meng Y. (2018) The expanding roles of Argonautes: RNA interference, splicing and beyond. *Brief Funct. Genomics.* **17**(3), 191–197.
81. Ghildiyal M., Zamore P.D. (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **10**(2), 94–108.
82. Liu W., Duttke S.H., Hetzel J., Groth M., Feng S., Gallego-Bartolome J., Zhong Z., Kuo H.Y., Wang Z., Zhai J., Chory J., Jacobsen S.E. (2018) RNA-directed DNA methylation involves co-transcriptional small RNA-guided slicing of Pol V transcripts in *Arabidopsis*. *Nat. Plants.* **4**(3), 181–188.
83. Olina A.V., Kulbachinskiy A.V., Aravin A.A., Esyunina D.M. (2018) Argonaute proteins and mechanisms of RNA interference in eukaryotes and prokaryotes. *Biochemistry (Mosc.)*. **83**(5), 483–497.
84. Pezic D., Manakov S.A., Sachidanandam R., Aravin A.A. (2014) piRNA pathway targets active LINE1 elements to establish the repressive H3K9me3 mark in germ cells. *Genes Dev.* **28**(13), 1410–1428.
85. Verdel A., Jia S., Gerber S., Sugiyama T., Gygi S., Grewal S.I.S., Moazed D. (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science.* **303**(5658), 672–676.
86. Ameres S.L., Martinez J., Schroeder R. (2007) Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell.* **130**(1), 101–112.
87. Aravin A.A., Klenov M.S., Vagin V.V., Bantignies F., Cavalli G., Gvozdev V.A. (2004) Dissection of a natural RNA silencing process in the *Drosophila melanogaster* germ line. *Mol. Cell Biol.* **24**(15), 6742–6750.
88. Denli A.M., Tops B.B.J., Plasterk R.H.A., Ketting R.F., Hannon G.J. (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* **432**(7014), 231–235.
89. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Rådmark O., Kim S., Kim V.N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* **425**(6956), 415–419.
90. Vagin V.V., Sigova A., Li C., Seitz H., Gvozdev V., Zamore P.D. (2006) A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science.* **313**(5785), 320–324.
91. Förstemann K., Horwich M.D., Wee L.M., Tomari Y., Zamore P.D. (2007) *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell.* **130**(2), 287–297.
92. Jinek M., Doudna J.A. (2009) A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature.* **457**(7228), 405–412.
93. Tomari Y., Du T., Zamore P.D. (2007) Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell.* **130**(2), 299–308.
94. Le Thomas A., Rogers A.K., Webster A., Marinov G.K., Liao S.E., Perkins E.M., Hur J.K., Aravin A.A., Tóth K.F. (2013) Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state. *Genes Dev.* **27**(4), 390–399.
95. Sienski G., Dönertas D., Brennecke J. (2012) Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell.* **151**(5), 964–980.
96. Czech B., Munafò M., Ciabrelli F., Eastwood E.L., Fabry M.H., Kneuss E., Hannon G.J. (2018) piRNA-guided genome defense: from biogenesis to silencing. *Annu. Rev. Genet.* **52**, 131–157.
97. Webster A., Li S., Hur J.K., Wachsmuth M., Bois J.S., Perkins E.M., Patel D.J., Aravin A.A. (2015) Aub and Ago3 are recruited to nuage through two mechanisms to form a ping-pong complex assembled by Krimper. *Mol. Cell.* **59**(4), 564–575.
98. Bhattacharjee S., Roche B., Martienssen R.A. (2019) RNA-induced initiation of transcriptional silencing (RITS) complex structure and function. *RNA Biol.* **16**(9), 1133–1146.
99. Elkayam E., Kuhn C.D., Tocilj A., Haase A.D., Greene E.M., Hannon G.J., Joshua-Tor L. (2012) The structure of human Argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell.* **150**(1), 100–110.
100. Wang Y., Juranek S., Li H., Sheng G., Tuschl T., Patel D.J. (2008) Structure of an Argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature.* **456**(7224), 921–926.
101. Willkomm S., Oellig C.A., Zander A., Restle T., Keegan R., Grohmann D., Schneider S. (2017) Structural and mechanistic insights into an archaeal DNA-guided Argonaute protein. *Nat. Microbiol.* **2**, 17035.
102. Nakanishi K., Weinberg D.E., Bartel D.P., Patel D.J. (2012) Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature.* **486**(7403), 368–374.
103. Matsumoto N., Nishimasu H., Sakakibara K., Nishida K.M., Hirano T., Ishitani R., Siomi H., Siomi M.C., Nureki O. (2016) Crystal structure of silkworm PIWI-clade Argonaute Siwi bound to piRNA. *Cell.* **167**(2), 484–497. e9.
104. Schirle N.T., Sheu-Gruttadauria J., Chandradoss S.D., Joo C., MacRae I.J. (2015) Water-mediated recognition of t1-adenosine anchors Argonaute2 to microRNA targets. *eLife.* **4**, e07646.
105. Koonin E.V. (2017) Evolution of RNA- and DNA-guided antiviral defense systems in prokaryotes and eukaryotes: common ancestry vs convergence. *Biol. Direct.* **12**(1), 5.
106. Wang Y., Sheng G., Juranek S., Tuschl T., Patel D.J. (2008) Structure of the guide-strand-containing Argonaute silencing complex. *Nature.* **456**(7219), 209–213.

107. Willkomm S., Zander A., Grohmann D., Restle T. (2016) Mechanistic insights into archaeal and human Argonaute substrate binding and cleavage properties. *PLoS One*. **11**(10), e0164695.
108. Kwak P.B., Tomari Y. (2012) The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**(2), 145–151.
109. Parker J.S., Roe S.M., Barford D. (2004) Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J.* **23**(24), 4727–4737.
110. Ma J.B., Yuan Y.R., Meister G., Pei Y., Tuschl T., Patel D.J. (2005) Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*. **434**(7033), 666–670.
111. Parker J.S., Roe S.M., Barford D. (2005) Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*. **434**(7033), 663–666.
112. Parker J.S., Parizotto E.A., Wang M., Roe S.M., Barford D. (2009) Enhancement of the seed-target recognition step in RNA silencing by a PIWI/MID domain protein. *Mol. Cell*. **33**(2), 204–214.
113. Yuan Y.R., Pei Y., Ma J.B., Kuryavii V., Zhadina M., Meister G., Chen H.Y., Dauter Z., Tuschl T., Patel D.J. (2005) Crystal structure of *A. aeolicus* Argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol. Cell*. **19**(3), 405–419.
114. Yuan Y.R., Pei Y., Chen H.Y., Tuschl T., Patel D.J. (2006) A potential protein-RNA recognition event along the RISC-loading pathway from the structure of *A. aeolicus* Argonaute with externally bound siRNA. *Structure*. **14**(10), 1557–1565.
115. Rashid U.J., Paterok D., Koglin A., Gohlke H., Piehler J., Chen J.C.H. (2007) Structure of *Aquifex aeolicus* Argonaute highlights conformational flexibility of the PAZ domain as a potential regulator of RNA-induced silencing complex function. *J. Biol. Chem.* **282**(18), 13824–13832.
116. Kuzmenko A., Oguienko A., Esyunina D., Yudin D., Petrova M., Kudinova A., Maslova O., Ninova M., Ryazansky S., Leach D., Aravin A.A., Kulbachinskiy A. (2020) DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease. *Nature*. **587**(7835), 632–637.
117. Katoh K., Standley D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**(4), 772–780.
118. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**(1), 268–274.
119. Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. (2018) UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* **35**(2), 518–522.
120. Kalyanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermini L.S. (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*. **14**(6), 587–589.
121. Hegge J.W., Swarts D.C., Chandradoss S.D., Cui T.J., Kneppers J., Jinek M., Joo C., van der Oost J. (2019) DNA-guided DNA cleavage at moderate temperatures by *Clostridium butyricum* Argonaute. *Nucleic Acids Res.* **47**(11), 5809–5821.
122. Kuzmenko A., Yudin D., Ryazansky S., Kulbachinskiy A., Aravin A.A. (2019) Programmable DNA cleavage by Ago nucleases from mesophilic bacteria *Clostridium butyricum* and *Limnithrix rosea*. *Nucleic Acids Res.* **47**(11), 5822–5836.
123. García-Quintans N., Bowden L., Berenguer J., Mencia M. (2019) DNA interference by a mesophilic Argonaute protein, CbcAgo. *F1000Res*. **8**, 321
124. Cao Y., Sun W., Wang J., Sheng G., Xiang G., Zhang T., Shi W., Li C., Wang Y., Zhao F., Wang H. (2019) Argonaute proteins from human gastrointestinal bacteria catalyze DNA-guided cleavage of single- and double-stranded DNA at 37°C. *Cell Discov.* **5**, 38.
125. Guo X., Sun Y., Chen L., Huang F., Liu Q., Feng Y. (2021) A hyperthermophilic Argonaute from *Ferroglobus placidus* with specificity on guide binding pattern. *Front. Microbiol.* **12**, 654345.
126. Kropocheva E., Kuzmenko A., Aravin A.A., Esyunina D., Kulbachinskiy A. (2021) A programmable pAgo nuclease with universal guide and target specificity from the mesophilic bacterium *Kurthia massiliensis*. *Nucleic Acids Res.* **49**(7), 4054–4065.
127. Liu Y., Li W., Jiang X., Wang Y., Zhang Z., Liu Q., He R., Chen Q., Yang J., Wang L., Wang F., Ma L. (2021) A programmable omnipotent Argonaute nuclease from mesophilic bacteria *Kurthia massiliensis*. *Nucleic Acids Res.* **49**(2), 1597–1608.
128. Chong Y., Liu Q., Huang F., Song D., Feng Y. (2019) Characterization of a recombinant thermotolerant Argonaute protein as an endonuclease by broad guide utilization. *Bioresour. Bioprocess.* **6**(1), 21.
129. Doxzen K.W., Doudna J.A. (2017) DNA recognition by an RNA-guided bacterial Argonaute. *PLoS One*. **12**(5), e0177097.
130. Kaya E., Doxzen K.W., Knoll K.R., Wilson R.C., Strutt S.C., Kranzusch P.J., Doudna J.A. (2016) A bacterial Argonaute with noncanonical guide RNA specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**(15), 4057–4062.
131. Lapinaite A., Doudna J.A., Cate J.H.D. (2018) Programmable RNA recognition using a CRISPR-associated Argonaute. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115**(13), 3368–3373.
132. Zander A., Willkomm S., Ofer S., van Wolferen M., Egert L., Buchmeier S., Stöckl S., Tinnefeld P., Schneider S., Klingl A., Albers S.V., Werner F., Grohmann D. (2017) Guide-independent DNA cleavage by archaeal Argonaute from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Nat. Microbiol.* **2**, 17034.
133. Zander A., Holzmeister P., Klose D., Tinnefeld P., Grohmann D. (2014) Single-molecule FRET supports the two-state model of Argonaute action. *RNA Biol.* **11**(1), 45–56.
134. Fu L., Xie C., Jin Z., Tu Z., Han L., Jin M., Xiang Y., Zhang A. (2019) The prokaryotic Argonaute proteins enhance homology sequence-directed recombination in bacteria. *Nucleic Acids Res.* **47**(7), 3568–3579.
135. O'Geen H., Ren C., Coggins N.B., Bates S.L., Segal D.J. (2018) Unexpected binding behaviors of

- bacterial Argonautes in human cells cast doubts on their use as targetable gene regulators. *PLoS One*. **13**, e0193818.
136. Lao Y.H., Li M., Gao M.A., Shao D., Chi C.W., Huang D., Chakraborty S., Ho T.C., Jiang W., Wang H.X., Wang S., Leong K.W. (2018) HPV oncogene manipulation using nonvirally delivered CRISPR/Cas9 or *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Adv. Sci.* **5**(7), 1700540.
  137. Qi J., Dong Z., Shi Y., Wang X., Qin Y., Wang Y., Liu D. (2016) NgAgo-based *fabp11a* gene knockdown causes eye developmental defects in zebrafish. *Cell Res.* **26**(12), 1349–1352.
  138. Wu Z., Tan S., Xu L., Gao L., Zhu H., Ma C., Liang X. (2017) NgAgo-gDNA system efficiently suppresses hepatitis B virus replication through accelerating decay of pregenomic RNA. *Antiviral. Res.* **145**, 20–23.
  139. Rivas F.V., Tolia N.H., Song J.J., Aragon J.P., Liu J., Hannon G.J., Joshua-Tor L. (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**(4), 340–349.
  140. Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J., Joshua-Tor L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. **305**(5689), 1434–1437.
  141. Swarts D.C., Hegge J.W., Hinojo I., Shiimori M., Ellis M.A., Dumrongkulraksa J., Terns R.M., Terns M.P., van der Oost J. (2015) Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA. *Nucleic Acids Res.* **43**(10), 5120–5129.
  142. Olina A., Kuzmenko A., Ninova M., Aravin A.A., Kulbachinskiy A., Esyunina D. (2020) Genome-wide DNA sampling by Ago nuclease from the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *RNA Biol.* **17**(5), 677–688.
  143. Hunt E.A., Evans T.C.Jr., Tanner N.A. (2018) Single-stranded binding proteins and helicase enhance the activity of prokaryotic Argonautes *in vitro*. *PLoS One*. **13**, e0203073.
  144. Sheng G., Zhao H., Wang J., Rao Y., Tian W., Swarts D.C., van der Oost J., Patel D.J., Wang Y. (2014) Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**(2), 652–657.
  145. Swarts D.C., Szczepaniak M., Sheng G., Chandradoss S.D., Zhu Y., Timmers E.M., Zhang Y., Zhao H., Lou J., Wang Y., Joo C., van der Oost J. (2017) Autonomous generation and loading of DNA guides by bacterial Argonaute. *Mol. Cell.* **65**(6), 985–998.
  146. Swarts D.C., Jore M.M., Westra E.R., Zhu Y., Janssen J.H., Snijders A.P., Wang Y., Patel D.J., Berenguer J., Brouns S.J.J., van der Oost J. (2014) DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature*. **507**(7491), 258–261.
  147. Swarts D.C., Koehorst J.J., Westra E.R., Schaap P.J., van der Oost J. (2015) Effects of Argonaute on gene expression in *Thermus thermophilus*. *PLoS One*. **10**, e0124880.
  148. Wang Y., Juranek S., Li H., Sheng G., Wardle G.S., Tuschl T., Patel D.J. (2009) Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature*. **461**(7265), 754–761.
  149. Jolly S.M., Gainetdinov I., Jouravleva K., Zhang H., Strittmatter L., Bailey S.M., Hendricks G.M., Dhabaria A., Ueberheide B., Zamore P.D. (2020) *Thermus thermophilus* Argonaute functions in the completion of DNA replication. *Cell*. **182**(6), 1545–1559.
  150. Park J.H., Shin S.Y., Shin C. (2017) Non-canonical targets destabilize microRNAs in human Argonautes. *Nucleic Acids Res.* **45**(4), 1569–1583.
  151. Salomon W.E., Jolly S.M., Moore M.J., Zamore P.D., Serebrov V. (2015) Single-molecule imaging reveals that Argonaute reshapes the binding properties of its nucleic acid guides. *Cell*. **162**(1), 84–95.
  152. Schirle N.T., Sheu-Gruttadauria J., MacRae I.J. (2014) Structural basis for microRNA targeting. *Science*. **346**(6209), 608–613.
  153. Dayeh D.M., Cantara W.A., Kitzrow J.P., Musier-Forsyth K., Nakanishi K. (2018) Argonaute-based programmable RNase as a tool for cleavage of highly-structured RNA. *Nucleic Acids Res.* **46**(16), e98.
  154. Anzeler T.A., Chowdhury S., Hughes S.M., Xiao Y., Lander G.C., MacRae I.J. (2021) Structural basis for piRNA targeting. *Nature*. **597**(7875), 285–289.
  155. Nishida K.M., Iwasaki Y.W., Murota Y., Nagao A., Mannen T., Kato Y., Siomi H., Siomi M.C. (2015) Respective functions of two distinct Siwi complexes assembled during PIWI-interacting RNA biogenesis in *Bombyx* germ cells. *Cell Rep.* **10**(2), 193–203.
  156. Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G., Tuschl T. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell.* **15**(2), 185–197.
  157. Schalk C., Cognat V., Graindorge S., Vincent T., Voinnet O., Molinier J. (2017) Small RNA-mediated repair of UV-induced DNA lesions by the DNA DAMAGE-BINDING PROTEIN 2 and ARGONAUTE 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**(14), 2965–2975.
  158. Liu Y., Esyunina D., Olovnikov I., Teplova M., Kulbachinskiy A., Aravin A.A., Patel D.J. (2018) Accommodation of helical imperfections in *Rhodobacter sphaeroides* Argonaute ternary complexes with guide RNA and target DNA. *Cell Rep.* **24**(2), 453–462.
  159. Olovnikov I., Chan K., Sachidanandam R., Newman D.K., Aravin A.A. (2013) Bacterial Argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Mol. Cell.* **51**(5), 594–605.
  160. Globyte V., Kim S.H., Joo C. (2018) Single-molecule view of small RNA-guided target search and recognition. *Annu. Rev. Biophys.* **47**, 569–593.
  161. Klum S.M., Chandradoss S.D., Schirle N.T., Joo C., MacRae I.J. (2018) Helix-7 in Argonaute2 shapes the microRNA seed region for rapid target recognition. *EMBO J.* **37**(1), 75–88.
  162. Sheu-Gruttadauria J., MacRae I.J. (2017) Structural foundations of RNA silencing by Argonaute. *J. Mol. Biol.* **429**(17), 2619–2639.



163. Wee L.M., Flores-Jasso C.F., Salomon W.E., Zamore P.D. (2012) Argonaute divides its RNA guide into domains with distinct functions and RNA-binding properties. *Cell*. **151**(15), 1055–1067.
164. Willkomm S., Makarova K.S., Grohmann D. (2018) DNA silencing by prokaryotic Argonaute proteins adds a new layer of defense against invading nucleic acids. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**(3), 376–387.
165. Hur J.K., Zinchenko M.K., Djuranovic S., Green R. (2013) Regulation of Argonaute slicer activity by guide RNA 3' end interactions with the N-terminal lobe. *J. Biol. Chem.* **288**(11), 7829–7840.
166. Jung S.R., Kim E., Hwang W., Shin S., Song J.J., Hohng S. (2013) Dynamic anchoring of the 3'-end of the guide strand controls the target dissociation of Argonaute-guide complex. *J. Am. Chem. Soc.* **135**(45), 16865–16871.
167. Dahlgren C., Zhang H.Y., Du Q., Grahn M., Norstedt G., Wahlestedt C., Liang Z. (2008) Analysis of siRNA specificity on targets with double-nucleotide mismatches. *Nucleic Acids Res.* **36**(9), e53.
168. Lisitskaya L., Aravin A.A., Kulbachinskiy A. (2018) DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins. *Nat. Commun.* **9**(1), 5165.
169. Sheng G., Gogakos T., Wang J., Zhao H., Serganov A., Juranek S., Tuschl T., Patel D.J., Wang Y. (2017) Structure/cleavage-based insights into helical perturbations at bulge sites within *T. thermophilus* Argonaute silencing complexes. *Nucleic Acids Res.* **45**(15), 9149–9163.
170. Tal N., Sorek R. (2022) SnapShot: bacterial immunity. *Cell*. **185**(3), 578.
171. Payne L.J., Todeschini T.C., Wu Y., Perry B.J., Ronson C.W., Fineran P.C., Nobrega F.L., Jackson S.A. (2021) Identification and classification of antiviral defence systems in bacteria and archaea with PADLOC reveals new system types. *Nucleic Acids Res.* **49**(19), 10868–10878.
172. Tesson F., Hervé A., Mordret E., Touchon M., D'Humières C., Cury J., Bernheim A. (2022) Systematic and quantitative view of the antiviral arsenal of prokaryotes. *Nat. Commun.* **13**(1), 2561.
173. Rocha E.P.C., Bikard D. (2022) Microbial defenses against mobile genetic elements and viruses: who defends whom from what? *PLoS Biol.* **20**, e3001514.
174. Noto M.J., Kreiswirth B.N., Monk A.B., Archer G.L. (2008) Gene acquisition at the insertion site for SCCmec, the genomic island conferring methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **190**(4), 1276–1283.
175. Doron S., Melamed S., Ofir G., Leavitt A., Lopatina A., Keren M., Amitai G., Sorek R. (2018) Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*. **359**(6379), 1008–1009.
176. Rousset F., Depardieu F., Miele S., Dowding J., Laval A.-L., Lieberman E., Garry D., Rocha E.P.C., Bernheim A., Bikard D. (2022) Phages and their satellites encode hotspots of antiviral systems. *Cell Host Microbe*. **30**(5), 740–753. e5.
177. Ka D., Oh H., Park E., Kim J.H., Bae E. (2020) Structural and functional evidence of bacterial anti-phage protection by Thoeris defense system via NAD<sup>+</sup> degradation. *Nat. Commun.* **11**(1), 28–16.
178. Ofir G., Herbst E., Baroz M., Cohen D., Millman A., Doron S., Tal N., Malheiro D.B.A., Malitsky S., Amitai G., Sorek R. (2021) Antiviral activity of bacterial TIR domains via signaling molecules that trigger cell death. *Nature*. **600**(7887), 116–120.
179. Koopal B., Potocnik A., Mutte S.K., Aparicio-Maldonado C., Lindhoud S., Vervoort J.J.M., Brouns S.J.J., Swarts D.C. (2022) Short prokaryotic Argonaute systems trigger cell death upon detection of invading DNA. *Cell*. **185**(9), 1471–1486.
180. He R., Wang L., Wang F., Li W., Liu Y., Li A., Wang Y., Mao W., Zhai C., Ma L. (2019) *Pyrococcus furiosus* Argonaute-mediated nucleic acid detection. *Chem. Commun. (Camb.)*. **55**(88), 13219–13222.
181. Wang L., He R., Lv B., Yu X., Liu Y., Yang J., Li W., Wang Y., Zhang H., Yan G., Mao W., Liu L., Wang F., Ma L. (2021) *Pyrococcus furiosus* Argonaute coupled with modified ligase chain reaction for detection of SARS-CoV-2 and HPV. *Talanta*. **227**, 122154.
182. Xiao G., Fu X., Zhang J., Liu S., Wang Z., Ye T., Zhang G. (2021) Rapid and cost-effective screening of CRISPR/Cas9-induced mutants by DNA-guided Argonaute nuclease. *Biotechnol. Lett.* **43**(11), 2105–2110.
183. Song J., Hegge J.W., Mauk M.G., Chen J., Till J.E., Bhagwat N., Azink L.T., Peng J., Sen M., Mays J., Carpenter E.L., van der Oost J., Bau H.H. (2020) Highly specific enrichment of rare nucleic acid fractions using *Thermus thermophilus* Argonaute with applications in cancer diagnostics. *Nucleic Acids Res.* **48**(4), e19.
184. Shin S., Jung Y., Uhm H., Song M., Son S., Goo J., Jeong C., Song J.-J., Kim V.N., Hohng S. (2020) Quantification of purified endogenous miRNAs with high sensitivity and specificity. *Nat. Commun.* **11**(1), 6033.
185. Enghiad B., Zhao H. (2017) Programmable DNA-guided artificial restriction enzymes. *ACS Synth. Biol.* **6**(5), 752–757.
186. Hunt E.A., Tamanaha E., Bonanno K., Cantor E.J., Tanner N.A. (2021) Profiling *Thermus thermophilus* Argonaute guide DNA sequence preferences by functional screening. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 670940.
187. Wang F., Yang J., He R., Yu X., Chen S., Liu Y., Wang L., Li A., Liu L., Zhai C., Ma L. (2021) PflA-based detection of SARS-CoV-2. *Biosens. Bioelectron.* **177**, 112932.
188. Filius M., Cui T.J., Ananth A.N., Docter M.W., Hegge J.W., van der Oost J., Joo C. (2020) High-speed super-resolution imaging using protein-assisted DNA-PAINT. *Nano Lett.* **20**(4), 2264–2270.
189. Gao F., Shen X.Z., Jiang F., Wu Y., Han C. (2016) DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nat. Biotechnol.* **34**(7), 768–773.
190. Hegge J.W., Swarts D.C., van der Oost J. (2018) Prokaryotic argonaute proteins: novel genome-editing tools? *Nat. Rev. Microbiol.* **16**(1), 5–11.
191. Burgess S., Cheng L., Gu F., Huang J., Huang Z., Lin S., Li J., Li W., Qin W., Sun Y., Songyang Z., Wei W., Wu Q., Wang H., Wang X., Xiong J.W., Xi J.,

- Yang H., Zhou B., Zhang B. (2016) Questions about NgAgo. *Protein Cell*. **7**(12), 913–915.
192. Lee S., Turchiano G., Ata H., Nowsheen S., Romito M., Lou Z., Ryu S.M., Ekker S.C., Cathomen T., Kim J.S. (2016) Failure to detect DNA-guided genome editing using *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nat. Biotechnol.* **35**(1), 17–18.
193. Cai M., Si Y., Zhang J., Tian Z., Du S. (2018) Zebrafish embryonic slow muscle is a rapid system for genetic analysis of sarcomere organization by CRISPR/Cas9, but not NgAgo. *Mar. Biotechnol.* **20**(2), 168–181.
194. Khin N.C., Lowe J.L., Jensen L.M., Burgio G. (2017) No evidence for genome editing in mouse zygotes and HEK293T human cell line using the DNA-guided *Natronobacterium gregoryi* Argonaute (NgAgo). *PLoS One*. **12**(6), e0178768.
195. Lee K.Z., Mechikoff M.A., Kikla A., Liu A., Pandolfi P., Fitzgerald K., Gimble F.S., Solomon K.V. (2021) NgAgo possesses guided DNA nicking activity. *Nucleic Acids Res.* **49**(17), 9926–9937.
196. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. **533**(7603), 420–424.
197. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., Liu D.R. (2017) Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. **551**(7681), 464–471.
198. Waryah C.B., Moses C., Arooj M., Blancafort P. (2018) Zinc fingers, TALEs, and CRISPR systems: a comparison of tools for epigenome editing. *Methods Mol. Biol.* **1767**, 19–63.
199. Morgan S.L., Mariano N.C., Bermudez A., Arruda N.L., Wu F., Luo Y., Shankar G., Jia L., Chen H., Hu J.F., Hoffman A.R., Huang C.C., Pitteri S.J., Wang K.C. (2017) Manipulation of nuclear architecture through CRISPR-mediated chromosomal looping. *Nat. Commun.* **8**, 15993.
200. Pederson T. (2014) Repeated TALEs: visualizing DNA sequence localization and chromosome dynamics in live cells. *Nucleus*. **5**(1), 28–31.
201. Rauch S., He C., Dickinson B.C. (2018) Targeted m6A reader proteins to study epitranscriptomic regulation of single RNAs. *J. Am. Chem. Soc.* **140**(38), 11974–11981.
202. Cox D.B.T., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Franklin B., Kellner M.J., Joung J., Zhang F. (2017) RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*. **358**(6366), 1019–1027.
203. Konermann S., Lotfy P., Brideau N.J., Oki J., Shokhirev M.N., Hsu P.D. (2018) Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*. **173**(3), 665–676.

## Procaryotic Argonaute Proteins as a Tool for Biotechnology

E. V. Kropocheva<sup>1</sup>, L. A. Lisitskaya<sup>1</sup>, A. A. Agapov<sup>1</sup>, A. A. Musabirov<sup>1</sup>,  
A. V. Kulbachinskiy<sup>1</sup>, and D. M. Esyunina<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Institute of Molecular Genetics of National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

\*e-mail: es\_dar@inbox.ru

Programmable nucleases are the most important tool for targeted manipulations with the genes and genomes of both prokaryotes and eukaryotes. Since the end of the 20th century, many approaches have been developed for specific modification of the genome. The review briefly considers the advantages and disadvantages of the main genetic editors known to date. The main attention is paid to programmable nucleases from the family of procaryotic Argonaute proteins. Argonaute proteins can recognize and cleave DNA sequences using small complementary guide molecules and play an important role in protecting prokaryotic cells from invading DNA. Argonaute proteins have already found applications in biotechnology for targeted cleavage and detection of nucleic acids and can potentially be used for genome editing.

**Keywords:** programmable nucleases, Argonaute proteins, guide DNA, biosensors, genome editing