

На правах рукописи

ПРОХОРОВА ДАРЬЯ ВАДИМОВНА

**ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ
В СОСТАВЕ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК
НА АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9**

1.5.4 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Научный руководитель:

Степанов Григорий Александрович, к.х.н.

Официальные оппоненты:

Малыгин Алексей Аркадьевич, д.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, зав. лабораторией.

Баттулин Нариман Рашитович, к.б.н., Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, зав. лабораторией.

Готтих Марина Борисовна, д.х.н., профессор, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, г.н.с.

Защита состоится «28» февраля 2025 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01. при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru.

Автореферат разослан «25» декабря 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

к.х.н.



П.Е. Пестряков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Системы редактирования генома представляют большой интерес для биомедицинских исследований, поскольку позволяют напрямую манипулировать практически любым геном в различных типах клеток и организмах. Ранние методы генерации двунитевых разрывов в ДНК основаны на системах белков. Среди них наиболее известны системы нуклеаз цинковых пальцев ZFN и эффекторных нуклеаз TALEN. Однако, открытая в 1987 году система CRISPR/Cas стала простой и эффективной альтернативой данным системам.

В настоящее время технологии CRISPR/Cas применяют для направленного подавления заранее заданных генов, изменения эпигенетического профиля, проведения полногеномного скрининга и визуализации хромосом. Данные платформы позволяют исследовать функцию нескольких генов одновременно, синхронно воздействуя на несколько геномных локусов в одном эксперименте. Несмотря на все преимущества и перспективы использования систем CRISPR/Cas существуют некоторые препятствия внедрения технологии геномного редактирования в практику. Проблема возникновения нецелевых эффектов при редактировании системами CRISPR/Cas считается одной из основных. Перспективным подходом к её решению является разработка новых структур эффективных модифицированных направляющих РНК.

Поиск новых модификаций направляющих РНК остается актуальной и важной задачей на сегодняшний день, поскольку может обеспечить высокую эффективность редактирования генов-мишеней при минимизации клеточной токсичности и нецелевых эффектов системы CRISPR/Cas.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось исследование влияния модифицированных нуклеотидных остатков и остатков дезоксирибонуклеотидов с фосфорилгуанидиновыми (ФГ) группами в структуре направляющих РНК на активность системы CRISPR/Cas9.

В ходе исследования необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести анализ влияния модифицированных нуклеотидных остатков m6A, Ψ, m5C и m1Ψ, а также остатков дезоксирибонуклеотидов с ФГ-группами в составе направляющих РНК на эффективность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*;
2. Выявить эффект модифицированных нуклеотидных остатков в направляющих РНК на специфичность системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 *in vitro*;
3. Провести сравнение специфичности системы CRISPR/Cas9 при использовании химерных sgРНК, содержащих остатки дезоксирибонуклеотидов с единичными и множественными ФГ-

модификациями, с сгРНК, модифицированными тиофосфатными (PS) и 2'-F группами;

4. Исследовать способность направляющих РНК, содержащих как модифицированные нуклеотидные остатки, так и ФГ-группы поддерживать геномное редактирование в культивируемых клетках человека.

Научная новизна и практическая значимость. В рамках работы показано, что комплексы белка Cas9 с направляющими РНК, содержащими модифицированные нуклеотидные остатки, поддерживают геномное редактирование как *in vitro*, так и в культивируемых клетках человека. Кроме того, показано увеличение специфичности системы CRISPR/Cas9 при включении данных модификаций в направляющие РНК.

Впервые исследованы химерные сгРНК, содержащие остатки дезоксирибонуклеотидов с ФГ-модификациями, которые способны формировать каталитически активные комплексы с белком Cas9. Показано, что ФГ-модификации в направляющих РНК позволяют контролировать активность и значительно повышать специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. Впервые продемонстрирована принципиальная возможность применения ФГ-модифицированных химерных сгРНК для редактирования генов в клетках человека.

В данной работе впервые методом фрагментного анализа с использованием капиллярного гель-электрофореза проведена количественная оценка эффективности расщепления ДНК-субстратов комплексами белка Cas9 с модифицированными направляющими РНК. Кроме того, комбинация данного метода с выделением ДНК на магнитных частицах позволяет быстро и эффективно оценить специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro* для большого числа модифицированных направляющих РНК. Разработан протокол оценки эффективности редактирования генов в культивируемых клетках человека, включающий электропорацию системой трансфекции NeonTM и цифровую ПЦР. Цифровая ПЦР проводилась на приборе QIAcuity One (Qiagen, Германия), который обладает высокой чувствительностью и высокой скоростью проведения анализа. Данный подход позволяет обнаруживать одиночные мутации в несортированной и гетерогенной популяции клеток с использованием малого количества геномной ДНК, что упрощает исследование активности модифицированных направляющих РНК *in vivo*.

В результате исследования влияния модифицированных нуклеотидных остатков и ФГ-модификаций в направляющих РНК на активность системы CRISPR/Cas9 показано, что данные модифицированные производные являются полезным дополнением к набору инструментов редактирования генома. Перспективным направлением является использование природных и фосфорилгуанидиновых модификаций для снижения иммуногенности и цитотоксичности направляющих РНК.

Положения, выносимые на защиту:

1. Направляющие РНК, содержащие как модифицированные нуклеотидные остатки m6A, Ψ, m5C и m1Ψ, так и остатки дезоксирибонуклеотидов с фосфорилгуанидиновыми (ФГ) группами, формируют каталитически активные комплексы с белком Cas9. При включении m6A, Ψ, m5C и m1Ψ в sgРНК эффективность расщепления ДНК-субстрата является сиквенс-специфичной и зависит от последовательности спейсера. Для расщепления ДНК-субстратов при использовании ФГ-модифицированных химерных crРНК критичным является 4-ое положение ФГ-группы с 5'-конца.

2. Замена канонических нуклеотидных остатков на их модифицированные аналоги в sgРНК увеличивает специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro* до 35 раз по сравнению с немодифицированным вариантом sgРНК.

3. Включение нескольких ФГ-групп в РАМ-дистальный район химерных crРНК, за исключением 4-ого положения, позволяет повышать точность расщепления ДНК-субстратов белком Cas9 *in vitro* до 40 раз по сравнению с немодифицированной crРНК и crРНК, содержащими тиофосфатные и 2'-F модификации.

4. Направляющие РНК, содержащие как неканонические нуклеотидные остатки, так и ФГ-группы, поддерживают Cas9-опосредованное редактирование генов в культивируемых клетках человека

Публикации и апробация результатов. По результатам диссертации опубликовано 3 работы в рецензируемых научных журналах. Основные результаты работы были представлены на: FEBS Virtual Congress (онлайн участие, 2021), Всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, Россия, 2022), VII Съезде биохимиков и молекулярных биологов России (Сочи, Россия, 2022), международном конгрессе «CRISPR – 2023» (Новосибирск, Россия, 2023), молодежной школе-конференции «BioTop-2023. Достижения молодых ученых ИХБФМ СО РАН» (Новосибирск, Россия, 2023), молодежной школе-конференции «Современные вызовы структурной и синтетической биологии» (Шерегеш, Россия, 2024).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 138 страницах, включает 41 рисунок, 7 таблиц и 6 приложений. Список литературы содержит 149 библиографических источников.

Личный вклад автора. Основная часть экспериментальной работы и анализ результатов выполнены лично автором, либо с его непосредственным участием. Оценка специфичности системы CRISPR/Cas9 при использовании направляющих РНК, содержащих неканонические

природные нуклеотиды, проведена совместно с студенткой 5-го курса НГУ Толстой П.О., а при использовании химерных направляющих РНК с ФГ-группами выполнена лично автором. Совместно с Журавлевым Е.С. (лаборатория геномного редактирования ИХБФМ СО РАН) выполнена работа по определению содержания модифицированных нуклеотидных остатков в направляющих РНК и оценке эффективности расщепления с помощью фрагментного анализа. Матвеевой А.М. (лаборатория геномного редактирования ИХБФМ СО РАН) выполнена работа по культивированию клеток 293T/17 и их дальнейшая трансфекция с помощью системы Neon комплексами белка Cas9 с модифицированными направляющими РНК.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Модифицированные нуклеотидные остатки в направляющих РНК для системы CRISPR/Cas9

1.1. Оценка влияния модифицированных азотистых оснований в tracrРНК на активность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*

В данной работе для модификации направляющих РНК, были выбраны четыре мономера, которые обнаруживаются в природных типах РНК, а именно: m6A, m5C, Ψ и m1Ψ. Для оценки влияния природных модификаций на эффективность связывания направляющих РНК с белком Cas9 были получены tracrРНК, содержащие 100% модифицированных нуклеотидных остатков (Рис. 1А).

Согласно полученным данным включение m6A и m1Ψ в состав tracrРНК приводит к снижению эффективности гидролиза плазмиды. Однако для m5C и Ψ глубина гидролиза мишени сравнима с глубиной гидролиза, наблюдаемой для немодифицированной РНК (Рис. 1). Таким образом, введение модифицированных нуклеотидных остатков в состав tracrРНК в сочетании с crРНК и белком Cas9 не препятствует формированию каталитически активных комплексов и гидролизу ДНК-субстрата.

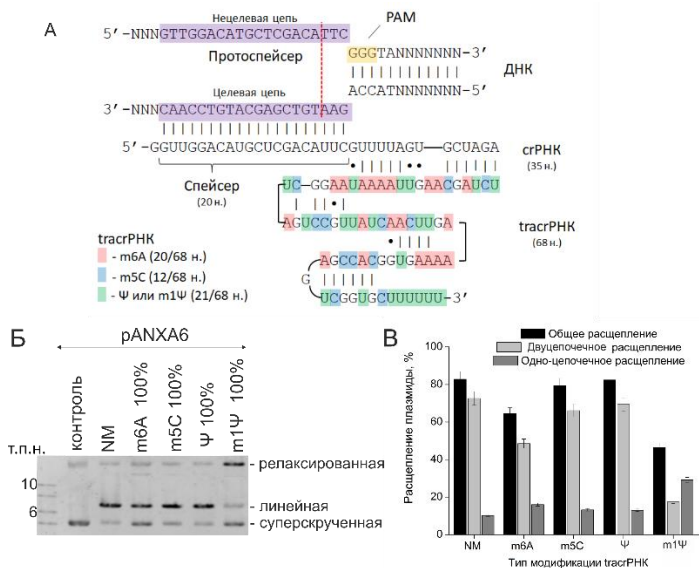


Рис. 1. Оценка гидролиза плазмиды комплексами белка Cas9 с crPHK и tracrPHK, содержащими 100% остатков m6A, m5C, Ψ и m1Ψ. А – схема взаимодействия комплекса crPHK:tracrPHK и ДНК-субстрата; Б – гидролиз плазмиды комплексами белка Cas9 с модифицированными tracrPHK и немодифицированной tracrPHK (NM); В – процент плазмиды, гидролизованной Cas9 с модифицированными tracrPHK. Показаны средние значения ± SD по трем независимым экспериментам.

1.2. Исследование кинетики модифицированных tracrPHK

Анализ кинетических кривых выявил, что 100% замена аденозина на m6A и уридина на m1Ψ в tracrPHK приводит к снижению скорости реакции расщепления для обеих цепей ДНК. Однако при увеличении времени гидролиза до 6 часов эффективность расщепления возрастает до 50% (Рис. 2А, Б). С другой стороны, m5C модификация увеличивает глубину расщепления примерно на 20% независимо от времени реакции, а включение остатков Ψ в состав tracrPHK незначительно уменьшает эффективность расщепления ДНК-субстрата по сравнению с немодифицированной tracrPHK. Оптимальными диапазонами глубины модификации для каждого модифицированного мономера в tracrPHK являются: 10–75% для m6A, 25–100% для Ψ, 10–50% для m1Ψ и весь диапазон до 100% для m5C (Рис. 2В).

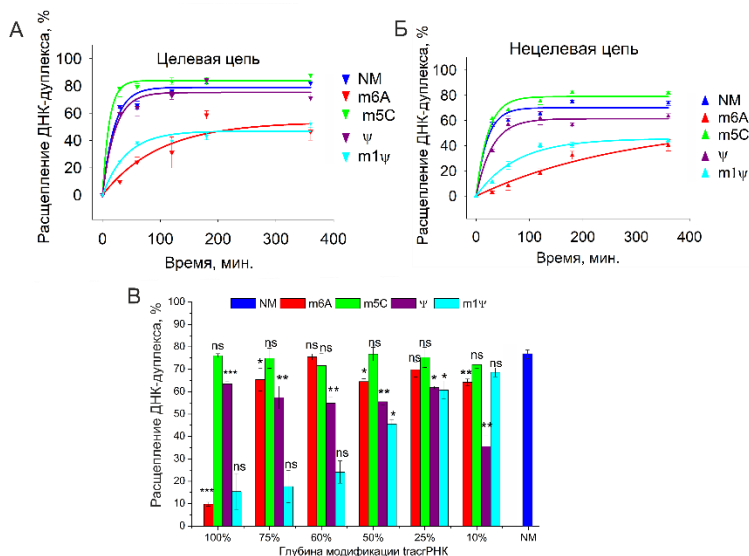


Рис. 2. Определение оптимального времени реакции и глубины модификации для модифицированных tracrRNA. А, Б – кинетика для tracrRNA, содержащих 100% остатков m6A, m5C, ψ или m1ψ, на: целевой (А) и нецелевой (Б) цепи ДНК-дуплекса; В – зависимости эффективности расщепления ДНК-дуплекса от глубины модификации tracrRNA. Данные представлены как средние значения ± SD по трем независимым экспериментам. Значения p определены при сравнении с немодифицированной tracrRNA (NM) (критерий Стьюдента: ns - незначимо, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

1.3. Оценка влияния модифицированных азотистых оснований в sgRNA на активность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*

Для оценки влияния последовательности спейсера направляющих РНК на активность системы CRISPR/Cas9 были синтезированы sgRNA с различной глубиной модифицированных нуклеотидных остатков. Согласно полученным данным расщепление плазмиды незначительно уменьшается при увеличении глубины модификации m6A или m1ψ в sgRNA с 10% до 100%, и практически не изменяется при любой глубине m5C. В случае остатков ψ только 100% модификация sgRNA значительно снижает эффективность расщепления плазмиды (Рис. 3).

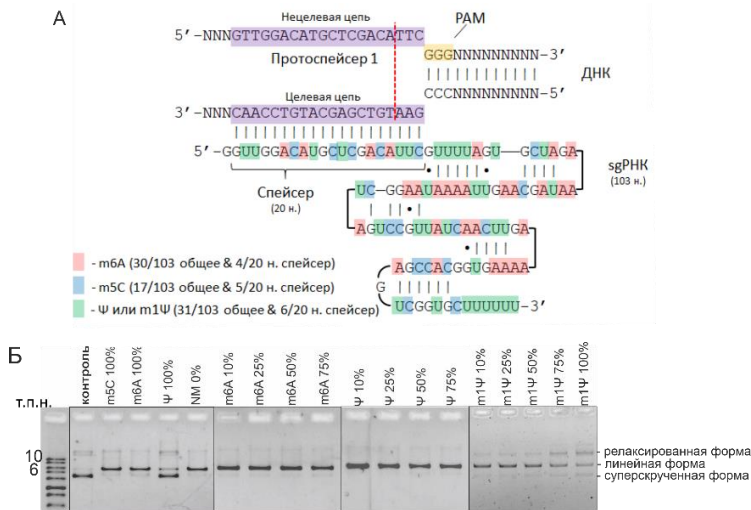


Рис. 3. sgРНК, модифицированные м6А, м5С, Ψ или m1Ψ, поддерживают расщепление плазмидного субстрата. А – схема взаимодействия sgРНК и ДНК-мишени; Б – расщепление плазмиды комплексами белка Cas9 с sgРНК, содержащими разную глубину модификации, и немодифицированной sgРНК (NM).

Изменение последовательности спейсера sgРНК выявило, что влияние модифицированных азотистых оснований обусловлено составом спейсера, особенно PAM-проксимальной областью (Рис. 4).

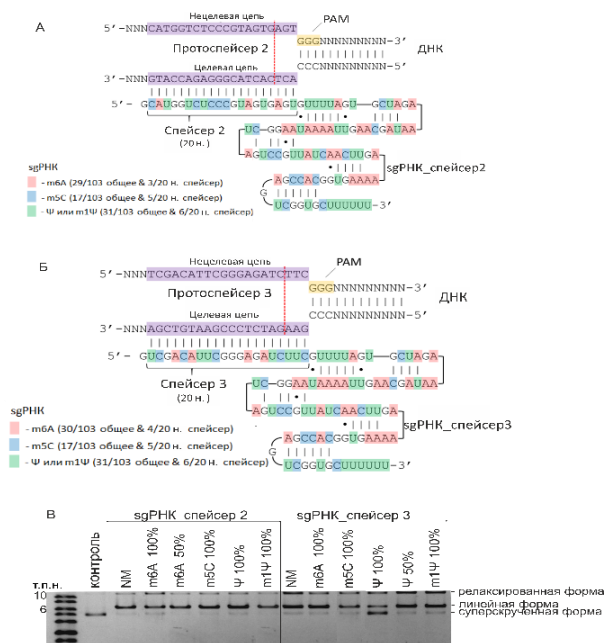


Рис. 4. Оценка влияния природной модификации в структуре sgRNA от последовательности протоспейсера плазмидного субстрата. А, Б – схема взаимодействия sgRNA и протоспейсеров 2 (А) и 3 (Б); В – расщепление плазмиды комплексами белка Cas9 с sgRNA, содержащими разную глубину модификации в спейсере 2 и 3, и немодифицированной sgRNA (NM).

1.4. Исследование кинетики модифицированных sgRNA

Анализ полученных кинетических кривых показал, что 100% замена С на m5C, А на m6A, или U на m1Ψ в sgRNA незначительно снижает расщепление ДНК-дуплексов. При этом 100% модификация спейсерной области sgRNA псевдоуридином практически ингибирует реакцию (Рис. 5А, Б). Для достижения наибольшей эффективности расщепления ДНК-субстрата была определена оптимальная глубина модификации sgRNA: до 100% остатков m5C, m6A и m1Ψ и 10–50% – Ψ (Рис. 5В). В результате оптимизация глубины модификации позволяет использовать модифицированные sgRNA в системе CRISPR/Cas9.

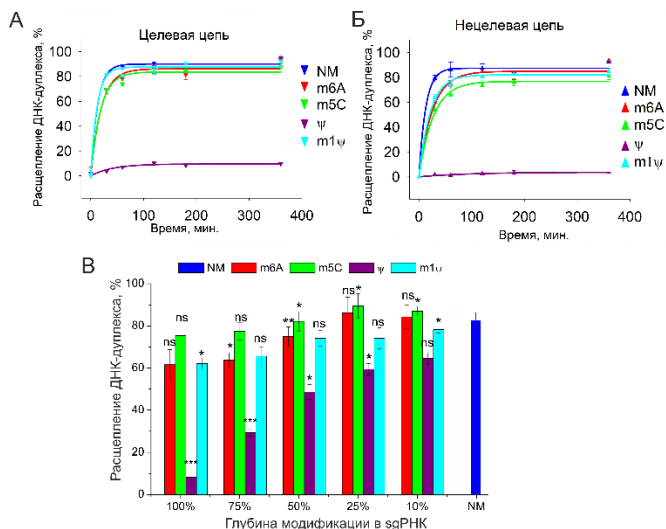


Рис. 5. Кинетика расщепления ДНК-дуплексов комплексами Cas9 с модифицированными sgРНК. А, Б – кинетические кривые для sgРНК, содержащих 100% остатков m6A, m5C, Ψ или m1Ψ на целевой (А) и нецелевой (Б) цепи ДНК-дуплекса; В – зависимости эффективности расщепления от глубины модификации sgРНК. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD по трем независимым экспериментам. Значения p определены при сравнении с немодифицированной sgРНК (NM) (критерий Стьюдента: ns- незначимо, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Таким образом, направляющие РНК, tracrРНК и sgРНК, содержащие модифицированные нуклеотидные остатки: m6A, Ψ, m5C и m1Ψ, формируют каталитически активные комплексы с белком Cas9 *in vitro*.

1.5. Оценка эффекта модифицированных нуклеотидных остатков в направляющих РНК на специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*

Для оценки влияния модифицированных нуклеотидных остатков в направляющих РНК на специфичность системы CRISPR/Cas9, были синтезированы 16 ДНК-субстратов, содержащих мисматчи в области протоспейсера, и один контрольный субстрат. Десять мутантных ДНК-дуплексов, обозначенных как S1–S10, содержали однонуклеотидные мисматчи, введенные поочередно в позиции 1–10 протоспейсера, а остальные шесть, обозначенные как D9,10–D19,20 – двухнуклеотидные мисматчи в области 9–20 протоспейсера (Рис. 6А).

Точность расщепления ДНК-субстратов комплексами белка Cas9 с модифицированными sgРНК повышается практически для всех положений

мисматчей. Наибольший эффект наблюдается для одиночных мисматчей в РАМ-проксимальной области (Рис. 6Б). Реакция расщепления наиболее специфично происходит при включении в sgРНК остатков m1Ψ, m6A и m5C, а наименее — в присутствии остатков Ψ (Рис. 6Б, В). Среди исследованных модификаций включение m1Ψ в sgРНК позволяет достичь наибольшего показателя специфичности и значительно снизить нецелевые эффекты.

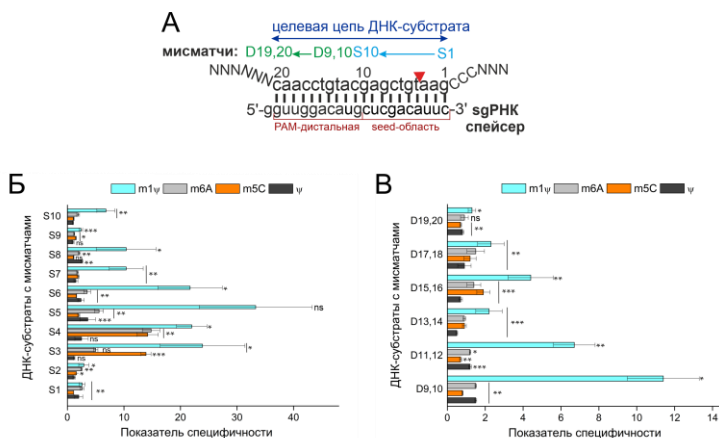


Рис. 6. sgРНК с модифицированными нуклеотидными остатками повышают специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. А – схема эксперимента; Б, В– показатели специфичности, рассчитанные для направляющих sgРНК, содержащих 100% остатков m6A, m5C, m1Ψ и 50% Ψ, и немодифицированной sgРНК (NM) как для положений одиночных (Б), так и для двойных (В) мисматчей. Представлены средние значения ± SD по трем независимым экспериментам. Значения *p* рассчитывались с использованием *t*-критерия Стьюдента относительно немодифицированной sgРНК (ns, незначимо; **p* < 0,05; ***p* < 0,01, ****p* < 0,001).

Введение модифицированных нуклеотидных остатков в tracrРНК не оказывает существенного эффекта на специфичность (Рис.7).

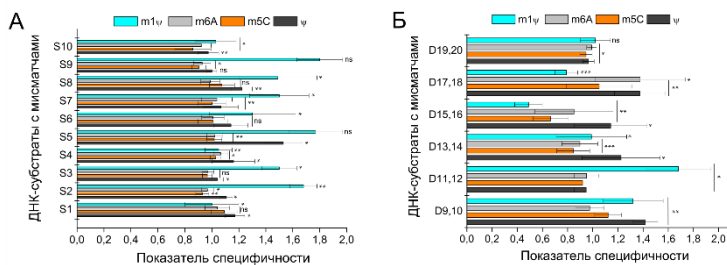


Рис. 7. Влияние природных модификаций в tracrRNA на специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. А, Б – показатели специфичности для tracrRNA, содержащих 100% остатков m6A и m5C, 50% Ψ и 50% m1Ψ, на ДНК-субстратах с одиночными (А) и двойными (Б) мисматчами. Представлены средние значения $\pm$ SD по трем независимым экспериментам.

Таким образом, использование модифицированных sgRNA позволяет увеличить специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*, особенно при использовании модификации m1Ψ.

1.6. Оценка влияния модифицированных нуклеотидных остатков в направляющих РНК на активность системы CRISPR/Cas9 в культивируемых клетках человека

В ходе данной работы была исследована способность модифицированных sgRNA поддерживать Cas9-опосредованное редактирование генов в клетках человека. Клеточную линию HEK293T/17 подвергали электропорации с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов (РНП) с использованием системы трансфекции Neon™ согласно схеме, указанной на Рисунке 8А. Затем методом цифровой ПЦР проводили оценку эффективности редактирования.

Анализ результатов показал, что модификация m5C в sgRNA позволяет достичь эффективности редактирования сравнимой с немодифицированным вариантом sgRNA. При этом, введение m6A, Ψ и m1Ψ в направляющие РНК снижает процент отредактированных клеток соответственно до 40, 30 и 20% (Рис. 8Б).

Таким образом, систему CRISPR/Cas9 с модифицированными sgRNA можно использовать для редактирования генома клеток человека.

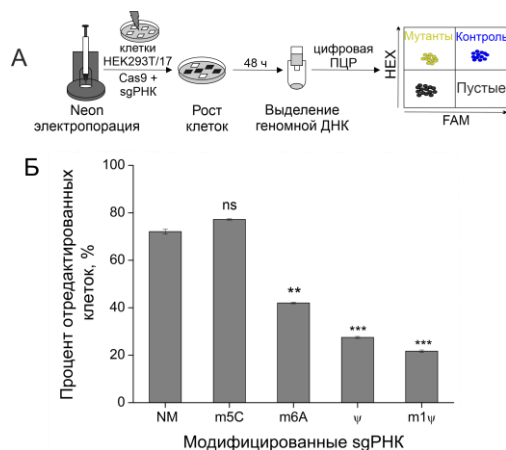


Рис. 8. Комплексы белка Cas9 с модифицированными sgРНК поддерживают геномное редактирование культивируемых клеток человека. А – схема эксперимента; Б – процент отредактированных клеток (%) при использовании sgРНК, содержащих 100% остатков m5C, m6A и m1ψ, 50% Ψ, и немодифицированной контрольной sgРНК (NM). Данные трех независимых экспериментов представлены как средние значения $\pm$ SD. Значения p рассчитывали с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента (ns: незначимо, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

2. Фосфорилгуанидиновые модификации в химерных sgРНК для системы CRISPR/Cas9

2.1. Дизайн химерных sgРНК с фосфорилгуанидиновыми модификациями

В данной работе были исследованы направляющие РНК, содержащие остатки дезоксирибонуклеотидов с фосфорилгуанидиновыми (ФГ) группами, а именно 1,3-диметилимидазолидин-2-илиденфосфорамидатов (Рис. 9). Была синтезирована серия химерных sgРНК с последовательным включением ФГ-модификации с 1-ой по 10-ую позицию РАМ-дистальной спейсерной области sgРНК и с включением множественных ФГ-модификаций, для сравнительной оценки влияния количества и месторасположения ФГ-групп на эффективность расщепления ДНК-субстратов.

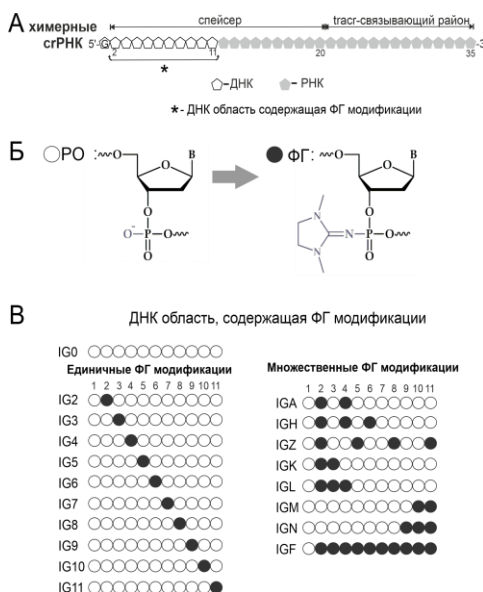


Рис. 9. Структуры химерных crРНК с ФГ-модификациями. А – схематическое изображение химерных crРНК с ФГ-группами. Звездочкой обозначена ДНК область crРНК, несущая ФГ-группы; Б – химические структуры групп фосфодиэфира (РО) и фосфорилгуанидина (ФГ); В – схема положений, в которых фосфодиэфирные связи заменены одной или несколькими ФГ-модификациями.

2.2. Изучение влияния ФГ-групп на активность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*

Исследование влияния ФГ-групп на активность системы CRISPR/Cas9 показало, что для химерных вариантов crРНК, содержащих единичную ФГ-модификацию, эффективность расщепления варьируется от 50 до 88% относительно немодифицированной химерной crРНК (IG0) в зависимости от положения модификации (Рис. 10А, Б). При этом эффективность расщепления заметно снижается при включении ФГ-группы в четвертое положение с 5'-конца crРНК.

Увеличение числа ФГ-модификаций изменяет эффективность расщепления плазмиды. Включение десяти ФГ-модификаций значительно снижает эффективность расщепления плазмидного субстрата до 10% (IGF). Кроме того, независимо от количества ФГ-модификаций наличие её в 4-ом положении с 5'-конца crРНК или в районе примыкающем к РАМ-проксимальной области спейсера crРНК приводит к снижению глубины гидролиза плазмиды (Рис. 10В, Г). Однако, направляющая РНК IGK, содержащая 2 tandemные ФГ-группы в РАМ-дистальной области, демонстрирует высокую эффективность расщепления ДНК-субстрата. Таким образом, комплексы белка Cas9 с химерными crРНК, содержащими

единичные, так и множественные ФГ-модификации, способны расщеплять ДНК-субстраты *in vitro*.

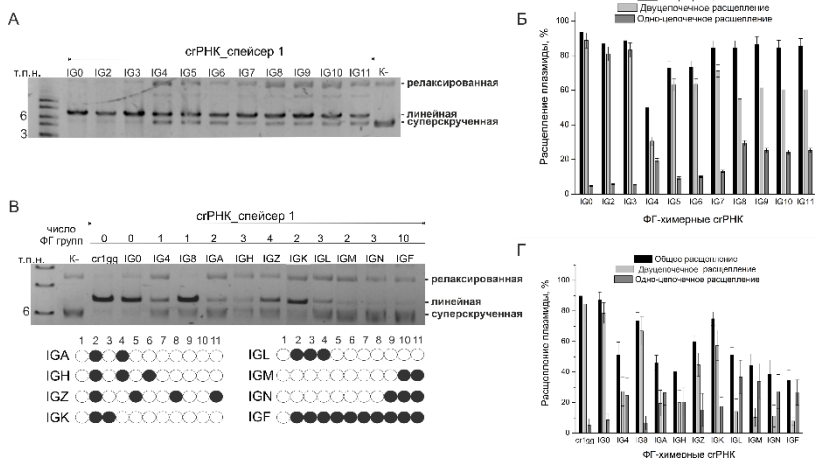
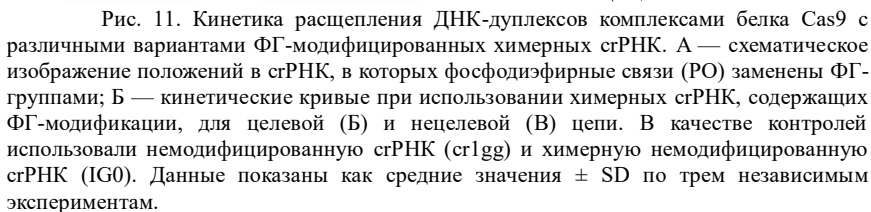


Рис. 10. Влияние ФГ-модификаций в химерных сгРНК на эффективность расщепления плазмидного субстрата. А – расщепление плазмиды комплексами белка Cas9 с химерными вариантами сгРНК, содержащими единичную ФГ-группу в различных положениях. IG0 представляет собой химерную сгРНК, не содержащую ФГ-модификаций. Цифры в названии модифицированных вариантов указывают положение соответствующих дезоксирибонуклеотидов, несущих ФГ-группу; Б – диаграмма процентного соотношения одноцепочечного и двуцепочечного расщепления, а также их суммы - общего расщепления; В – аналогична панели А, но представляет собой варианты сгРНК (представленные ниже), содержащие множественные ФГ-модификации; Г – аналогична панели Б, представляющая эффективность расщепления для вариантов, показанных в панели В. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD по трем независимым экспериментам.

2.3. Исследование кинетики ФГ-модифицированных химерных сгРНК

Анализ кинетических кривых показал, что среди изученных ФГ-модифицированных химерных сгРНК наибольший ингибирующий эффект на активность белка Cas9 оказывает направляющая сгРНК — IGL, а наименьший вызывают варианты IGZ, IGK (Рис. 11). Скорость гидролиза при использовании химерной сгРНК с единичной ФГ-модификацией в 8-м положении (IG8) соответствует немодифицированному контролю (cr1gg) в отличие от 4-го положения (IG4), которое приводит к 10-кратному снижению скорости гидролиза обеих цепей ДНК-дуплекса.



15

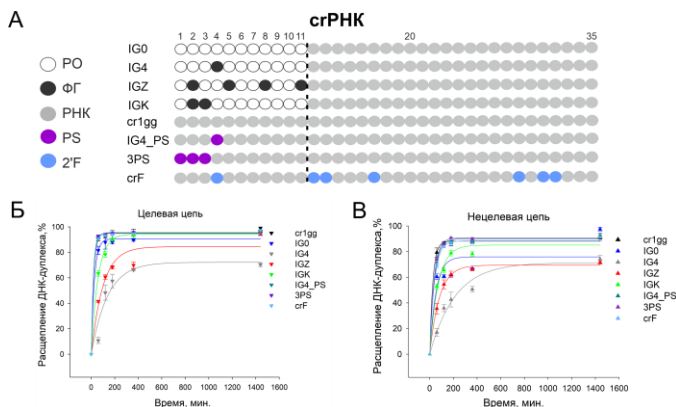


Рис. 12. Сравнение влияния FG, PS и 2'-F модификаций в crRNA на активность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. А — схематическое представление использованных crRNA; Б, В — сравнение кинетики расщепления ДНК-субстратов для crRNA с тимофосфатными (IG4_PS, 3PS), 2'-F (crF) и FG-группами (IG4, IGK, IGZ) по целевой (Б) и нецелевой (В) цепи. Данные показаны как средние значения $\pm$ SD по трем независимым экспериментам.

Таким образом, точный выбор числа FG-модификаций и положений их вставки в химерной crRNA позволяет достичь эффективности расщепления, сравнимой с эффективностью немодифицированных crRNA и crRNA, содержащих PS и 2'-F группы.

2.4. Оценка влияния FG-групп в химерных crRNA на специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*

Для исследования влияния FG-групп в химерных crRNA на специфичность системы CRISPR/Cas9, были выбраны варианты, как с FG-группой в 4-ом положении, так и с FG-модификациями в других позициях, и был использован набор ДНК-субстратов с мисматчами, представленный на Рисунке 13А и описанный ранее.

Анализ показателей специфичности выявил умеренный вклад дезоксирибонуклеотидов в специфичность FG-модифицированных химерных crRNA (Рис. 13Б,В). Однако комбинация дезоксирибонуклеотидов и FG-групп позволяет дополнительно увеличить показатель специфичности, особенно вблизи сайта гидролиза ДНК-субстрата (S3; S4) и в определенных положениях РАМ-дистальной области crRNA (D15,16 и D17,18). Наибольший вклад FG-модификации в повышение специфичности наблюдается для химерных crRNA IGZ и IGK, не содержащих FG-группы в 4-ом положении, причем как в РАМ-проксимальной, так и в РАМ-дистальной областях протоспейсера (Рис. 13).

значения $\pm$ SD по трем независимым экспериментам. Значения p рассчитывали с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента (ns: незначимо, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

2.5. Исследование влияния ФГ-модификаций в химерных crPНК на активность системы в культивируемых клетках человека

Для оценки возможности использования системы CRISPR/Cas9 с ФГ-модифицированными химерными crPНК в клетках человека применяли схему, описанную ранее для природных модификаций (Рис. 15А). Для достижения наилучшей эффективности редактирования клеток число ДНК мономеров в химерных направляющих crPНК уменьшили с десяти до четырех (Рис. 15Б).

Согласно полученным данным химерные crPНК с единичными ФГ-группами (IG2_4D и IG3_4D, Рис. 15) сохраняют эффективность редактирования на уровне с немодифицированными направляющими PНК (cr3gg и IG0_4D, Рис. 15). Аналогично результатам, полученным *in vitro*, включение ФГ-модификации в 4-ое положение достоверно снижает количество мутантных клеток (IG4_4D, $p \leq 0.05$, Рис. 15). Направляющая PНК с несколькими ФГ-группами IGK_4D проявляет эффективность редактирования сопоставимую с немодифицированными контролями. Сравнение ФГ-модифицированных химерных crPНК и crPНК, содержащих PS модификации, не выявило достоверных различий в эффективности редактирования гена-мишени (Рис. 15).

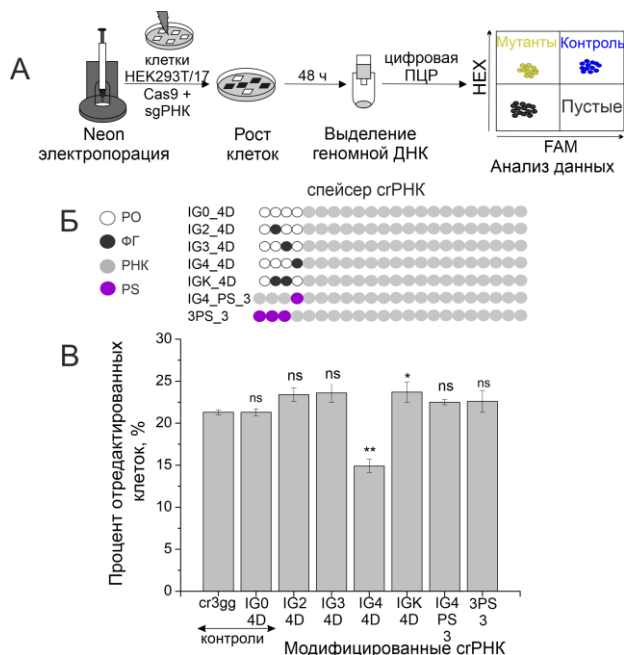


Рис. 15. Комплексы белка Cas9 с ФГ-модифицированными химерными crRNA поддерживают геномное редактирование генов в культивируемых клетках человека. А — схема оценки эффективности редактирования модифицированными crRNA культивируемых клеток человека; Б — схематическое изображение положений в спейсере crRNA, в которые включены модификации. Были использованы химерные crRNA, содержащие единичные (IG2_4D, IG3_4D, IG4_4D) и множественные ФГ-модификации (IGK_4D), crRNA с PS группами (IG4_PS_3, 3PS_3), а также в качестве контролей — немодифицированная crRNA (cr3gg) и немодифицированная химерная crRNA (IG0_4D); В — процент отредактированных клеток (%) при использовании модифицированных crRNA. Данные трех независимых экспериментов представлены как средние значения $\pm$ SD. Значения p рассчитывали с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента в сравнении с соответствующей выборкой результатов, полученных при использовании немодифицированной cr3gg (ns: незначимо, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Таким образом, систему CRISPR/Cas9 с ФГ-модифицированными химерными crRNA можно использовать для редактирования генов в культивируемых клетках человека.

3. Заключение

В рамках настоящей работы были получены и описаны направляющие РНК, содержащие как модифицированные нуклеотидные остатки: м6А, Ψ, м5С и м1Ψ, так и остатки дезоксирибонуклеотидов с ФГ-группами. Проведенные эксперименты показали, что полученные производные способны поддерживать активность системы CRISPR/Cas9.

Было показано успешное применение неканонических азотистых оснований в sgРНК для повышения точности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* по сравнению с немодифицированными аналогами sgРНК. Другим безусловным преимуществом направляющих РНК с модифицированными нуклеотидными остатками является их низкая иммуногенность и цитотоксичность. Кроме того, исследованные модифицированные направляющие РНК способны поддерживать Cas9-опосредованное редактирование генов в клетках человека.

В ходе данной работы в химерные сгРНК были впервые введены ФГ-модификации и исследован их эффект на систему CRISPR/Cas9. В результате было обнаружено, что РАМ-дистальная область на 5'-конце сгРНК, исключая 4-е положение, наиболее благоприятна для введения ФГ-модификаций. Кроме того, комплексы белка Cas9 с ФГ-модифицированными химерными сгРНК значительно повышают точность расщепления ДНК-субстратов по сравнению с сгРНК, содержащими тиофосфатные и 2'-Ф группы. Кроме того, систему CRISPR/Cas9 с химерными сгРНК, содержащими ФГ-модификации, можно применять для геномного редактирования культивируемых клеток человека.

Таким образом, как модифицированные азотистые основания, так и ФГ-модификации в направляющих РНК перспективны для усовершенствования функционирования системы CRISPR/Cas9.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что комплексы белка Cas9 с направляющими РНК, tracrРНК и sgРНК, содержащими модифицированные нуклеотидные остатки м6А, Ψ, м5С и м1Ψ, и химерными сгРНК, содержащими остатки дезоксирибонуклеотидов с фосфорилгуанидиновыми группами, расщепляют ДНК-субстраты *in vitro* с эффективностью, достигающей 95%. Наиболее критичными областями включения модификаций м6А, Ψ, м5С и м1Ψ в sgРНК является РАМ-проксимальная область спейсера, а при включении ФГ-групп в химерные сгРНК – четвертое положение с 5'-конца химерной сгРНК.

2. Установлено, что включение Ψ, м5С, м6А и м1Ψ в sgРНК максимально повышает специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro* соответственно в 4, 14, 15 и 35 раз по сравнению с немодифицированным

вариантом sgРНК; в то же время включение модификаций в tracrРНК не изменяет специфичности реакции.

3. Показано, что включение как единичных, так и нескольких ФГ-групп в РАМ-дистальный район химерных crРНК увеличивает точность расщепления ДНК-субстратов белком Cas9 *in vitro* в 5–40 раз по сравнению с немодифицированной crРНК и crРНК, содержащими тифосфатные и 2'-F модификации, в зависимости от положения мисматча.

4. Продемонстрирована принципиальная возможность использования системы CRISPR/Cas9 с направляющими sgРНК, содержащими m6A, Ψ, m5C и m1Ψ, а также ФГ-модифицированными химерными crРНК, для редактирования генов в культивируемых клетках человека.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. **Prokhorova D. V.**, Kupryushkin M. S., Zhukov S. A., Zharkov T. D., Dovydenko I. S., Yakovleva K. I., Pereverzev I. M., Matveeva A. M., Pyshnyi D. V., Stepanov G. A. Effect of the Phosphoryl Guanidine Modification in Chimeric DNA-RNA crRNAs on the Activity of the CRISPR-Cas9 System In Vitro// ACS chemical biology. – 2024. – V. 19(6). – P. 1311–1319. doi: 10.1021/acscchembio.4c00147
2. **Prokhorova D.**, Matveeva A., Zakabunin A., Ryabchenko A., Stepanov G. Influence of N1-Methylpseudouridine in Guide RNAs on CRISPR/Cas9 Activity // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24(23). – P. 17116. doi: 10.3390/ijms242317116
3. **Prokhorova D.V.**, Vokhtantsev I.P., Tolstova P.O., Zhuravlev E.S., Kulishova L.M., Zharkov D.O., Stepanov G.A. Natural Nucleoside Modifications in Guide RNAs Can Modulate the Activity of the CRISPR-Cas9 System In Vitro // CRISPR Journal. – 2022. – V. 5(6). – P. 799–812. doi: 10.1089/crispr.2022.0069

