

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-236

## СИСТЕМА ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ MMCAS12M И НОВЫХ ВАРИАНТОВ РЕДАКТОРОВ ОСНОВАНИЙ<sup>\*</sup>

### A SYSTEM FOR GENOMIC EDITING BASED ON MMCAS12M AND NEW VARIANTS OF BASE EDITORS

Т. И. Алиев<sup>1,2</sup>, А. Р. Иматдинов<sup>2</sup>, Е. Ю. Прудникова<sup>2</sup>, И. Р. Иматдинов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

T. I. Aliev<sup>1,2</sup>, A. R. Imatdinov<sup>2</sup>, E. Yu. Prudnikova<sup>2</sup>, I. R. Imatdinov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State University

<sup>2</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo

✉ aliev.timur99@yandex.ru

#### Аннотация

Создана система быстрого скрининга эффективных sgRNA для MmCas12m при таргетировании на область старт-кодона гена *gag* ВИЧ-1. Система скрининга применена для *in vitro* тестирования эффективности 9 уникальных sgRNA. На линии клеток TZM-bl показана функциональность системы геномного редактирования, состоящей из MmCas12m, sgRNA и нового варианта двойного редактора оснований.

#### Abstract

A system of rapid screening of effective single guide RNA for MmCas12m has been created for targeting the start codon region of the HIV-1 *gag* gene. The screening system was used for *in vitro* testing of the effectiveness of 9 unique single guide RNAs. The functionality of a genomic editing system consisting of MmCas12m, a single guide RNA, and a new variant of a dual base editor is shown on the TZM-bl cell line genome editing.

С созданием инструментов генного редактирования, таких как нуклеазы типа «цинковые пальцы» (ZFN), TALEN и CRISPR-Cas-системы, начались работы по точечному редактированию генома. Общий принцип работы этих инструментов — внесение двухцепочечных разрывов в ДНК с дальнейшей репарацией по механизму негомологичного соединения концов или по нативной/экзогенной матрице. Однако нуклеазная активность повышает генотоксичность.

Альтернативой выступили рекомбинантные редакторы оснований ДНК. Они способны к редактированию азотистых оснований по механизму дезаминирования. При этом в последовательность ДНК не вносятся двухцепочечные разрывы. В последние годы получены новые варианты редакторов оснований. Так, на основе редактора оснований аденина TadA-8e получен вариант, способный к дезаминированию аденина и цитозина [1].

Редакторы оснований не способны связываться с участком редактирования, эту функцию выполняют CRISPR-Cas-системы. Внимание привлекает недавно открытый MmCas12m, полученный из *Mycobacterium tuberculosis*. Особенностью MmCas12m является сверхкомпактность (596 аминокислот) и высокая способность связывания с ДНК [2, 3].

В рамках работы применена система из двойного редактора оснований на основе варианта MmCas12m для редактирования старт-кодона гена *gag* ВИЧ-1. Ген *gag* был выбран как перспективная мишень для генной терапии ВИЧ-инфекции. Данный ген кодирует протеин Gag, состоящий из доменов MA, CA, NC, p6. Во время созревания эти домены гидролизуются вирусной протеазой, образуя основу вириона. Ген *gag* является моделью для начального тестирования работоспособности системы. В дальнейшем планируется нацеливание на относительно консервативные участки других генов ВИЧ-1, например *tat* и *rev*, для их инактивации.

Проведен дизайн и *de novo* синтез химерного гена *NLS-MmCas12m-NLS-TadA8e* — MmCas12m, слитого с двойным редактором оснований TadA-8e и сигналами ядерной локализации. Проведен дизайн и синтез последовательностей, кодирующих 9 уникальных sgRNA, нацеливающих MmCas12m на область старт-кодона гена *gag*. Для отбора эффективных sgRNA возникла необходимость в создании системы быстрого скрининга. В ее основе лежит трансляция гена-репортера, зависящая от состояния старт-кодона экзогенной последовательности ДНК, на которую предполагается таргетирование. В этом случае перед геном флуоресцентного белка

\* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2030 годы, соглашение № 075-15-2025-526).

клонирован участок 5'-LTR ВИЧ-1, включающий сигнал упаковки PSI и фрагмент нуклеотидной последовательности первых 14 аминокислот белка Gag. Находясь в одной рамке считывания, фрагмент генома ВИЧ-1 приводит к росту доли GFP-позитивных клеток и изменению локализации сигнала на плазматическую мембрану клетки по сравнению с плазмидой без фрагмента генома ВИЧ-1. При клонировании фрагмента генома ВИЧ-1 со сдвигом рамки считывания гена-репортера происходит снижение доли GFP-позитивных клеток. Элиминация старт-кодона фрагмента генома ВИЧ-1 приводит к восстановлению исходного фенотипа по локализации сигнала в обоих случаях, что подтверждено методом микроскопирования. Методом проточной цитометрии подтверждено восстановление доли GFP-позитивных клеток до исходных значений. Таким образом, наблюдается удобная для быстрого скрининга экспрессия гена-репортера, зависящая от инициации трансляции с экзогенной последовательности.

Применена одна из плазмид (pKW\_R1) данной системы для анализа эффективности связывания MmCas12m с областью старт-кодона гена *gag* ВИЧ-1 в зависимости от sgRNA. С использованием лентивирусных частиц получены 9 трансгенных линий HEK293T, стабильно экспрессирующих MmCas12m с одной sgRNA. Проведена трансфекция каждой трансгенной линии плазмидой pKW\_R1, содержащей ген-репортер GFP с фрагментом генома ВИЧ-1 в единой рамке считывания. В случае связывания с последовательностью генома ВИЧ-1 MmCas12m должен блокировать транскрипцию. Методом проточной цитометрии установлено, что 4 из 9 sgRNA обеспечивают статистически значимую эффективность в снижении доли GFP-позитивных клеток.

Последовательность каждой sgRNA клонирована в акцепторную плазмиду с геном *NLS-MmCas12m-NLS-TadA8e* для синтеза комплекса редактирования. Проведена трансфекция клеток линии TZM-bl данными плазмидами. Особенностью линии TZM-bl является наличие в геноме фрагмента 5'-LTR провирусной ДНК ВИЧ-1, искомой для редактирования. Функциональность системы редактирования подтверждена методом гидролиза T7 эндонуклеазы I для выявления мисс-матч мутаций. В дальнейших работах будет задействован метод секвенирования нового поколения для количественной оценки эффективности редактирования.

### Литература

1. Neugebauer M. E., Hsu A., Arbab M. et al. Evolution of an adenine base editor into a small, efficient cytosine base editor with low off-target activity // Nat Biotechnol. 2023. Vol. 41. P. 673–685.
2. Bigelyte G., Duchovska B., Zedaveinyte R. et al. Innate programmable DNA binding by CRISPR-Cas12m effectors enable efficient base editing // Nucleic Acids Res. 2024. Vol. 52. P. 3234–3248.
3. Wu W. Y., Mohanraju P., Liao C. et al. The miniature CRISPR-Cas12m effector binds DNA to block transcription // Mol. Cell. 2022. Vol. 82. P. 4487–4502.