

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

СИСТЕМА ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ MMCAS12M И НОВЫХ ВАРИАНТОВ РЕДАКТОРОВ ОСНОВАНИЙ*

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

Т. И. Алиев^{1,2}, А. Р. Иматдинов², Е. Ю. Прудникова², И. Р. Иматдинов²¹Новосибирский государственный университет²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. КольцовоT. I. Aliev^{1,2}, A. R. Imatdinov², E. Yu. Prudnikova², I. R. Imatdinov²¹Novosibirsk State University²State 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 *Mycolicibacterium mucogenicum*. 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).

© Т. И. Алиев, А. Р. Иматдинов, Е. Ю. Прудникова, И. Р. Иматдинов, 2025

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, искомым 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.