

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Прохорова Дарья Вадимовна

**Влияние модифицированных нуклеотидов в составе направляющих РНК на
активность системы CRISPR/Cas9**

1.5.4 Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ на
соискание ученой степени кандидата
химических наук

Научный руководитель:
к.х.н. Степанов Григорий Александрович

Новосибирск-2024

Оглавление	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. Модификация систем геномного редактирования CRISPR/Cas второго класса (Обзор литературы)	11
1.1 Системы геномного редактирования CRISPR/Cas	11
1.1.1. Система CRISPR/Cas9	14
1.1.2. Система CRISPR/Cas12	17
1.1.3. Система CRISPR/Cas13	19
1.2 Модификация компонентов систем CRISPR/Cas 2-го класса	22
1.2.1 Модификация белков Cas	22
1.2.1.1 Ортологи и мутантные варианты белка Cas9	22
1.2.1.2 Модификация белков Cas12 и Cas13	25
1.2.2 Включение модификаций в направляющие РНК	27
1.2.2.1 Модификация направляющих РНК системы CRISPR/Cas9	27
1.2.2.2 Модификация направляющих РНК системы CRISPR/Cas12 и Cas13	39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	44
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	45
2.1 Материалы и оборудование	45
2.1.1 Реактивы	45
2.1.2 Оборудование и материалы	46
2.1.3 Буферы и растворы	47
2.1.4 Олигонуклеотиды и направляющие РНК	47
2.2 Методы	51
2.2.1 Дизайн плазмиды для синтеза направляющих РНК	51
2.2.2 ПЦР для наработки ДНК-дуплексов и ДНК-матриц	51

2.2.3	Синтез sgРНК и tracrРНК <i>in vitro</i>	52
2.2.4	Расщепление плазмидного ДНК-субстрата <i>in vitro</i>	53
2.2.5	Определение содержания неканонических мономеров в составе РНК, полученных ферментативно	54
2.2.6.	Расщепление ДНК-дуплексов <i>in vitro</i>	54
2.2.7.	Выделение ДНК с помощью магнитных частиц	55
2.2.8.	Неон трансфекция РНП клеток 293Т	55
2.2.9.	Цифровая ПЦР	56
2.2.10.	Статистика	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ		58
3.1.	Модифицированные нуклеотидные остатки в направляющих РНК для системы CRISPR/Cas9.....	59
3.1.1.	Включение модифицированных азотистых оснований в tracrРНК	59
3.1.1.1.	Синтез направляющих РНК с различной глубиной модификации	59
3.1.1.2.	Оценка влияния модифицированных азотистых оснований в tracrРНК на активность системы CRISPR/Cas9 <i>in vitro</i>	63
3.1.1.3.	Исследование кинетики расщепления ДНК-дуплексов комплексами белка Cas9 с модифицированными tracrРНК.....	65
3.1.2.	Включение модифицированных азотистых оснований в sgРНК.....	69
3.1.2.1.	Оценка влияния модифицированных азотистых оснований в sgРНК на активность CRISPR/Cas9 <i>in vitro</i>	69
3.1.2.2.	Исследование кинетики модифицированных sgРНК	74
3.1.3.	Оценка эффекта модифицированных нуклеотидных остатков в направляющих РНК на специфичность системы CRISPR/Cas9 <i>in vitro</i>	77
3.1.4.	Оценка влияния модифицированных нуклеотидных остатков в sgРНК на активность системы CRISPR/Cas9 в клетках.....	83
3.2.	ФГ-модификации в химерных направляющих crРНК для системы CRISPR/Cas9	87

3.2.1. Дизайн химерных sgРНК с ФГ-модификациями	88
3.2.2. Изучение влияния ФГ-групп в химерных sgРНК на активность системы CRISPR/Cas9 <i>in vitro</i>	90
3.2.3. Исследование кинетики ФГ-модифицированных химерных sgРНК	94
3.2.4. Оценка влияния ФГ-групп в химерных sgРНК на специфичность системы CRISPR/Cas9 <i>in vitro</i>	99
3.2.5. Исследование влияния ФГ-групп в химерных sgРНК на активность системы CRISPR/Cas9 в клетках	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	112
ВЫВОДЫ	115
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	116
Приложение А.....	132
Приложение Б	134
Приложение В	135
Приложение Г	136
Приложение Д.....	137
Приложение Е	138

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ANA (от англ. arabinonucleic acid) – арабинонуклеиновая кислота;

BNA (от англ. bridged nucleic acids) – «мостиковые» нуклеиновые кислоты;

CRISPR (от англ. clustered regulatory interspaced short palindromic repeats) – короткие палиндромные повторы, расположенные группами, равномерно удаленными друг от друга;

crPHK (от англ. CRISPR RNA) – CRISPR РНК;

DSB (от англ. double strand break) – двунитевой разрыв ДНК;

GFP (от англ. green fluorescent protein) – зеленый флуоресцентный белок;

FAM (от англ. fluorescein) – флуоресцеин;

2'-F – модификация рибозы по 2-ому положению фтором;

2'-F-ANA (от англ. 2'-deoxy-2'-fluoro- β -d-arabinonucleic acid) – 2'-деокси, 2'-флуороарабино-нуклеиновая кислота;

HDR (от англ. homology-directed repair) – гомологически направленная репарация;

HEX (от англ. hexachlorofluorescein) – гексахлорфлуоресцеин;

HEPES (от англ. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота;

HEPN (от англ. higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain) – домен белков Cas, связывающийся с ДНК и присутствующий в эукариотах и прокариотах;

LNA (от англ. locked nucleic acids) – «заблокированные» нуклеиновые кислоты;

m6A – N⁶-метиладенозин;

m5C – 5-метилцитидин;

m1 Ψ – N¹- метилпсевдоуридин;

M – 2'-ОМе-метилованные нуклеотиды;

MS – 2'-ОМе-3'-фосфотиоат;

MSP – 2'-ОМе-3'-тиофосфоацетат;

MP – фосфоацетат;

NHEJ (от англ. non-homologous end joining) – негомологичное соединение концов;

NM – немодифицированная РНК;

NUC (от англ. nuclease lobe) – нуклеазная область в белках Cas;

PAM (от англ. protospacer adjacent motif) – мотив, прилежащий к протоспейсеру;

PFS (от англ. protospacer flanking site) – фланкирующий протоспейсер участок;

PS (от англ. phosphorothioate) – тиофосфатная модификация;

REC (от англ. recognition lobe) – область распознавания в белках Cas;

RIG-I (от англ. retinoic acid-inducible gene I) – рецептор группы RIG-I-подобных рецепторов, фермент хеликаза;

Seed-регион – короткая последовательность в направляющей РНК, которая охватывает первые 10-12 нуклеотидов на 3'-конце выше сайта PAM;

siРНК (от англ. small interfering RNA) – малые интерферирующие РНК, короткие регуляторные молекулы РНК, которые способны посттранскрипционно подавлять гены;

sgРНК (от англ. single guide RNA) – единая направляющая РНК;

TALEN (от англ. transcription activator-like effector nuclease) – эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции;

tracrРНК (от англ. trans-activating crРНК) – транс-активирующая CRISPR РНК;

ZFN (от англ. Zinc finger nuclease ZFN) – система нуклеаз цинковых пальцев;

Ψ – псевдоуридин;

ДТТ – дитиотриэтол;

ФГ– фосфорилгуанидиновая группа;

МДД – Мышечная дистрофия Дюшена;

мРНК – матричная РНК;

НТФ – нуклеотидтрифосфат;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РНП- рибонуклео-протеиновый комплекс;

ВВЕДЕНИЕ

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 [1]. Эти платформы позволили добиться значительных успехов в области геномного редактирования, но они очень сложны и требуют больших затрат и времени для разработки [1]. Открытая в 1987 году система CRISPR/Cas стала простой и эффективной альтернативой системам ZFN и TALEN [1].

В настоящее время технологии CRISPR/Cas применяют для направленного подавления заранее заданных генов, изменения эпигенетического профиля, проведения полногеномного скрининга и визуализации хромосом [2,3]. Данные платформы позволяют исследовать функцию нескольких генов одновременно, синхронно воздействуя на несколько геномных локусов в одном эксперименте [4]. 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 [5]. Перспективным подходом к её решению является разработка новых структур эффективных модифицированных направляющих РНК.

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 sgРНК, 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 данной диссертационной 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 sgРНК, 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 sgРНК 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 часатицах 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 с помощью системы 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, способных поддерживать баланс между специфичностью и эффективностью.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Направляющие РНК, содержащие как модифицированные нуклеотидные остатки м6А, Ψ, m5C и m1Ψ, так и остатки дезоксирибонуклеотидов с фосфорилгуанидиновыми (ФГ) группами, формируют каталитически активные комплексы с белком Cas9. При включении м6А, 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 sgРНК, 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.

Апробация результатов и публикации

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).

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 293Т и их дальнейшая трансфекция с помощью системы Neop комплексами белка Cas9 с модифицированными направляющими РНК.

Объём и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их 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.

ГЛАВА 1. Модификация систем геномного редактирования CRISPR/Cas второго класса (Обзор литературы)

1.1 Системы геномного редактирования CRISPR/Cas

CRISPR/Cas повторы были впервые найдены в 1987 году в геноме *Escherichia coli* и охарактеризованы как необычный элемент последовательности, состоящий из серии 29-нуклеотидных повторов, разделенных уникальными 32-нуклеотидными «спейсерными» последовательностями [6]. Позже аналогичные последовательности были обнаружены во многих бактериях и археях [7]. Для обеспечения приобретенного иммунитета против бактериофаговой инфекции данные организмы развили сложные адаптивные иммунные системы на основе РНК, которые кодировались CRISPR локусами.

В процессе иммунизации после воздействия вторгшихся генетических элементов фага или плазмид короткие фрагменты чужеродной ДНК интегрируются в матрицу повторов-спейсеров CRISPR в хромосоме хозяина в качестве новых спейсеров, тем самым запуская генетическую запись инфекции, которая защищает в дальнейшем саму клетку и её дочерние клетки от повторной инфекции. Последующая транскрипция массива CRISPR и ферментативный процессинг предшественников CRISPR транскриптов посредством эндонуклеолитического расщепления приводит к образованию коротких зрелых crРНК. На 5'-конце crРНК содержит спейсер, короткий сегмент РНК, который комплементарен последовательности из чужеродного генетического элемента, а 3'-конец содержит часть повторяющейся последовательности CRISPR. При последующей инфекции гибридизация между спейсером crРНК и комплементарной чужеродной последовательностью-мишенью (протоспейсером) запускает расщепление вторгающейся ДНК или РНК нуклеазами Cas. Особенностью систем CRISPR/Cas является сборка зрелых crРНК с белками Cas в комплексы для распознавания ДНК-мишеней и разрушения ДНК-молекул, совпадающих по последовательности. В большинстве систем CRISPR/Cas важную роль в распознавании и деградациии целевой ДНК играет короткий консервативный мотив последовательности (2-8 п.н.), примыкающий к целевой последовательности crРНК на ДНК мишени, известный как PAM [8].

В настоящее время системы CRISPR разделены на два класса и шесть типов (I – VI), каждый из которых использует уникальный набор белков Cas вместе с crРНК для интерференции (Рисунок 1).

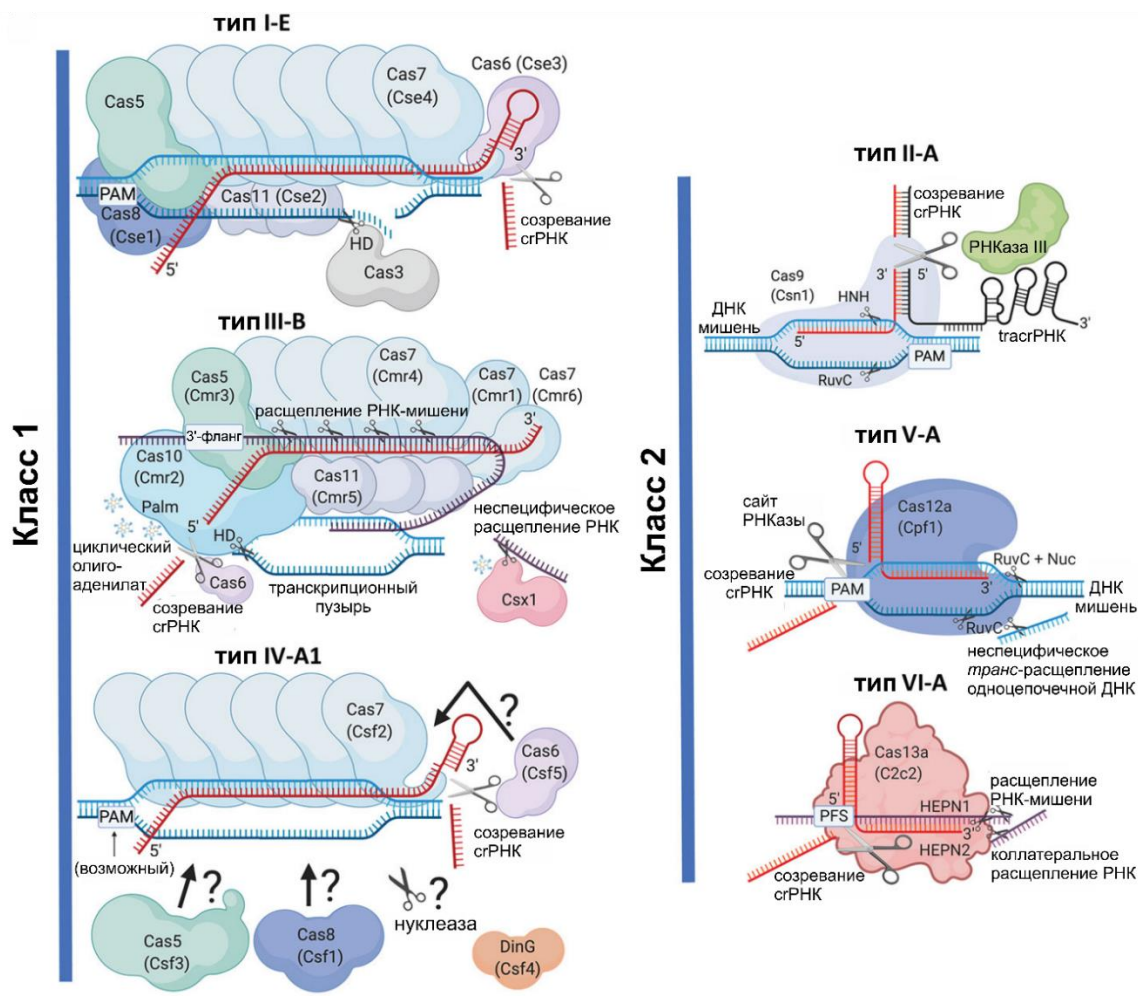


Рисунок 1. Схематическое представление механизма работы разных классов и типов систем CRISPR/Cas. Ножницами обозначены сайты гидролиза ДНК или РНК. Современные названия белков приведены в скобках. PAM — примыкающий к протоспейсеру мотив, PFS — фланкирующий сайт протоспейсера, а 3' фланг — 3' фланкирующая последовательность протоспейсера. Целевая или неспецифически расщепленная РНК выделена фиолетовым цветом, crРНК — красным, tracrРНК — черным, а ДНК — синим. Адаптировано из работы [9].

Системам I-го типа соответствует белок Cas3, содержащий нуклеазные и геликазные домены, который деградирует чужеродную ДНК, посредством сборки большого мульти-Cas белкового комплекса. В системах II-го типа используется единственный мультидоменный белок Cas9 необходимый для интерференции. Системы III-го типа содержат белок Cas10, который посредством каскадного комплекса белков расщепляет как РНК, так и ДНК-мишени. Локусы CRISPR/Cas IV-го типа подразделяются на три различных подтипа, IV-A, IV-B и IV-C, которые содержат белки Cas7 (Csf2) и Cas5 (Csf3), входящие в

состав мультисубъединичного комплекса [10]. На данный момент специфическая функция систем IV-го типа слабо изучена [11]. Системы V-го типа содержат универсальный белок Cas12: Cas12a (Cpf1), C2c1 или C2c3, в зависимости от подтипа. Системы VI-го типа имеют единственный белок Cas13 (C2c2) с двумя РНКазными доменами HEPN. Системы I-го, III-го и IV-го типа включены в 1-ый класс на основании их мультисубъединичных эффекторных комплексов, в то время как односубъединичные эффекторные системы типов II-го, V-го и VI-го сгруппированы в 2-ой класс [9].

Таким образом, системы CRISPR/Cas классифицируются в зависимости от эффекторного белка и наличия либо отсутствия: сигнатурных генов, консервативности белковой последовательности и организации соответствующих локусов генома (типы и подтипы). В настоящее время CRISPR/Cas системы 2-го класса обладают наибольшим потенциалом в областях редактирования генов и генетического скрининга. Среди различных типов систем 2-го класса наиболее изучены и широко используемыми являются системы типа II (Cas9), V-A (Cas12a), V-B (Cas12b) и VI-A (Cas13a) (Рисунок 2).

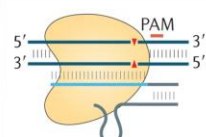
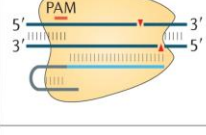
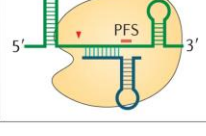
Название системы	Схема механизма работы системы	Нуклеазные домены	tracrPНК	PAM	Субстрат	Паттерн расщепления
Тип II Cas9		RuvC HNH	Да	3' GC-богатые	дцДНК	тупые концы
Тип V-A Cas12a		RuvC Nuc	Нет	5' AT-богатые	дцДНК	липкие концы
Тип V-B Cas12b		RuvC	Да	5' AT-богатые	дцДНК	ступенчатое расщепление
Тип VI-A Cas13a		2 HEPN	Нет	5' не-G, PFS	оцРНК	вблизи U + коллатеральная активность

Рисунок 2. Сравнение систем CRISPR/Cas 2-го класса. Для каждого типа систем представлена схема комплекса между эффекторным белком, целевым субстратом, crPНК и, в случае систем II-го и V-B типа, tracrPНК. Положение мотива, смежного с протоспейсером (PAM), или фланкирующего сайта протоспейсера (PFS) обозначено красной полосой. Маленькие красные треугольники обозначают положение разреза или разрезов в целевой

молекуле ДНК или РНК. ДцДНК — двухцепочечная ДНК; оцРНК — одноцепочечная РНК. Адаптировано из работы [12]

1.1.1. Система CRISPR/Cas9

Система CRISPR/Cas9 типа II первой была применена для эффективного редактирования генома эукариотических клеток [13,14]. Она распознает и расщепляет ДНК, содержащую PAM (5'-NGG-3'), комплексом белка Cas9 с двумя некодирующими направляющими РНК: crРНК, которая содержит последовательность комплементарную ДНК-мишени, и tracrРНК, которая комплементарна сегменту crРНК и способствует образованию РНП [15–17]. Однако для большинства областей применения системы CRISPR/Cas9 используют единые направляющие РНК (sgРНК), полученные путем слияния crРНК и tracrРНК в одну молекулу РНК (Рисунок 3) [18]. Последовательность PAM для всех белков Cas9 расположена непосредственно с 3'-конца от протоспейсера на цепи ДНК, не комплементарной направляющей РНК.

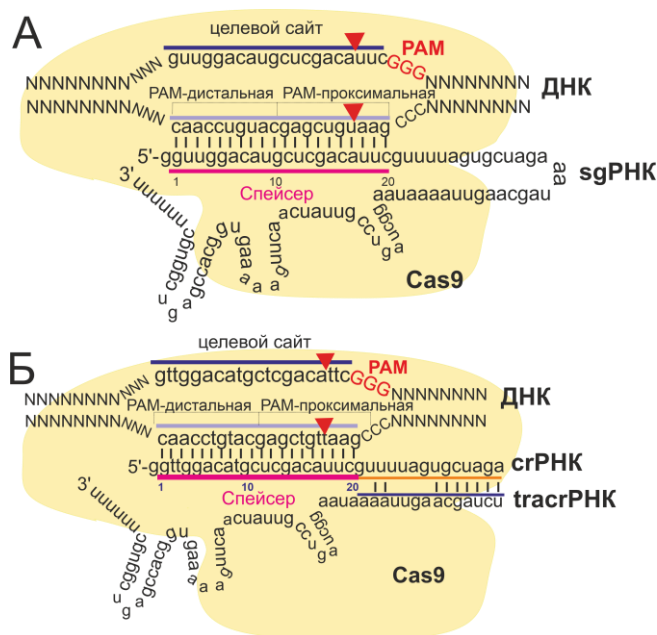


Рисунок 3. Схема системы CRISPR/Cas9: А – с sgРНК; Б – с crРНК и tracrРНК. Красным треугольником обозначен сайт расщепления ДНК-субстрата. В ДНК-субстрате красным выделен PAM, а также в целевом сайте обозначены PAM-дистальная и PAM-проксимальная область. В sgРНК и crРНК малиновым цветом выделен спейсер, в crРНК оранжевым и в tracrРНК синим цветом выделена область их связывания, соответственно.

Белок Cas9 состоит из двух областей: области распознавания (REC) и нуклеазной области (NUC) [19]. Область REC, состоящая из длинной мостиковой α -спирали, домена

REC1 и домена REC2, распознает ДНК-мишень. В области NUC присутствует РАМ-узнающий домен (PI) и два каталитических центра: HNH и RuvC, которые расщепляют нити ДНК, комплементарную направляющей РНК (целевую) и некомплементарную (нецелевую), соответственно [19–21]. Инактивация посредством мутации любого из доменов нуклеазы приводит к образованию никазы Cas9, расщепляющей только одну из цепей ДНК, тогда как инактивация обоих доменов нуклеазы приводит к образованию каталитически «мертвого» Cas9 (dCas9), который, однако, способен связывать специфические последовательности ДНК. Механизм распознавания ДНК-мишени и внесения в нее двухцепочечного разрыва включает в себя следующие стадии (Рисунок 4).

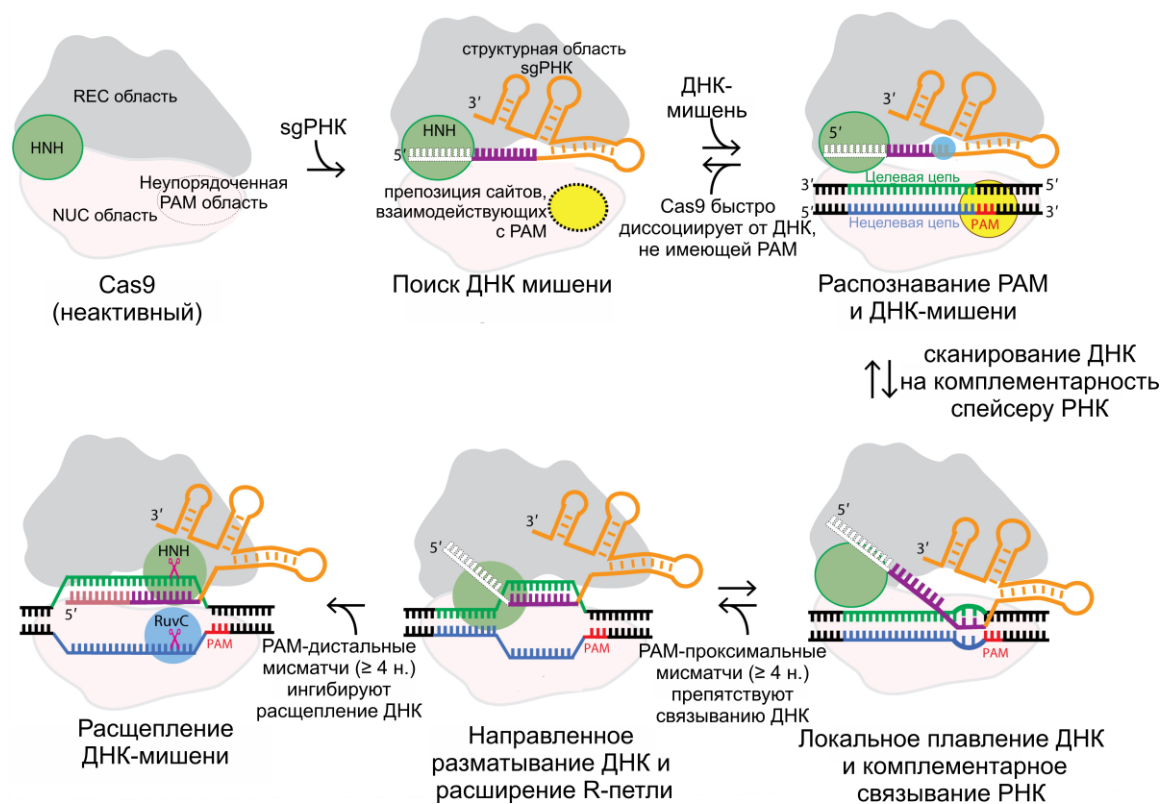


Рисунок 4. Схема механизма распознавания и расщепления ДНК-мишени системой CRISPR/Cas9. Перед узнаванием sgРНК белок Cas9 претерпевает конформационную перестройку, в результате которой РАМ-взаимодействующая область (пунктирный круг) и нуклеазные домены активируются и происходит связывание белка с направляющей РНК. После seed-регион направляющей РНК преобразуется в конформацию А-формы для распознавания комплементарного ДНК-субстрата. Cas9 далее активируется посредством различных стадий, начиная с распознавания РАМ, за которым следует локальное плавление ДНК, узнавание направляющей РНК и формирование R-петли, а также аллостерическая регуляция домена RuvC путем конформационного изменения домена HNH для обеспечения

согласованного расщепления ДНК. Направляющая РНК выделена оранжевым цветом, целевая цепь ДНК-субстрата — зеленым, нецелевая цепь — синим, а РАМ — красным. Адаптировано из работы [8]

Первоначально белок Cas9 распознает РАМ-проксимальную область и шпильчатую область sgРНК с образованием бинарного комплекса Cas9:sgРНК. Бинарный комплекс впоследствии узнает последовательность ДНК, комплементарную спейсеру sgРНК, с формированием конечного тройного комплекса Cas9:sgРНК:ДНК. Этому предшествует распознавание P1 доменом РАМ на некомплементарной цепи, которая вытесняется спейсером направляющей РНК с образованием одноцепочечной R-петли. В результате белок Cas9 претерпевает конформационные изменения, которые приводят к активации его нуклеазных доменов. В то же время, наличие несоответствий между целевой цепью ДНК и спейсером sgРНК препятствует конформационным перестройкам белка. После сборки тройного комплекса и активации нуклеазы Cas9, фосфодиэфирный остов ДНК-субстрата гидролизуется двумя различными каталитическими центрами: HNH расщепляет целевую цепь ДНК, тогда как RuvC — нецелевую цепь. Таким образом, образуется двуцепочечный разрыв с тупыми концами, расположенный после 3-го основания от РАМ на обеих цепях внутри протоспейсера ДНК-мишени [19].

После того, как система CRISPR/Cas9 индуцировала двуцепочечный разрыв в целевом сайте, клетки иницируют репарацию ДНК посредством либо гомологически направленной репарации (HDR), либо нехомологического соединения концов (NHEJ). HDR происходит при наличии гомологических последовательностей, и ведет к репарации сайта-мишени или вставке чужеродной ДНК. NHEJ не использует гомологичную матрицу, что приводит к инсерциям и делециям, и часто вызывает потерю функции гена в расщепленной области [13,14].

Несмотря на широкое распространение и применение системы CRISPR/Cas9, она обладает серьезными недостатками: возникновение нецелевых эффектов, низкая эффективность расщепления, проблема доставки и другие. Одной из основных проблем является наличие нецелевых эффектов. Причиной их появления служит то, что длина ДНК-мишени, распознаваемой направляющей РНК, составляет всего 20 п.н., а белок Cas9 слабо чувствителен к несовпадениям между целевым сайтом и 5'-концом направляющей РНК. Для решения данной проблемы было разработано несколько стратегий. Среди них

выделяются следующие: модификация направляющих РНК и получение новых вариантов белка Cas9.

1.1.2. Система CRISPR/Cas12

Открытие новых эффекторных белков V-го типа увеличило число систем CRISPR/Cas 2-го класса. Новое поколение нуклеаз CRISPR, были названы Cpf1 или Cas12a. Cas12a — первая нуклеаза Cas12, которая широко использовалась для редактирования генома.

Аналогичный по размеру и форме белку Cas9, эффекторный белок Cas12a состоит из двух основных областей: NUC и REC. Область REC включает два домена REC1 и REC2, тогда как NUC состоит из домена RuvC, разделенного на три части, и трех дополнительных доменов. Нуклеазе Cas12a не требуется tracrRNA для процессинга зрелых crRNA, а катализ процессинга пре-crRNA происходит за счет внутренней рибонуклеазной активности самого белка. Зрелая crRNA Cas12a состоит из 42-44 нуклеотидов и короче направляющей РНК белка Cas9. РАМ белков семейства Cas12 преимущественно Т-богаты и находятся на противоположном конце протоспейсера ДНК-мишени по сравнению с РАМ белка Cas9. После распознавания РАМ белком Cas12a происходит раскручивание ДНК и образование R-петли, а затем целевая и нецелевая цепи ДНК последовательно расщепляются доменом RuvC. Сайт расщепления находится после 18-го основания на нецелевой цепи и после 23-го основания на целевой цепи относительно РАМ. В результате, белок Cas12a генерирует липкие концы, которые запускают NHEJ [22]. Помимо высокоспецифичного расщепления двухцепочечной ДНК, Cas12a способен неизбирательно деградировать любые одноцепочечные ДНК (Рисунок 5) [23].

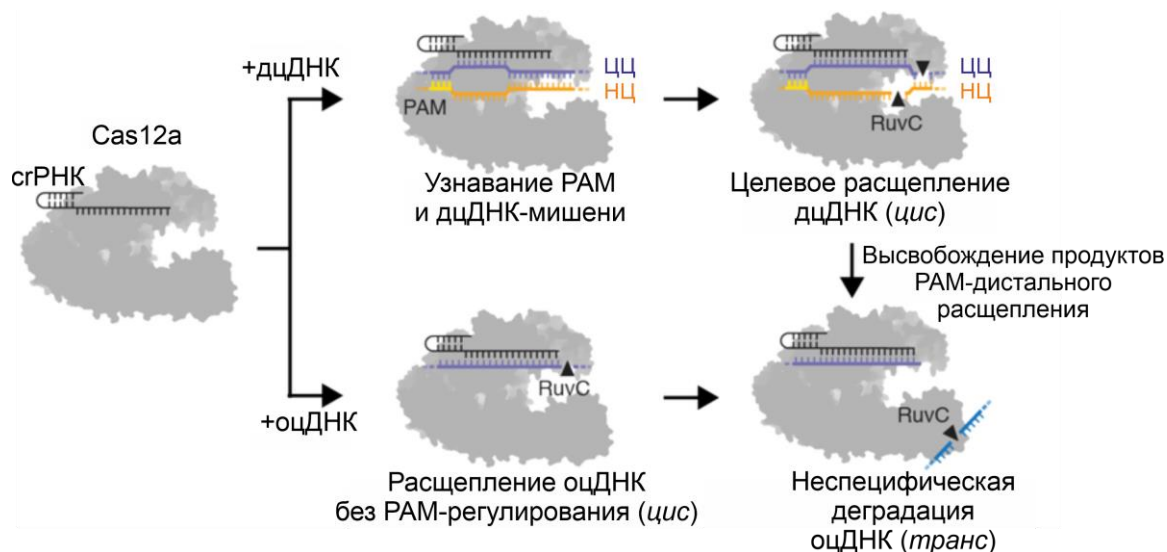


Рисунок 5. Механизм работы системы CRISPR/Cas12a. На схеме представлено действие системы CRISPR/Cas12a при использовании двухцепочечного (дцДНК) и одноцепочечного (оцДНК) ДНК-субстрата. В структуре дцДНК обозначена целевая (ЦЦ) цепь, с которой связывается направляющая crPHK, и нецелевая (НЦ) цепь. RuvC представляет собой каталитический домен белка Cas12a, черными треугольниками выделены сайты расщепления ДНК-мишеней. Адаптировано из работы [23]

Другим представителем систем CRISPR/Cas 2-го класса V-го типа является двойная РНК-управляемая эндонуклеаза Cas12b, содержащая один домен RuvC и работающая в комплексе с crPHK и tracrPHK [24]. Аналогично системе CRISPR/Cas9, дуплекс crPHK:tracrPHK можно объединить в короткую sgPHK без потери активности. Размер белка Cas12b меньше, чем у нуклеаз Cas12a и Cas9, что облегчает его использование *in vivo* [25]. Подобно Cas12a, Cas12b предпочитает Т-богатые PAM и расщепляет ДНК с образованием липких концов. Однако в отличие от белков Cas9 и Cas12a, нуклеаза Cas12b вызывает минимальные нецелевые эффекты. Недавно было продемонстрировано, что эндонуклеазы Cas12b из *Alicyclobacillus acidiphilus* и *Bacillus hisashii* могут быть использованы для редактирования генома в клетках млекопитающих и человека, соответственно [25,26].

Из проблем системы CRISPR/Cas12a основными являются низкая эффективность расщепления ДНК-мишени по сравнению с белком Cas9, и наличие нецелевых эффектов [27]. Разработаны различные способы повышения эффективности и специфичности системы, такие как введение химических и структурных модификаций в crPHK, применение малых молекул и модификация белка Cas12a [28]. В случае нуклеазы Cas12b низкая эффективность гидролиза ДНК-субстратов и высокая температура активации

системы являются главными недостатками. Для их преодоления разрабатываются новые мутантные варианты белка Cas12b [25].

1.1.3. Система CRISPR/Cas13

Тогда как большинство систем CRISPR/Cas нацелены на расщепление двухцепочечных ДНК, системы VI-го типа работают исключительно с РНК молекулами. Белок Cas13 представляет собой архетипический белок VI-го типа, у которого отсутствует домен ДНКазы в отличие от остальных нуклеаз систем CRISPR/Cas 2-го класса [29,30]. Эндонуклеазы Cas13 состоят из двух различных рибонуклеазных доменов. REC отвечает за процессинг пре-crРНК с образованием зрелой crРНК и формирование комплекса с белком Cas13. В то время как NUC включает два HEPN домена, которые отвечают за расщепление РНК-мишени на этапе вирусной интерференции [31].

Белок Cas13a в комплексе с crРНК распознает участки одноцепочечных РНК (оцРНК) длиной 22-28 нуклеотидов, комплементарные спейсеру crРНК, а затем расщепляет их [32]. Кроме того, РНК-мишень должна содержать фланкирующий протоспейсеру PFS. PFS обычно не имеет строгой последовательности, как PAM, и его последовательность может быть вариабельной (Рисунок 6). Механизм действия белка LshCas13a включает несколько стадий: 1) образование комплекса белка с crРНК; 2) связывание образованного комплекса с ДНК-мишенью; 3) расщепление петлевых участков оцРНК по уридину (или аденозину для LbaCas13a, EreCas13a и CamCas13a) [33]. Для данной системы допустим один мисматч в спейсере crРНК, однако два мисматча, расположенные в PAM-проксимальной области спейсера, способны существенно уменьшить эффективность расщепления РНК-мишени. Как и нуклеаза Cas12a, Cas13 проявляет «коллатеральное расщепление», которое позволяет гидролизовать любую оцРНК [34]. Предполагается, что процессинг пре-crРНК не является необходимым для распознавания РНК-мишени, но повышает активность расщепления за счет высвобождения crРНК из массива CRISPR [33].

Класс II тип VI CRISPR/Cas13

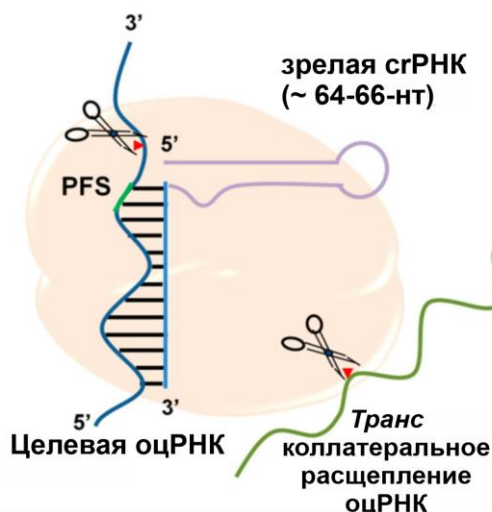


Рисунок 6. Механизм действия системы CRISPR/Cas13a. Система CRISPR/Cas13 состоит из двух компонентов: нуклеазы Cas13 и crРНК, распознающей целевую оцРНК через PFS, который обозначен зеленым цветом. Ножницы представляют цис- (целевое) и транс-расщепление («коллатеральное расщепление») оцРНК, осуществляемое посредством двух доменов HEPN белка Cas13, которые вместе образуют активный сайт рибонуклеазы. Адаптировано из работы [35]

Белок Cas13b (ранее C2C6) из *Bergeyella Zoohelcum* и *Prevotella buccae* представляет собой CRISPR-ассоциированную РНК-управляемую РНКазу с двумя вариантами crРНК [36]. Данная эндорибонуклеаза имеет большую специфичность, чем нуклеаза Cas13a, поскольку распознавание РНК-мишени происходит за счет двух сайтов: PFS с D (D=A, U или G) на 5'-конце и NAN/NNA мотива (N=A, U, C или G) на 3'-конце. В системах Cas13b имеются вспомогательные белки, которые способны усиливать или подавлять активность эндорибонуклеазы [36,37]. Хотя механизм работы данной системы CRISPR/Cas13b еще до конца не изучен, было показано, что она способна обнаруживать и редактировать РНК [38,39].

Недавно был открыт белок Cas13d (CasRx), который не требует PFS для распознавания РНК-мишени и может быть доставлен с помощью вектора аденоассоциированного вируса. Белок Cas13d обладает следующими преимуществами: небольшой размер; двойная нуклеазная активность без использования дополнительных рибонуклеаз и tracrРНК; отсутствие PFS для расщепления РНК; высокая эффективность и специфичность по сравнению с другими эндонуклеазами Cas13 [40,41]. Из метагеномных данных в 2021 году были найдены две дополнительные группы белков Cas13: Cas13X и

Cas13Y [42]. Нуклеаза Cas13X частично похожа на ранее открытые нуклеазы семейства Cas13, но обладает самой компактной структурой. Белок Cas13X не участвует в созревании пре-crРНК, процессинг которой осуществляется неизвестным ферментом. Кроме того, ни у одного из ортологов белков Cas13d и Cas13X не обнаружено PFS.

Однако существует несколько препятствий на пути развития системы CRISPR/Cas13 такие как: длина РНК-мишени, наличие нецелевых эффектов, а также токсичность расщепления оцРНК в эукариотических клетках [32].

В настоящее время, системы геномного редактирования CRISPR/Cas активно исследуются: открывают новые типы и совершенствуются существующие для дальнейшего внедрения в терапию. Наиболее эффективным инструментом для генетической модификации является система CRISPR/Cas9, так как она широко исследована и оптимизирована для различных организмов и типов клеток. Данная технология перспективна для терапевтического применения, включая лечение генетических болезней и онкологии. Увеличение точности и эффективности работы системы CRISPR/Cas9, усовершенствование методов доставки и устранение иммунных реакций на её компоненты являются наиболее важными аспектами исследований.

1.2 Модификация компонентов систем CRISPR/Cas 2-го класса

Основными проблемами систем CRISPR/Cas остаются низкая эффективность и возникновение нецелевых эффектов при редактировании. Перспективными подходами к их решению является разработка новых структур эффективных модифицированных направляющих РНК, поиск новых ортологов белков семейства Cas и получение мутантных вариантов белков.

1.2.1 Модификация белков Cas

Главным критерием для связывания белков Cas является наличие PAM. В результате изучения систем CRISPR/Cas был найден ряд ортологов нуклеаз Cas, которые распознают различные PAM. Данное природное разнообразие применяется для обеспечения нацеливания на различные последовательности генома. Доступность PAM, однако, остается существенной проблемой даже при условии использования ортологов белков Cas, поскольку только незначительная часть существующих PAM доступна всем природным белкам Cas, функционирующим в клетках млекопитающих. Открытие новых ортологов и разработка мутантных вариантов белков Cas, которые распознают разные PAM, необходимы как для увеличения количества доступных сайтов-мишеней, так и для увеличения области действия систем геномного редактирования CRISPR/Cas.

1.2.1.1 Ортологи и мутантные варианты белка Cas9

Диким типом белка Cas9 является белок Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). В настоящее время SpCas9 широко используется для геномного редактирования, содержит 1368 аминокислот, распознает относительно распространенный NGG PAM, может применяться либо с sgРНК, либо с парой crРНК/tracrРНК, оптимально функционирует со спейсерами длиной 20 нуклеотидов и обладает высокой эффективностью по распознаванию и расщеплению ДНК-мишеней. Однако наличие нецелевой активности препятствует его широкому применению в терапии. Со времен первых сообщений о расщеплении ДНК нуклеазой SpCas9 *in vitro* и в клетках млекопитающих, было обнаружено и протестировано большое число вариантов белка Cas9 для редактирования генома, включая ортологи из *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophilus*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni* и из многих других организмов. Они различаются по размеру, PAM, структуре направляющей РНК, оптимальной длине спейсера, эффективности и специфичности редактирования. Например, NmeCas9 из *Neisseria meningitidis* распознает 8-нуклеотидный богатый пиримидинами PAM (5-NNNNGATT) и частично снижает нецелевое расщепление [43]. Другой ортолог SaCas9 из *Staphylococcus aureus* узнает 6-нуклеотидный PAM (5-

NNGRRT, R-пурин) и обладает эффективностью редактирования, которая сравнима с эффективностью для SpCas9 [44]. Кроме того, более низкая частота возникновения неспецифичных эффектов и меньший размер белка SaCas9 позволяет доставлять его в клетки с помощью аденоассоциированного вируса [44]. Новые ортологи способны увеличивать специфичность системы CRISPR/Cas9, а некоторые расщеплять как ДНК, так и РНК-мишени [45]. Так расщепление оцРНК с помощью SaCas9 и CjeCas9 из *Campylobacter jejuni* не зависит от PAM [46]. Также SaCas9 подавляет экспрессию генов в *E. coli* при нацеливании на РНК [47]. Другой ортолог из *Francisella novicida* (FnCas9) способен узнавать бактериальную мРНК [48]. Белок FnCas9 не является PAM-зависимым и может быть использован в диагностике для детекции вирусов [49–51].

Недостатком многих ортологов является то, что их PAM встречаются реже, чем PAM дикого типа белка SpCas9. Поэтому одним из направлений исследований в области усовершенствования системы CRISPR/Cas9 является создание мутантных вариантов нуклеазы Cas9, способных распознавать широкий спектр PAM. В своей работе Ну и др. разработали белок xCas9, который проявляет более высокую активность в отношении PAM, отличных от NGG, особенно в случаях NGT и NGA [52]. Было показано, что xCas9 эффективно функционирует в клетках млекопитающих, поддерживает активацию транскрипции, может быть использован для направленного расщепления ДНК и редактирования оснований. Дополнительно проведенное полногеномное секвенирование клеток HEK293T и U2OS выявило, что белок xCas9 проявляет значительно более высокую специфичность, чем SpCas9. Хотя эффективность нуклеазы xCas9 в отношении PAM, отличных от NGG, варьируется в зависимости от применения и от целевого сайта, наличие других PAM значительно расширяет спектр мишеней, доступных для сайт-чувствительного редактирования генома [52]. Для увеличения специфичности белков Cas9 было сконструировано или улучшено несколько высокоточных вариантов с низкой активностью нецелевого редактирования. Первым был получен eSpCas9, который продемонстрировал эффективное и точное редактирование генома в клетках человека [44]. Затем в результате мутаций, направленных на снижение аффинности связывания между комплексом Cas9-sgРНК и ДНК-мишенью, был разработан SpCas9-HF1, обладающий высокой целевой активностью и меньшим количеством нецелевых эффектов [53]. На основе сравнения механизмов действия предыдущих мутантных вариантов и дикого типа Cas9 был получен белок НураCas9, который с большей эффективностью расщеплял целевые ДНК-мишени и с меньшей другие ДНК [54]. В последствии в результате скрининга библиотеки мутантных

нуклеаз SpCas9 был обнаружен белок evoCas9 с большей точностью, чем предыдущие высокоспецифичные варианты SpCas9 [55]. Аналогично был идентифицирован Sniper-Cas9 – вариант SpCas9 с наибольшей специфичностью [56]. Сравнение специфичности сконструированного варианта белка Sniper-Cas9 с другими ранее разработанными мутантными белками eSpCas9, Cas9-HF1, evoCas9, HupaCas9, xCas9 и диким типом SpCas9, показало, что он позволяет достичь самых высоких коэффициентов специфичности среди представленных аналогов в клетках HEK293T и Hela. Предполагается, что РНП с белком Sniper-Cas9 могут выступать в качестве потенциальных терапевтических агентов [56]. Ранее было выявлено, что мутантные белки с повышенной точностью обладают низким сродством к 5'-модифицированным направляющим РНК, например, к 21G-sgРНК, которые в свою очередь позволяют увеличивать эффективность редактирования в клетках [57]. Поэтому было предложено в существующие белки с повышенной точностью вводить мутации “Blackjack”, которые представляют собой делеции между аминокислотами L1004 и K1014, содержащими только два глицина [58]. Было показано, что данные модификации имеют два эффекта: увеличение эффективности и точности расщепления при использовании комплекса мутантного белка Cas9 с 5'-удлиненной 21G-sgРНК. В результате были получены нуклеазы с “Blackjack” мутацией eSpCas9-plus, SpCas9-HF1-plus, которые обладают высокой точностью исходных аналогов, но способны использовать для редактирования 21G-sgРНК. В недавнем исследовании [59] было проведено обширное сравнение существующих мутантных белков Cas9 и выявлены зависимости их эффективности расщепления $SpCas9 \geq \text{Sniper-Cas9} > \text{eSpCas9(1.1)} > \text{SpCas9-HF1} > \text{HupaCas9} \approx \text{xCas9} > \text{evoCas9}$ и специфичности $\text{evoCas9} > \text{HupaCas9} \geq \text{SpCas9-HF1} \approx \text{eSpCas9(1.1)} > \text{xCas9} > \text{Sniper-Cas9} > \text{SpCas9}$. Представленные результаты позволили разработать 16 вычислительных моделей, которые точно предсказывают активность мутантных вариантов Cas9 для любой последовательности мишени [59]. Другим способом снижения нецелевой активности при внесении двухцепочечного разрыва в ДНК-мишень является использование пары РНП, состоящих из двух нуклеаз Cas9 (Cas9^{D10A}), в каждой из которых ингибирован каталитический домен RuvC, и парных направляющих РНК [60]. В недавней работе существующие высокоспецифичные нуклеазы Cas9 были преобразованы в никирующие варианты и было выявлено, что при работе в виде пары нуклеазных РНП их точность превосходит точность исходной нуклеазы SpCas9^{D10A} [61].

Описанное разнообразие белков позволяет отбирать белки Cas9 с наиболее благоприятными свойствами, такими как: высокая специфичность, низкая частота

нецелевых эффектов и большой диапазон температурных зависимостей, а также расширять область применения системы CRISPR/Cas9. Однако существует серьезная проблема в несогласованности данных по специфичности депонированных мутантных вариантов белков в разных исследованиях.

1.2.1.2 Модификация белков Cas12 и Cas13

По сравнению с нуклеазой Cas9 белок Cas12 генерирует меньшее количество нецелевых эффектов. В настоящее время наиболее распространенными разновидностями белка Cas12 являются белки Cas12a (Cpf1), Cas12b (C2c1) и Cas12c (C2c2), из которых два последних содержат RuvC-подобные каталитические центры, которые коррелируют с нуклеазой Cas12a. Однако для геномного редактирования чаще всего применяется нуклеаза Cas12a. У нее было найдено более 10 ортологов, которые могут использоваться для редактирования генов в клетках человека. На сегодняшний момент ортологи AsCas12a (*Acidaminococcus* sp. BV3L6) и LbCas12a (*Lachnospiraceae bacterium* ND2006) наиболее охарактеризованы и широко используются для геномного редактирования. Белки AsCas12a и LbCas12a вызывают очень низкий уровень нецелевых эффектов в клетках человека [62,63]. Также, как и в случае с белком Cas9 для нуклеазы Cas12 проводятся исследования по обнаружению новых ортологов и созданию их мутантных вариантов для преодоления существующих недостатков системы CRISPR/Cas12. Например, было проведено исследование по созданию мутантных белков AsCas12a [64]. Улучшенный вариант Cas12a (enAsCas12a) обладал расширенным набором PAM и более высокой эффективностью редактирования генома в сайтах с каноническими PAM, чем белок AsCas12a дикого типа. Кроме того, была получена высокоточная версия enAsCas12a (enAsCas12a-HF1) для уменьшения нецелевых эффектов. Оба мутантных варианта были активны в НЕК293Т и первичных Т-клетках человека при доставке в виде РНП [64]. Аналогичное исследование по поиску ортологов никазы Cas12a дикого типа выявило три аналога PrCas12a, Mb3Cas12a и BsCas12a меньшего размера, эффективность редактирования которых была сравнима с эффективностью для белков AsCas12a и LbCas12a в клетках [65]. Для усовершенствования обнаруженных белков были созданы их мутантные варианты, обладающие повышенной целевой активностью редактирования и широким диапазоном PAM (NTTV, NTCV и TRTV, V=G,C,A) по сравнению с нуклеазой Cas12a [65]. В дальнейшем с помощью рекомбинации последовательностей: нефункциональных мутантных белков Cas12a, известных ортологов Cas12a и белка Cas12a дикого типа были получены синтетические нуклеазы Cas12a [66]. Используя данный метод было обнаружено несколько вариантов белка Cas12a, один из

которых обладал сниженной нецелевой активностью и высокой целевой активностью *in vitro* и *in vivo*. Созданные синтетические Cas12a-подобные нуклеазы позволили упростить редактирование генома в клетках *E. coli*, дрожжей и млекопитающих [66]. В настоящее время все больше работ направлено на разработку мутантных белков Cas12a, что позволяет подбирать вариант белка с нужными свойствами под конкретную задачу или требование [67].

Система CRISPR/Cas13 была открыта сравнительно недавно, поэтому в настоящее время большое количество статей посвящено изучению механизмов ее действия. Наиболее изученным белком Cas систем CRISPR VI-го типа является Cas13a. На сегодняшний день известно несколько структур гомологов белка Cas13a: *Leptotrichia shahii* Cas13a (LshCas13a), *Leptotrichia buccalis* Cas13a (LbuCas13a) и *Lahnospiraceae* Cas13a (LbaCas13a); Cas13b: *Bergeyella zoohelcum* (BzCas13b) и *Prevotella buccae* (PbuCas13b); Cas13d: *Eubacterium siraeum* Cas13d (EsCas13d) и *Ruminococcus flavefaciens* Cas13d (CasRx). Недавно с помощью программы AlphaFold2 были сконструированы пять миниатюрных вариантов белка Cas13d (RfxCas13d) [68]. Данные аналоги обладают эффективностью расщепления РНК сопоставимой с ферментом дикого типа Cas13d. Кроме того, за счет своей компактности RfxCas13d могут быть упакованы в аденоассоциированный вирусный вектор для эффективного нокдауна РНК. Посредством мутагенеза доменов HEPN белков Cas13d и Cas13X были получены несколько их высокоточных вариантов для целенаправленной деградации РНК с минимальными коллатеральными эффектами [69]. Мутантные белки Cas13 демонстрируют схожую активность РНК-нокдауна с нуклеазой Cas13 дикого типа, но не проявляют коллатеральной активности в трансгенных мышцах или соматических клетках [69].

Создаются все новые ортологи и мутантные варианты белков Cas обладающие высокой точностью и позволяющие в значительной степени сократить нецелевое редактирование, однако они часто проявляют низкую целевую активность. Кроме того, надежность сконструированных вариантов белков Cas нередко не соответствует устойчивости их природных аналогов и их небезопасно применять для сложных задач, таких как редактирование животных моделей или лечение генетических заболеваний человека. Более того, большинство высокоточных вариантов нуклеаз Cas не терпимы к изменениям направляющей РНК, что ограничивает область их применения. Таким образом, остается актуальной разработка систем редактирования генома CRISPR/Cas, которые снижают активность нецелевого редактирования, сохраняя при этом высокую

эффективность целевого редактирования и совместимость с модифицированными вариантами направляющей РНК.

1.2.2 Включение модификаций в направляющие РНК

Одним из наиболее перспективных направлений усовершенствования систем геномного редактирования CRISPR/Cas 2-го класса является введение модификаций в направляющие РНК. Разработка оптимального варианта модифицированной направляющей РНК необходима для того, чтобы добиться максимальной эффективности редактирования генов-мишеней при минимизации клеточной токсичности и нецелевых эффектов. В настоящее время разработано множество химически модифицированных нуклеотидов для повышения устойчивости направляющих РНК к нуклеазам, снижения иммунного ответа, изменения аффинности связывания с мишенью и других свойств [70–73]. Эффект отдельной модификации варьируется в зависимости от положения и комбинации используемых химических модификаций, а также меж- и внутримолекулярных взаимодействий с другими модифицированными нуклеотидами. В настоящее время наибольшее количество модификаций получено для системы CRISPR/Cas9, однако в данном направлении активно развиваются системы CRISPR/Cas12 и CRISPR/Cas13.

1.2.2.1 Модификация направляющих РНК системы CRISPR/Cas9

Направляющая РНК системы CRISPR/Cas9 существует в двух формах: в форме нативного дуплекса, который состоит из crРНК (до 40 н.), отвечающей за комплементарное связывание с ДНК-субстратом и формирование комплекса с tracrРНК, и tracrРНК (до 80 н.), формирующей комплекс с белком, или в форме единой одноцепочечной направляющей РНК sgРНК (около 100 н.) (Рисунок 7). sgРНК состоит из двух частей – варибельной длиной 20 нуклеотидов (спейсер), и константной или неварибельной длиной около 70 нуклеотидов. Спейсер необходим для специфического связывания комплекса Cas9:sgРНК с целевой цепью ДНК, причем наиболее критична комплементарность первых 10-12 нуклеотидов (seed-регион), примыкающих к РАМ. Область рядом с РАМ называют РАМ-проксимальной и в нее входит seed-регион, а область вдали от РАМ – РАМ-дистальной. Невариабильная часть отвечает за формирование комплекса с эндонуклеазой Cas9 и в нее входят три шпильки, тетрапетля и антиповторный регион.

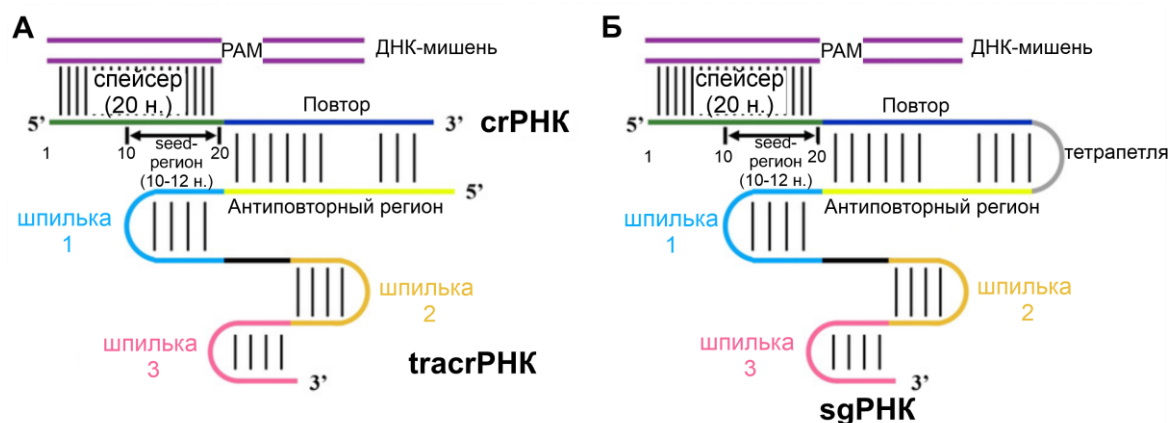


Рисунок 7. Схематическое представление компонентов системы CRISPR/Cas9 при разной форме направляющей РНК. А – нативный дуплекс crРНК/tracrРНК; Б – единая одноцепочечная направляющая sgРНК. Зеленым цветом в направляющих РНК выделен спейсер и обозначен seed-регион, ДНК-мишень обозначена фиолетовым. Адаптировано из работы [74].

Немодифицированные направляющие РНК обладают рядом существенных недостатков: они быстро подвергаются гидролизу в сыворотке и внутриклеточной среде, способны активировать нежелательный врожденный иммунный ответ и вызывают значительное количество нецелевых эффектов, что ограничивает их применение в системе CRISPR/Cas9. Чтобы преодолеть данные недостатки направляющих РНК, широко используют различные виды модификаций. Модификация направляющих РНК как sgРНК, так и crРНК и tracrРНК в основном проводится в трех направлениях: включение химических модификаций, оптимизация длины и структурные модификации (Рисунок 8). Среди химических модификаций широко изучены модификации рибозы, фосфатного остатка и азотистых оснований (Рисунок 8).

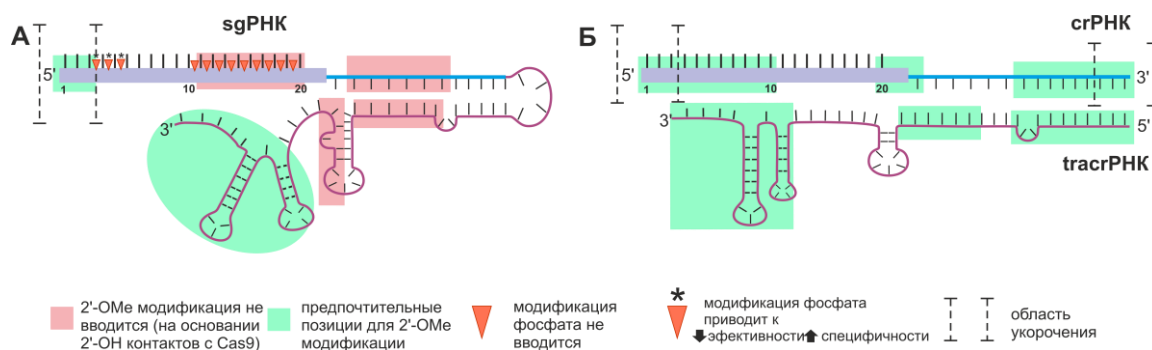


Рисунок 8. Положения для включения модификаций (2'-ОМе групп и модификаций фосфата) в направляющие РНК: А – направляющую sgРНК; Б – crРНК/tracrРНК. Красным цветом обозначены области направляющих РНК, в которые не включаются 2'-ОМе модификации; зеленым – предпочтительные позиции для 2'-ОМе групп; красными треугольниками – положения, в которых модификация фосфата не происходит; красными треугольниками со звездочкой – позиции, в которых включение модификаций фосфата повышает специфичность, но снижает эффективность; пунктирной линией – укорочение длины направляющих РНК. Адаптировано из работы [75].

Химические модификации, затрагивающие 2'-положение рибозы являются наиболее распространенными и применяются для повышения стабильности искусственно синтезированных направляющих РНК, что позволяет увеличить эффективность системы CRISPR/Cas9. В работе Hendel A. с соавторами для оценки влияния химических модификаций были синтезированы полноразмерные sgРНК с тремя различными группами: 2'-ОМе (М), 2'-ОМе-3'-фосфоротиоатом (MS) и 2'-ОМе-3'-тиофосфоноацетатом (MSP) на обоих концах РНК (Рисунок 9) [76].

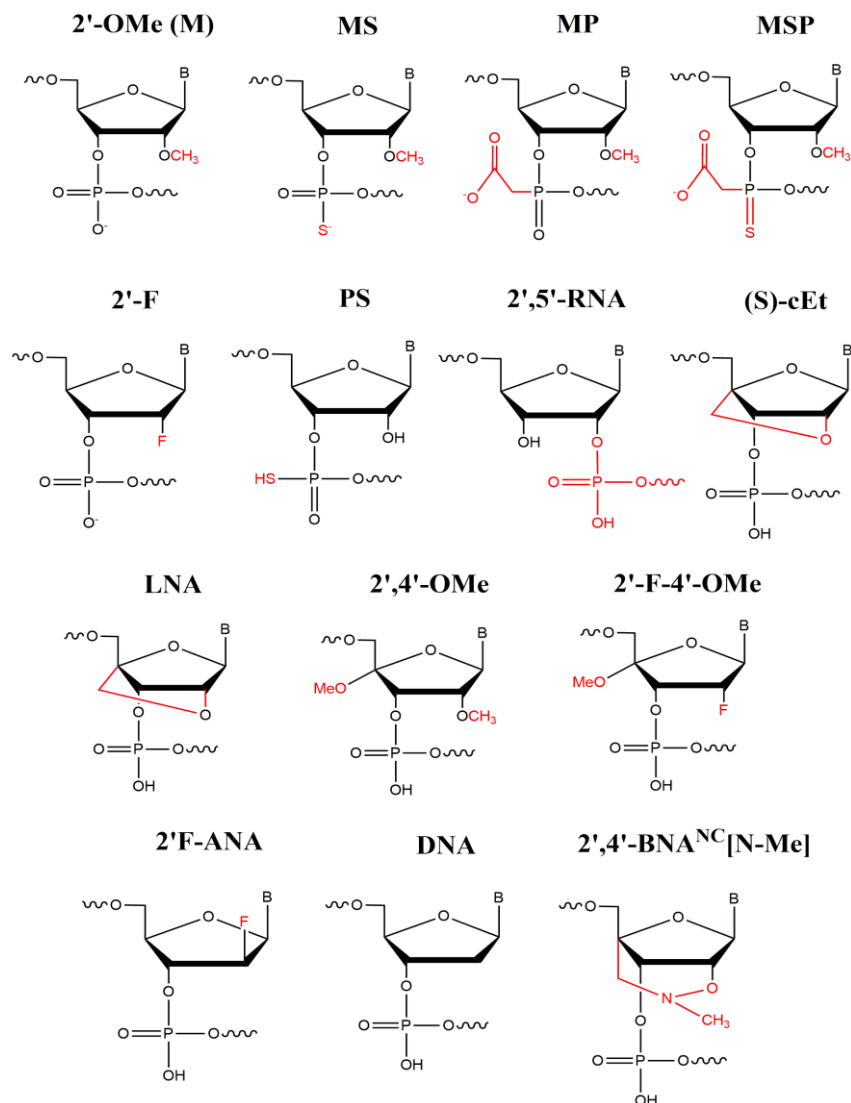


Рисунок 9. Химические модификации сахаро-фосфатного остова направляющих РНК, часто используемые для повышения эффективности или специфичности систем геномного редактирования CRISPR/Cas: 2'-O-Me (M), 2'-O-Me-3'-тиофосфат (MS), 2'-O-Me-3'-фосфоацетат (MP) и 2'-O-Me-3'-тиофосфоацетат (MSP) [76,77]; 2'-фтор (2'-F) и тиофосфатная группа (PS) [78]; 2',5'-РНК и 2'-О-этил модификация (cEt) [79]; заблокированные нуклеиновые кислоты (LNA); 2',4'-ди-OMe РНК; 2'-F-4'-OMe РНК; 2'F-ANA; ДНК [80]; мостиковые нуклеиновые кислоты (2',4'-BNA^{NC}[N-Me]) [81]. В – азотистое основание (A, U, C, G).

Комплексы белка Cas9 с модифицированными sgРНК были эффективны в условиях *in vivo*, однако процент инсерций и делеций при гомологичной рекомбинации различался для разных модификаций. Наибольший процент мутаций достигался для модификаций MS и MSP. Также результаты выявили, что активность направляющих РНК с MSP группой в

клетках сохраняется на протяжении 24 часов, с MS модификацией до 12 часов, а с М модификацией ингибируется после 4 часов. С другой стороны, немодифицированная sgРНК позволяла достичь меньше 7% активности *in vivo*. Таким образом, с увеличением внутриклеточной стабильности при введении модификаций в sgРНК возрастала и эффективность редактирования генома. Включение аналога 2'-ОМе группы – 2'-О-метил-3'-фосфоацетата (МР) (Рисунок 9) в определенные области направляющей sgРНК позволяет увеличить специфичность системы CRISPR/Cas9 как *in vitro*, так и *in vivo*. Так единичная МР модификация в 4-ой, 5-ой или 7-ой позициях с 5'-конца sgРНК на порядок снижала нецелевое расщепление ДНК-субстрата. Однако в 6-ом положении практически не влияла на расщепление. Двумя другими областями для снижения нецелевых эффектов были позиции 9-12, 14 и 16, особенно 11-ая позиция. Также последовательное увеличение количества 5'-концевых МР групп в направляющих РНК повышало специфичность в 10 раз в зависимости от ДНК-мишени. Таким образом, модификации МР эффективны для повышения точности системы CRISPR/Cas9 [82].

Руководствуясь кристаллографической структурой комплекса Cas9:sgРНК [19], были определены области sgРНК, которые могут быть модифицированы. Было проведено сравнение активности направляющих РНК, модифицированных 2'-ОМе, 2'-фтор (2'-F) или тиофосфатными (PS) группами *in vivo* (Рисунки 8-9) [78]. Включение 2'-ОМе модификаций в положения невариабильной области sgРНК, не отвечающие за связывание с белком Cas9, увеличивает эффективность редактирования GFP-клеток более чем на 10%, но введение данной группы в спейсерную область sgРНК полностью ингибирует работу системы CRISPR/Cas9 (Рисунок 10).

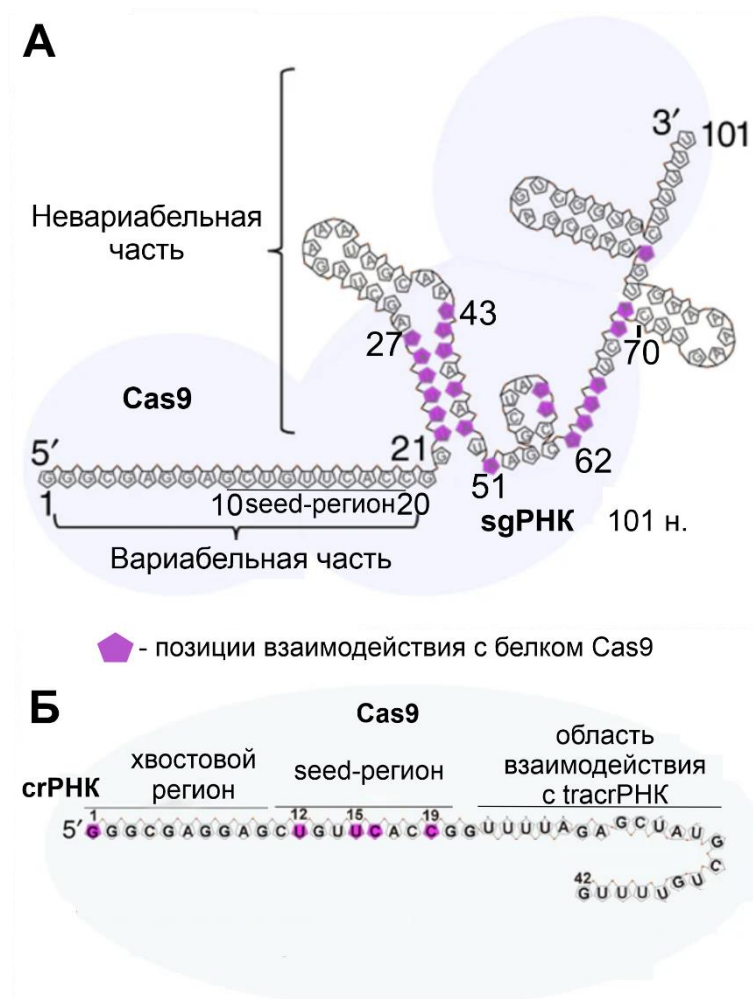


Рисунок 10. Структуры направляющих РНК с указанием положений, взаимодействующих с Cas9. А – для sgРНК; Б – для crРНК. Фиолетовыми пятиугольниками обозначены позиции в направляющих РНК, которые взаимодействуют с белком Cas9. Адаптировано из работы [78].

Для 2'-F замен наблюдается противоположная ситуация: в невариабильном районе происходит ингибирование, а в спейсере только снижение активности направляющей РНК. Данные о контактах белка Cas9 с сахарофосфатным остовом направляющей РНК выявили, что частичная или полная 2'-модификация рибозы в невариабильной области sgРНК в положениях: 22 – 27, 43 – 45, 47, 49, 51, 58, 59, 62 – 65, 68, 69, и 82 негативно влияет на активность белка Cas9, так как 2'-ОН группы нуклеотидов в данных позициях участвуют в формировании комплекса с белком (Рисунок 10А). Включение в направляющую РНК PS групп в положения 70 – 101, не взаимодействующих с белком Cas9, позволяет значительно увеличить её активность по сравнению с немодифицированным аналогом. В результате, для невариабильной области sgРНК наиболее эффективной является комбинация модификаций

PS и 2'-ОМе, а для спейсерной области PS и 2'-F, позволяющие значительно повысить эффективность редактирования генома в культуре клеток [78]. Комбинирование модификаций позволяет увеличить эффективность системы за счет того, что модификации в 2'-положении рибозного кольца изменяют конформацию РНК на более энергетически выгодную и увеличивают сродство связывания РНК с ДНК, а модификации фосфата повышают устойчивость РНК к нуклеазам. В целом невариабельная область sgРНК по сравнению с seed-регионом не вызывает существенного снижения эффективности редактирования, поскольку незначительно влияет на взаимодействие между sgРНК и ДНК.

Другим параметром оптимизации направляющей sgРНК является ее длина. Ярким примером является укорочение спейсерной области sgРНК с 5'-конца на 3 нуклеотида (до 17 н.), которое не влияет на эффективность редактирования, но значительно повышает специфичность и приводит к значительному снижению нецелевых эффектов [83]. Было высказано предположение, что сокращение длины направляющей РНК увеличивает специфичность за счет уменьшения энергии связывания между РНК и ДНК-мишенью. Однако дальнейшие исследования выявили, что повышение специфичности вызвано ингибированием конформационного перехода активного центра HNH белка Cas9 при использовании укороченной РНК [84]. Не только уменьшение длины sgРНК, но и ее увеличение позволяет улучшить свойства системы CRISPR/Cas9. В первую очередь, один неспаренный гуанозин в составе sgРНК необходим для запуска транскрипции РНК-полимеразой в клетках и ее синтеза. Однако, два непарных гуанозина на 5' или 3'-конце направляющей РНК способны значительно увеличить специфичность системы с незначительным снижением эффективности редактирования целевого гена [85,86]. Механизм действия системы CRISPR/Cas9 включает в себя этап формирования R-петли между комплексом Cas9: sgРНК и целевой ДНК, который необходим для запуска нуклеазной активности белка Cas9. Поэтому увеличение количества пар оснований между спейсером и целевой ДНК способствует стабильному образованию R-петли, что обеспечивает высокую активность системы CRISPR/Cas9. Например, удлинённая на 10 нуклеотидов с 5'-конца направляющая РНК обеспечивает эффективность введения инсерций и делеций сравнимую с немодифицированным аналогом [60].

Среди структурных изменений sgРНК можно выделить следующие: введение различных линкеров, полиаденилирование и кэпирование, а также включение G-квадруплексов и биотина на 5' и 3'-конец sgРНК (Рисунок 11).

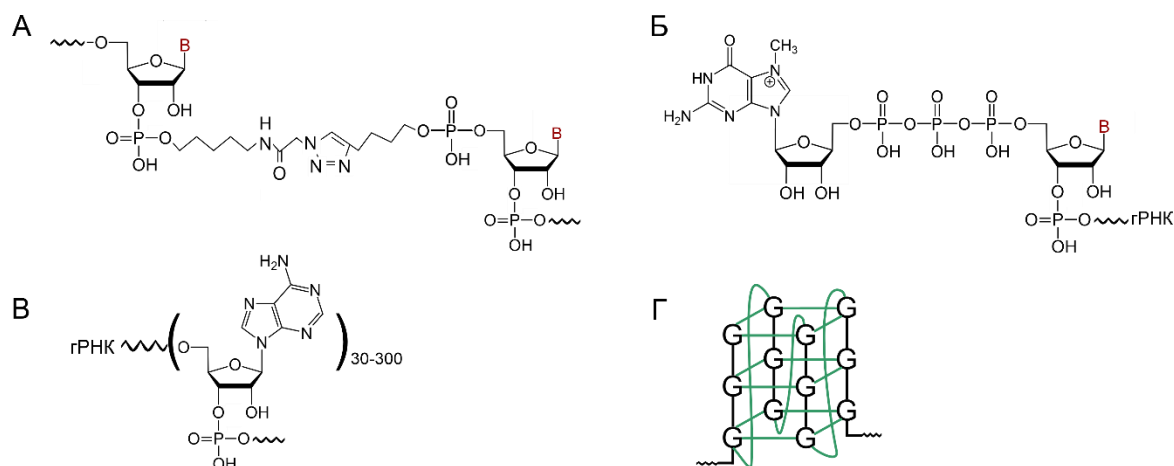


Рисунок 11. Структурные модификации sgРНК: А – триазольный линкер; Б – кэпирование; В – полиаденилирование; Г – G-квадруплекс. Адаптировано из работы [75]

Использование линкеров, таких как триазольный, амидный или тетразиновый, позволяет химически связывать между собой tracrRNA и crRNA и формировать протяженные sgRNA, которые можно использовать для геномного редактирования клеток, в том числе и клеток человека [87]. Совмещение данного метода с твердофазным синтезом делает возможным синтез большого пула длинных sgRNA, содержащих флуоресцентные метки или различные стерически объемные модификации в сайте сшивки tracrRNA и crRNA [87]. Кроме того, применение линкеров может быть использовано для получения протяженных направляющих РНК, тем самым увеличивая эффективность системы CRISPR/Cas для биомедицинских исследований и разработки терапевтических средств. С другой стороны, применение признаков внутриклеточного созревания РНК таких как полиаденилирование и кэпирование, при получении направляющих РНК *in vitro* транскрипцией увеличивает их внутриклеточную стабильность и проникающую способность по сравнению с немодифицированными аналогами [88]. Полученные защищенные РНК на 15% повышают эффективность редактирования в первичных Т-клетках. G-квадруплексы представляют собой два или более квартета, которые накладываются друг на друга и состоят из гуанозинов, связанных водородными связями Хугстина [89]. Присоединение данного мотива к 5'-концу sgRNA ингибирует функционирование системы CRISPR/Cas9 *in vitro*, однако в случае 3'-конца эффективность расщепления ДНК-мишени сопоставима с эффективностью, наблюдаемой для немодифицированных РНК [90]. Кроме того, добавление G-квадруплекса на 5'-конец увеличивает время полужизни направляющих РНК в 5 раз по сравнению с контрольными аналогами. Эксперименты, проведенные на одноклеточных эмбрионах (*Danio rerio*),

показали, что процент введения инсерций и делеций возрастает при использовании направляющих РНК, модифицированных G-квадруплексом с 5'-конца, а также что данные РНК не токсичны для организмов [90]. Аналогично G-квадруплексам, биотин применяется для модификации sgРНК, при этом комплекс эндонуклеазы Cas9 с модифицированной РНК способен расщеплять ДНК-мишень *in vitro* [91]. Кроме того, биотинилированная sgРНК может быть использована в качестве аффинного реагента для идентификации sgРНК-связывающих белков, присутствующих в клетках.

Другим направлением включения модификаций являются crРНК, которые обладают меньшей длиной по сравнению с sgРНК, что позволяет уменьшить затраты при их химическом синтезе и увеличить диапазон химических модификаций, вводимых в РНК. За последнее время было изучено множество химически модифицированных нуклеотидов в составе crРНК.

Для повышения эффективности системы CRISPR/Cas9 необходимо сохранение А-формы crРНК в спейсерной области при образовании комплекса crРНК:ДНК. Поэтому модифицированные нуклеотиды, имитирующие конформационные свойства РНК, являются наиболее удачными заменами в спейсере. С другой стороны, объемные модификации значительно снижают активность. В crРНК были включены нуклеотиды, обладающие конформационными свойствами, сходными с РНК: 2'-F, 2',5'-РНК, 2'-F-ANA, LNA, 2',4'-ди- OMe РНК, 2'-F-4'- OMe РНК и 2'-OMe (Рисунки 8-9) [80]. 100% замещение РНК мономеров на 2'-F-группы в crРНК приводит к активности сопоставимой с немодифицированным аналогом *in vitro*, однако в клетках модифицированная crРНК проявляет низкую активность. Для применения *in vivo* 2'-F-модификации необходимо включать в РАМ-дистальную область спейсера crРНК [79]. С другой стороны, множественные замены 2',5'-РНК, 2'-F,4'-OMe или 2',4'-ди-OMe в направляющей crРНК ингибируют работу системы CRISPR/Cas9. Было показано, что модификация нуклеотидов направляющей области crРНК негативно влияет на функционирование системы CRISPR/Cas9 (Рисунок 10Б). В то же время область комплементарного взаимодействия crРНК с tracrРНК толерантна широкому спектру модификаций и их комбинациям. Наиболее эффективным сочетанием модификаций в области взаимодействия crРНК с tracrРНК является совмещение дезоксирибонуклеотидов, 2'-F-ANA и 2',5'-РНК, позволяющее достичь наибольшей эффективности [80]. По аналогии, удачной комбинацией оказались PS и 2'- OMe; 2'-F и 2'-О-этил модификации (сEt), введенные в укороченные 29-нуклеотидные crРНК (Рисунок 8) [79]. Сочетание данных модификаций позволяет повысить аффинность

связывания sgРНК с tracrРНК, увеличить метаболическую стабильность, а также эффективность редактирования в человеческих клетках [79]. Помимо комбинаций модификаций, для оптимизации редактирования генов в sgРНК и tracrРНК используются 2'-О-Ме-3'-фосфоротиоаты (MS) [92]. Целесообразно включение двух MS групп как с 5'-конца sgРНК, так и с 3'-конца tracrРНК, что позволяет добиться не только схожей или немного увеличенной эффективности редактирования генов в клетках в сравнении с немодифицированной РНК, но и снизить цитотоксичность направляющих РНК для сохранения жизнеспособности клеток.

Для увеличения специфичности системы CRISPR/Cas9 в sgРНК вводятся мостиковые нуклеиновые кислоты 2',4'-BNA^{NC}[N-Me] и замкнутые нуклеиновые кислоты LNA [81]. Включение BNA^{NC} и LNA в 10–14-ое положения seed-региона sgРНК в несколько раз увеличивает специфичность *in vitro* и *in vivo*. В то же время, эффективность расщепления целевой мишени снижается в 2–3 раза для модифицированных аналогов по сравнению с немодифицированным контролем. 2',4'-BNA модификации в отличие от LNA групп менее токсичны и способствуют повышению специфичности белка Cas9 в большей степени [81]. Замена рибонуклеотидов на ДНК-мономеры в sgРНК также положительно влияет на специфичность белка Cas9. Включение в sgРНК ДНК-мономеров увеличивает специфичность системы CRISPR/Cas9 за счет изменения энергии связывания между направляющей РНК и ДНК-мишенью [93]. Так замена от восьми до двенадцати 5'-концевых или четырех 3'-концевых рибонуклеотидов на дезоксирибонуклеотиды в направляющих РНК значительно уменьшает число нецелевых эффектов [93]. Дальнейшие исследования выявили, что для активности белка Cas9 *in vitro* достаточно наличия только пяти РНК-мономеров в составе sgРНК [94,95]. Полученная химерная sgРНК позволяет значительно снизить количество нецелевых эффектов при использовании *in vitro* и в клетках. Введение дезоксирибонуклеотидов в антиповторный регион sgРНК:tracrРНК аналогично позволяет увеличить специфичность системы CRISPR/Cas9 [95]. Преимуществами ДНК-РНК химер является их дешевый и простой синтез, а также высокая стабильность в биологических средах. Однако проблема данных направляющих заключается в отсутствии 2'-ОН группы, необходимой для взаимодействия с белком Cas9.

sgРНК необходима для специфического распознавания ДНК-мишени белком Cas9, тогда как tracrРНК отвечает за непосредственное связывание с нуклеазой Cas9. В процессе улучшения свойств системы CRISPR/Cas9 некоторые из модификаций, описанных для sgРНК и tracrРНК, были введены и в состав tracrРНК. Уменьшение изначальной длины

tracrPНК на пять нуклеотидов позволяет сохранить достаточно высокую эффективность расщепления ДНК-субстрата *in vitro* [96]. Кроме того, для tracrPНК возможна замена до 54 рибонуклеотидов на дезокси аналоги с сохранением активности *in vitro*. При этом активность модифицированной tracrPНК снижается в 3 раза по сравнению с немодифицированным контролем в культуре клеток [94]. Для обеспечения длительного функционирования системы CRISPR/Cas9 *in vivo* одновременно и в crPНК, и в tracrPНК были проведены замены 2'-ОН групп на 2'-ОМе, 2'-F и PS модификации, которые повышают стабильность направляющих PНК *in vivo* [77]. Полученные полностью модифицированные комплексы crPНК/tracrPНК были активны в клетках, хотя их эффективность редактирования была значительно снижена. Недавно был предложен новый подход по созданию химически модифицированных tracrPНК, включающий модификацию последовательности направляющей PНК. С помощью *in vitro* транскрипции с добавлением 2'-F-пиримидинов были получены tracrPНК с замещенными уридинами (U-замещенные tracrPНК). Для этого были использованы три типа модификации: одновременная модификация уридинов и цитозинов (2'-F-CU), модификация только уридинов (2'-F-U) и замена цитозинов на модифицированные аналоги (2'-F-C). Полученные модифицированные tracrPНК не проявляли высокую активность по сравнению с немодифицированной tracrPНК, однако 2'-F-модификация U-замещенной tracrPНК позволила снизить иммунный ответ [97].

Кроме структурных модификаций и модификаций сахаро-фосфатного остова направляющих PНК возможна модификация азотистых оснований. К примеру, введение инозина в crPНК приводит к снижению активности Cas9 *in vitro* и уменьшению специфичности (Рисунок 12) [98].

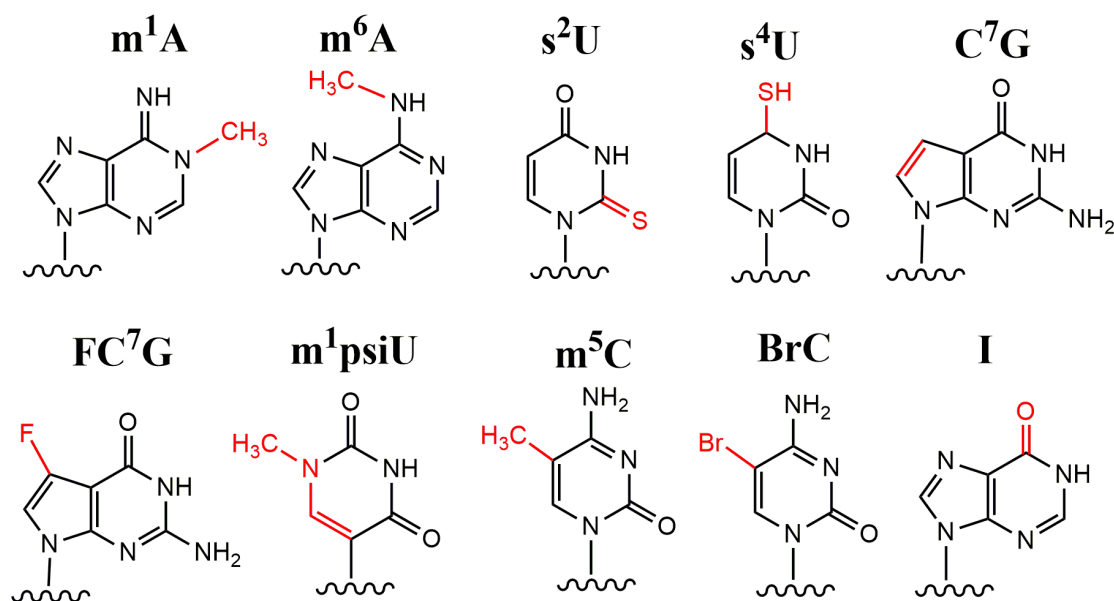


Рисунок 12. Модификации азотистых оснований в структуре crПНК, влияние которых на активность систем CRISPR/Cas были исследованы в работах [98–100]: N1-метиладенозин (m^1A) и N⁶-метиладенозин (m^6A), 2-тиоуридин (s^2U), 4-тиоуридин (s^4U), 7-дезагуанин (C^7G), 7-фтор-7-дезагуанин (FC^7G), N¹-метилпсевдоуридин (m^1psiU), 5-бромцитозин (BrC), 5-метилцитидин (m^5C), инозин (I).

Дальнейшее изучение влияния других неканонических азотистых оснований таких как: N¹-метиладенозина (m^1A) и N⁶-метиладенозина (m^6A), дестабилизирующих РНК:ДНК дуплекс, а также 2'-тиоуридина (s^2U) и 4'-тиоуридина (s^4U), наоборот повышающих стабильность РНК:ДНК комплекса, на активность системы CRISPR/Cas9 выявило, что включение трех s^4U или m^1A модификаций в направляющую crПНК полностью ингибирует активность белка Cas9, однако единичная s^4U группа вызывает противоположный эффект – значительно увеличивая его нуклеазную активность (Рисунок 12) [99]. С другой стороны, для направляющих РНК, модифицированных тремя s^2U мономерами, происходит снижение эффективности расщепления ДНК-субстрата. В то же время m^6A модификация в crПНК повышает эффективность работы системы CRISPR/Cas9 *in vitro*, но в клетках – менее эффективна. Таким образом, не всегда можно выявить прямую корреляцию между увеличением стабильности дуплекса модифицированной направляющей РНК с ДНК и активностью системы CRISPR/Cas9, кроме того, результаты *in vitro* экспериментов не всегда согласовываются с результатами на клетках [99]. Аналогично было исследовано влияние 7-дезагуанина (C^7G), 7-фтор-7-дезагуанина (FC^7G), N¹-метилпсевдоуридина ($m^1\psi$), 5-бромцитозина (BrC), 5-метилцитидина (m^5C), инозина и других модификаций в

направляющих РНК на работу системы CRISPR/Cas9 (Рисунок 12) [100]. Направляющие РНК с модифицированными пиримидинами, такими как m1Ψ и BrC, в комплексе с белком Cas9 эффективно расщепляли ДНК-субстраты [100]. Однако химическая модификация N7 в остатках гуанина во втором положении PAM приводила к ингибированию системы CRISPR/Cas9.

Таким образом, включение модификаций в PAM-дистальную область направляющей РНК более эффективно, чем в спейсерную, что согласуется с принципами распознавания мисматчей белком Cas9 в комплексе направляющая РНК:ДНК-мишень. Также в системе CRISPR/Cas9 чаще используются широко известные модификации, придающие направляющим РНК высокую стабильность к действию нуклеаз. В настоящее время существует огромное количество различных модификаций как для sgРНК, так и для crРНК и tracrРНК, которые позволяют изменять свойства системы CRISPR/Cas9 для её точного и эффективного функционирования *in vitro* и *in vivo*. Однако остается актуальной проблема достижения баланса между специфичностью и эффективностью модифицированной направляющей РНК, поэтому необходимы дальнейшие исследования для разработки направляющей РНК с оптимальными свойствами.

1.2.2.2 Модификация направляющих РНК системы CRISPR/Cas12 и Cas13

Основным отличием систем CRISPR/Cas12a и CRISPR/Cas13 от системы CRISPR/Cas9 является меньший размер белка и использование только одной короткой направляющей crРНК. Кроме того, по сравнению с CRISPR/Cas9: система CRISPR/Cas12a обладает большей специфичностью, но более низкой эффективностью редактирования генов, а CRISPR/Cas13 – единственная среди всех систем способна функционировать на уровне РНК. В настоящее время данные системы активно изучаются, и уже есть исследования о влиянии химических модификаций в направляющих РНК на активности нуклеаз Cas12a и Cas13.

По сравнению с природными crРНК химически модифицированные Cas12a crРНК более стабильны и обладают сравнимой или более высокой эффективностью редактирования. Исследования свойств, модифицированных направляющих crРНК, выявили области модификации и типы модификаций, включение которых влияет на эффективность расщепления целевой последовательности и/или на специфичность системы CRISPR/Cas12a. Изучение структуры направляющих Cas12a crРНК выявило, что область вблизи 3'-конца направляющих crРНК более толерантна к включению

большинства модификаций: ДНК, 2'-F и других групп, чем 5'-концевая область вблизи спейсера и seed-регион (Рисунок 13) [101]. 5'-область crРНК очень чувствительна к модификации, так как отвечает за взаимодействие с белком Cas12a [102], поэтому модификация данной области от 5-ти до 20-ти 2'-ОМе, 2'-F или PS группами полностью ингибирует функционирование системы CRSPR/Cas12a (Рисунок 13).

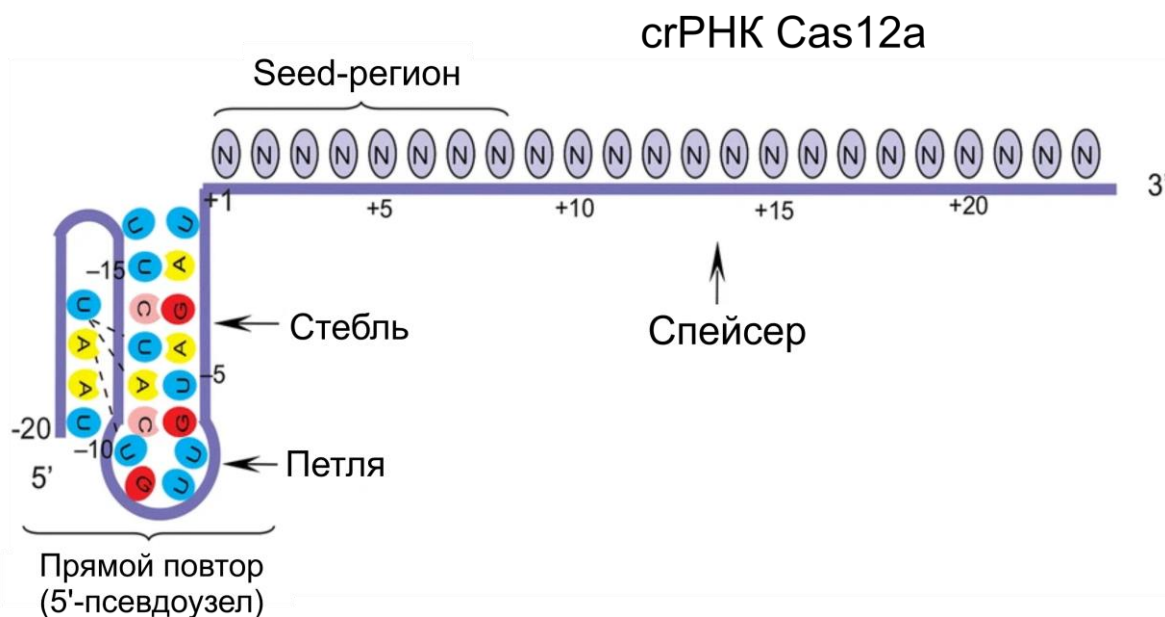


Рисунок 13. Структура crРНК системы CRSPR/Cas12a. Адаптировано из работы [22]

Включение 2'-F модификаций в crРНК увеличивает эффективность редактирования с помощью белка Cas12a за счет увеличения аффинности направляющей РНК к комплементарной последовательности ДНК, а также за счет повышения метаболической стабильности РНК. Например, 2'-F модификация практически всех положений 5'-структуры псевдоузла crРНК не снижает эффективность редактирования генов в клетках [101]. С другой стороны, метилирование 2'-ОН групп эффективно только при включении до пяти 2'-ОМе модификаций с 3'-конца crРНК, что позволяет подавлять неспецифическое связывание нуклеазы Cas12a. Тиофосфатные модификации часто снижают эффективность геномного редактирования. Было показано, что полная модификация crРНК PS группами приводит к ингибированию системы CRISPR/Cas12a в клетках HEK293T [103]. Однако включение тиофосфатных модификаций в РАМ-дистальные области, не вовлеченные во взаимодействие с белком Cas12, позволяет сохранять до 80% эффективности редактирования. Таким образом, активность системы CRISPR/Cas12a зависит от типа модификации.

Использование химерных ДНК-РНК направляющих РНК в системе CRISPR/Cas12a влияет как на эффективность, так и на специфичность. Путем частичной замены РНК на ДНК достигается низкая стоимость синтеза и высокая термодинамическая стабильность направляющих РНК. Было показано, что замена от одного до восьми рибонуклеотидов на их дезоксианалоги с 5'- или 3'-конца sgРНК позволяет сохранять высокую эффективность редактирования [104]. Кроме того, единичные ДНК нуклеотиды в РАМ-дистальной области sgРНК значительно увеличивают активность нуклеазы Cas12a в клетках [104]. С другой стороны, ДНК-мономеры вблизи seed-региона полностью ингибируют белок Cas12a. Например, дезоксирибонуклеотиды в 3-ем, 4-ом, 6-ом, и 7-ом положениях seed-региона sgРНК значительно снижают эффективность редактирования *in vitro* и *in vivo* [104]. Также 5'- или 3'- концевые дезоксирибонуклеотиды в направляющих РНК значительно увеличивают специфичность системы CRISPR/Cas12a. Увеличение точности системы обусловлено как отсутствием 2'-ОН групп sgРНК в области связывания с Cas12a, так и снижением энергии гибридизации между химерными направляющими sgРНК и мутантными ДНК-субстратами [104]. Одновременная модификация и белка Cas12a, и направляющей sgРНК является методом для увеличения как специфичности, так и эффективности системы CRISPR/Cas12a [105]. Например, применение мутантного Cas12a (enAsCas12a) и химерной sgРНК, в которой были заменены восемь 3'-концевых рибонуклеотидов на дезоксирибонуклеотиды, позволило в среднем увеличить целевую специфичность в 3 раза по сравнению с системой дикого типа, сохраняя при этом высокую эффективность редактирования.

По сравнению с белком Cas9, белок Cas12a более чувствителен к изменению длины направляющей sgРНК. Так уменьшение длины с 3'-конца sgРНК на пять нуклеотидов позволяет добиться высокого уровня редактирования генов [106]. В укороченные РНК могут быть введены различные химические модификации как на 5' и 3' конец, так и в определенные положения спейсера с сохранением активности системы CRISPR/Cas12a *in vitro* и *in vivo*. Например, короткие направляющие sgРНК, модифицированные PS-связями и 2'-ОМе группами, устойчивы к действию нуклеаз и способны проникать в клетку без помощи молекул-доставщиков [106]. С другой стороны, увеличение длины sgРНК за счет включения нескольких уридинов с 3'-конца повышает активность белка Cas12a до уровня сопоставимого с активностью нуклеазы SpCas9 [107]. Так, sgРНК с 7-нуклеотидным или 13-нуклеотидным удлинением на 3'-конце значительно увеличивает эффективность расщепления ДНК-субстратов. Однако, при использовании 2'-ОМе-нуклеотидов для

увеличения длины эффективности расщепления ДНК практически не изменяется. Дальнейшее изучение влияния длины crРНК на свойства системы CRISPR/Cas12a выявило, что увеличение длины направляющей РНК на 59-ть нуклеотидов с 5'-конца позволяет заметно повысить эффективность редактирования генов как *in vitro*, так и *in vivo* [108]. Модификация 5'-удлиненных crРНК 2'-ОМе-3'-фосфоротиоатами (MS), дезоксирибонуклеотидами и их комбинацией позволяет не только увеличить стабильность РНК к гидролизу, но и повысить эффективность редактирования [108].

Помимо изменения длины и введения химических модификаций также применяются структурные изменения crРНК. Примером может служить вставка разрывов или пропусков в области петли или включение дополнительных шпилек с 5' или 3'-конца направляющей РНК, которые приводят к эффективности редактирования генома сопоставимой с наблюдаемой для crРНК дикого типа (Рисунок 14) [109]. Кроме того, без потери активности нуклеазы Cas12a возможно удаление почти всей петли crРНК, за исключением рибонуклеотида в 10-ом положении (Рисунок 14). Таким образом, для увеличения эффективности и специфичности геномного редактирования, как и в случае системы CRISPR/Cas9, crРНК системы CRISPR/Cas12a могут быть модифицированы несколькими способами: путем оптимизации длины 3'- или 5'-областей, введения химических или структурных модификаций.

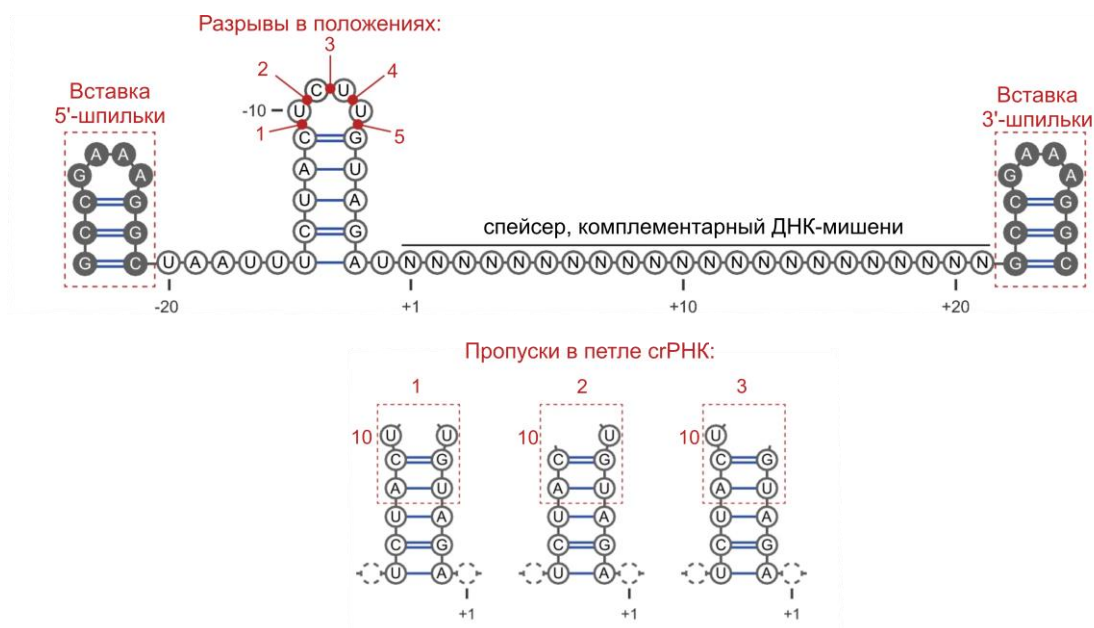


Рисунок 14. Структурные модификации crРНК системы CRISPR/Cas12a. Адаптировано из работы [109].

По сравнению с остальными системами CRISPR/Cas направляющие РНК Cas13 комплементарно взаимодействуют с РНК-мишенью, не затрагивая геномную ДНК. В 2020 г. для системы CRISPR/Cas13 были впервые синтезированы модифицированные sgРНК для увеличения эффективности подавления уровня транскриптов в клетках человека [110]. На 3'-конец sgРНК были введены следующие модификации: 2'-ОМе, тиофосфатные группы, или их сочетание [110]. Также было исследовано влияние инвертированного тимидина, играющего роль кэпа. Полученные химически модифицированные sgРНК увеличивали эффективность нокдауна белком Cas13 в клетках человека, но зависели от последовательности мишени [110]. Противоположный эффект вызывало введение инвертированного тимидина, а именно происходило снижение эффективности гидролиза независимо от РНК-мишени. Тестирование различных положений модифицированных мономеров выявило, что наиболее благоприятным местом включения модификаций является 3'-конец последовательности sgРНК, в то же время модификация петли шпильки или 5'-концевой области sgРНК снижает, а в некоторых случаях полностью ингибирует активность нуклеазы Cas13. Было показано, что сочетание 2'-ОМе и тиофосфатных групп не приводит к увеличению активности направляющих РНК по сравнению с использованием отдельных типов модификаций [110].

Описанное разнообразие модификаций для направляющих РНК позволяет не только бороться с нецелевыми эффектами, которые характерны для всех систем CRISPR/Cas, но и увеличивать их точность и эффективность с минимальными затратами времени и средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогресс от открытия и характеристики технологии CRISPR/Cas до создания на её основе сложных и точных инструментов редактирования генома произошёл с головокружительной быстротой. В течение последних 12-ти лет были разработаны и усовершенствованы системы CRISPR/Cas, которые постепенно приближают к возможности вносить необходимые изменения последовательности в геном любой живой клетки.

Нет сомнений в том, что системы CRISPR/Cas 2-го класса, особенно система CRISPR/Cas9, являются наиболее доступными и адаптируемыми инструментами для редактирования, регулирования, визуализации и обнаружения геномов различных организмов. Помимо редактирования ДНК и РНК, были найдены другие области применения инструментов на основе CRISPR: функциональный скрининг и диагностика. При этом проблемы, связанные с наличием побочных эффектов, включая ненаправленность, иммунологические реакции и проблему с доставкой компонентов геномного редактирования в клетки и организмы, остаются актуальными и необходимы дальнейшие исследования для их устранения или уменьшения.

В настоящее время одним из ключевых направлений исследований является повышение специфичности работы системы CRISPR/Cas9. Достижение высокой точности редактирования является одним из наиболее важных шагов для применения системы CRISPR/Cas9 в терапии *in vivo*. Хотя уровень нецелевого редактирования стал ниже, чем в первоначальных системах редактирования, необходима дальнейшая оптимизация системы CRISPR/Cas9. Для уменьшения нецелевых эффектов, разрабатываются различные стратегии, включая использование высокоточных вариантов Cas9 и модифицированных направляющих РНК.

Свойства и структура направляющих РНК влияют на активность системы CRISPR/Cas9. Как химические, так и природные модификации, способны улучшать эффективность и специфичность работы системы CRISPR/Cas9. Однако часто модификации направляющих РНК положительно влияют только на один из параметров либо на специфичность, либо на эффективность геномного редактирования. Все это указывает на актуальность задачи по разработке модифицированных направляющих РНК, которые обеспечат снижение или/и устранение нецелевых эффектов с одновременным сохранением высокого уровня эффективности редактирования ДНК-мишеней.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и оборудование

2.1.1 Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: агароза (AppliChem, США); бромистый этидий (AppliChem, США); Трис (ДИАЭМ, Россия); ДТТ («Serva», Германия); набор для выделения РНК из реакционных смесей на колонках LRU-100-50 (BiolabMix, Россия); набор для выделения ДНК из реакционных смесей на колонках DR-50 (BiolabMix, Россия); набор для выделения геномной ДНК из клеток D-cells-250 (BiolabMix, Россия); реакционная смесь БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (Biolabmix, Россия); набор для проведения T7-транскрипции *in vitro* (BiolabMix, Россия); набор реагентов для установления концентрации РНК Qubit RNA BR Assay Kit (ThermoFisher, США); вода, очищенная от РНКаз (DEPC) (BiolabMix, Россия); ДНКаза I, свободная от РНКаз (ThermoFisher, США); протеиназа К (MP Biomedicals, США); щелочная фосфатаза (ThermoFisher, США); рибонуклеаза А (Thermo Scientific, США); нуклеаза S1 (Thermo Scientific, США); фосфодиэстераза I (Thermo Scientific, США); рестрикционный фермент HindIII (New England BioLab, Англия); акриламид (Helicon, Россия); N,N'-метиленабисакриламид (Медиген, Россия); PSA (персульфат аммония) (Sigma-Aldrich, США); TEMED (тетраметилэтилендиамин) (MP Biomedicals, США); ДНК-маркеры «Sky High» и «Step 50» (ThermoFisher, США); РНК-маркер «RiboRuler Low Range RNA Ladder» (ThermoFisher, США); ингибитор РНКаз «RiboLock RNase Inhibitor» (ThermoFisher, США); дезоксирибонуклеозидтрифосфаты и рибонуклеозидтрифосфаты («Биосан», Россия); модифицированные рибонуклеозидтрифосфаты N6-метиладенозин, 5-метилцитидин, псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин (Biolabmix, Россия); этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Sigma, США); хлорид натрия (Sigma, США); хлорид магния (Sigma, США); хлорид калия (Sigma, США); HEPES (Sigma, США); глицерин (Sigma, США); перхлорат лития (Sigma, США); мочевины (Sigma, США); ацетон (Sigma, США); магнитные частицы (BiolabMix, Россия); PEG8000 (Sigma, США); парафин HISTOMIX (Био-Витрум, Россия) Triton X-100 (ДИАЭМ, Россия); борная кислота (Sigma, США); уксусная кислота (Sigma, США); BSA («Сибэнзим», Россия); набор для проведения трансфекции клеток Neon™ Transfection System Kit (Thermo Scientific, США); QIAcuity Probe PCR Master Mix (Qiagen, Германия).

Реактивы для культивирования клеток эукариот: ростовая среда Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (ThermoFisher, США); FBS (фетальная бычья сыворотка) (ThermoFisher, США); MEM Non-Essential Amino Acids Solution 1% (Gibco, США); пируват натрия (Gibco, США); GlutaMAX 2 mM (Gibco, США); раствор антибиотиков-антимикотиков (пенициллин, стрептомицина сульфат, амфотерицин) (Gibco, США).

Белок Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (плазмида pMJ806, Addgene, # 39312, Приложение А Рисунок А1) для *in vitro* экспериментов и белок Cas9 из *Streptococcus pyogenes* с двумя С-концевыми NLS SV40 (плазмида pMJ915, Addgene, # 69090, Приложение А Рисунок А2) для клеточных исследований были получены и очищены к.б.н. Закабуниным А.И. и к.б.н. А.В. Рябченко в лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН.

2.1.2 Оборудование и материалы

Вортекс персональный V-1 plus (BioSan, Латвия); дозаторы автоматические переменного объема Thermo («Ленпипет», Россия); микроцентрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия); микроцентрифужные пробирки вместимостью 1.5 и 2 мл (Axugen, США), наконечники с фильтром для автоматических дозаторов объемом 2, 10, 100, 200, 1000 мкл (Axugen, США); наконечники без фильтра для автоматических дозаторов объемом 2, 10, 100, 200, 1000 мкл (Axugen, США); штатив для микропробирок (Хеликон, Россия); культуральные планшеты 24-луночные (TPP, Швейцария); центрифужные пробирки объемом 15 и 50 мл (TPP, Швейцария); мини-ротатор для пробирок BIO RS-24 (Biosan, Латвия); амплификатор Real-Time CFX96 (Bio-Rad, США); пробирки в стрипах по 8 штук (SSI, Дания); плашки 96-луночные для проведения ПЦР; центрифуга Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Германия); спектрофотометр Apollo LB 912 (Berthold Technologies, Германия); Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Англия); набор для горизонтального электрофореза (Bio-Rad, США); набор для вертикального электрофореза Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, США); источник тока Эльф-8 (ДНК-Технология, Россия); инкубатор для клеточных культур (Heraeus HERA cell, Германия); Gel Doc XR System (Bio-Rad, США); автоматический синтезатор ASM800 (Biosset, Россия); генетический анализатор ABI 3500 (ThermoFisher, США); амплификатор Light Cycler 96 (Roche, Швейцария); прибор для проведения цифровой ПЦР QIAcuity One Platform System (Qiagen, Германия); 24-луночные наноплашки QIAcuity для цифровой ПЦР (Qiagen, 250001); автоматическая станция

Allsheng-AS-17060-Dx (Allsheng, Китай); прибор Neon™ Transfection System для трансфекции (Thermo Scientific, США).

2.1.3 Буферы и растворы

TBE: 89 мМ Трис, 89 мМ борная кислота, 2мМ ЭДТА (pH 8.0);

ТАЕ: 40 мМ Трис, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА (pH 7.6)

Буфер для гидролиза РНК: 10 мМ Трис–HCl (pH 8.0), 5 мМ MgCl₂, 0.1 М KCl, 0.02% Triton X-100, 0.1 мг/мл BSA, 0.65 мг/мл рибонуклеаза А, 4 мкг/мл нуклеаза Р1, 0.2 мг/мл фосфодиэстераза I and 2 ед. щелочная фосфатаза;

Реакционный буфер NEPERES: 20 мМ NEPERES (pH 7.5), 125 мМ KCl, 7% глицерин, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, 6 мМ MgCl₂;

Буфер для остановки реакции: 60 мМ ЭДТА, 4М мочевины, 0.4 мг/ мл протеиназа К;

Буфер для связывания магнитных частиц: 0.5 М NaCl, 20% PEG 8000

2.1.4 Олигонуклеотиды и направляющие РНК

В Таблица 1 приведены последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе. Олигонуклеотиды и зонды были синтезированы в лаборатории синтетической биологии ИХБФМ СО РАН.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов.

Название	Последовательность 5'-3'
Протоспейсеры гена ANXA6	
ANX1	GTTGGACATGCTCGACATTC
ANX2	CATGGTCTCCCGTAGTGAGT
ANX3	TCGACATTCGGGAGATCTTC
Праймеры для синтеза ДНК-матриц для tracrPНК и sgPНК	
sgPНК_Foward	ATGCAGCTAATACGACTCACTATAGGTTG GACATGCTCGACATTCG
sgPНК_Reverse	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACT
tracrPНК_Foward	ATGCAGCTAATACGACTCACTATAGTCTA GCAAGTTAAAT
tracrPНК_Reverse	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACT
Праймеры для наработки флуоресцентно-меченых ДНК-субстратов	
Forward _ДНК субстрат_ целевая цепь	GCATCTTCGGTTGGTGTTCG

Reverse _ДНК субстрат_ нецелевая цепь	TTGTGTCTTCGTCAGTCCCG
Forward-FAM _нецелевая цепь	FAM-GCATCTTCGGTTGGTGTTCG
Reverse-FAM _целевая цепь	FAM-TTGTGTCTTCGTCAGTCCCG
Forward _мисматчи	AATATTTTGCTGAAAGGCTCTTCAA
Reverse _мисматчи	TTGTGTCTTCGTCAGTCCCG
Праймеры и зонды для проведения цифровой ПЦР	
Forward _ANX_dPCR	CCTCTCAAGTCCATGTTCCCC
Reverse _ANX_dPCR	GGAATGTCCAAGAGACTCCCA
Probe_cleavage_FAM_ANX	[FAM]ACATTCGGGAGATCTTCCGGACCA AGT[BHQ1]
Probe_control_HEX _ANX	[HEX]AGCTCATGGGGGCAGAGAAGGGAG CA[BHQ1]

Список направляющих РНК, использованных в работе представлен в Таблица. 2. Немодифицированные sgРНК и sgРНК с тиофосфатными модификациями были получены в лаборатории синтетической биологии ИХБФМ СО РАН. В коллаборации лаборатории синтетической биологии и лаборатории химии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН были синтезированы химерные sgРНК, содержащие остатки дезоксирибонуклеотидов с ФГ-группами. Направляющая sgРНК, содержащая 2'-F группы была любезно предоставлена лабораторией химии РНК ИХБФМ СО РАН к.х.н. Новопашиной Д.С. Для оценки специфичности были использованы 16 ДНК-субстратов с мисматчами в области протоспейсера ANX1 и один целевой субстрат, которые были синтезированы в лаборатории синтетической биологии к.х.н. Шевелевым Г.Ю (Приложение Б).

Таблица. 2. Список направляющих РНК, использованных в работе. Черным цветом обозначены ДНК мономеры, а серым – РНК; * – отмечены ФГ-группы; подчеркнуты 2'-F группы; PS – обозначены тиофосфатные группы.

Название	Последовательность 5'–3'	Протоспейсер
sgРНК_1	GGUUGGACAUGCUCGACAUCGUUUUAGUGCUAGAAA UAGCAAGUUA AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU	№1

sgPHK_2	GCAUGGUCUCCCGUAGUGAGUGUUUUAGUGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU	№2
sgPHK_3	GUCGACAUUCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU	№3
tracrPHK NM	UCUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU	
crF	GGUUGGACAUGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUG <u>C</u> UAGA	№ 1
3PS	G ^{PS} G ^{PS} U ^{PS} UGGACAUGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAG A	
IG4_PS	GGU ^{PS} GGACAUGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	
cr1gg	GGUUGGACAUGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	
IG0	GGTTGGACATGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	
IG2	GG*TTGGACATGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	
IG3	GGT*TTGGACATGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	
IG4	GGTT*GGACATGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	
IG5	GGTTG*GACATGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	
IG6	GGTTGG*ACATGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	
IG7	GGTTGGA*CATGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	
IG8	GGTTGGAC*ATGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	
IG9	GGTTGGACA*TGCUCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	
IG10	GGTTGGACAT*G <u>C</u> UCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	
IG11	GGTTGGACATG* <u>C</u> UCGACA <u>U</u> UCGUUUUAGUGCUAGA	

IGA	GG*TT*GGACATGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IGH	GG*TT*GG*ACATGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IGZ	GG*TTG*GAC*ATG*CUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IGK	GG*T*TGGACATGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IGL	GG*T*T*GGACATGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IGM	GGTTGGACAT*G*CUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IGN	GGTTGGACA*T*G*CUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IGF	GG*T*T*G*G*A*C*A*T*G*CUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA	
cr2gg	GCAUGGUCUCCCGUAGUGAGUGUUUUAGUGCUAGA	№ 2
IG0	GCATGGTCTCCCGUAGUGAGUGUUUUAGUGCUAGA	
IG4	GCAT*GGTCTCCCGUAGUGAGUGUUUUAGUGCUAGA	
IG8	GCATGGTC*TCCCGUAGUGAGUGUUUUAGUGCUAGA	
IGA	GC*AT*GGTCTCCCGUAGUGAGUGUUUUAGUGCUAGA	
IGH	GC*AT*GG*TCTCCCGUAGUGAGUGUUUUAGUGCUAGA	
IGZ	GC*ATG*GTC*TCC*CGUAGUGAGUGUUUUAGUGCUAGA	
IGK	GC*A*TGGTCTCCCGUAGUGAGUGUUUUAGUGCUAGA	
cr3gg	GUCGACAUUCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	№ 3
IG0	GTCGACATTCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IG4	GTCG*ACATTCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IG8	GTCGACAT*TCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IGA	GT*CG*ACATTCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	

IGH	GT*CG*AC*ATTCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IGZ	GT*CGA*CAT*TCG*GGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IGK	GT*C*GACATTCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IG0_4D	GTCGACAUCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IG2_4D	GT*CGACAUCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IG3_4D	GTC*GACAUCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IG4_4D	GTCG*ACAUCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	
IGK_4D	GT*C*GACAUCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	
3PS_3	G ^{PS} U ^{PS} C ^{PS} GACAUCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAG A	
IG4_PS_3	GUCG ^{PS} ACAUCGGGAGAUCUUCGUUUUAGUGCUAGA	

2.2 Методы

2.2.1 Дизайн плазмиды для синтеза направляющих РНК

Ранее для фрагмента гена *ANXA6* человека (NM_001155.4) были подобраны три протоспейсера с минимальной прогнозируемой нецелевой активностью, нацеленные на 12 экзон (см. разд. 2.1.4) [111]. Сотрудниками лаборатории геномного редактирования ИХБФМ СО РАН данные последовательности были заклонированы в плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458, Addgene #48138, Приложение А Рисунок А3). В рамках данной работы эта конструкция была использована для получения ДНК-матриц для последующего синтеза направляющих РНК.

2.2.2 ПЦР для наработки ДНК-дуплексов и ДНК-матриц

Флуоресцентно-меченые ДНК-дуплексы, кодирующие фрагмент гена *ANXA6*, были синтезированы путем ПЦР-амплификации плазмиды PX458 с флуоресцентно-мечеными праймерами (Приложение Б). При этом для синтеза целевой цепи ДНК использовался прямой (с FAM-меткой) и обратный праймеры, а для нецелевой цепи наоборот (см.разд.

2.1.4). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 10 нг ДНК-матрицы, буфер HS-Taq ПЦР-Color, по 6 мМ каждого праймера. Программа для амплификации необходимого участка включала следующие стадии: 1) предварительная денатурация в течение 5 мин при 95 °С, 2) 35 циклов, включающих денатурацию в течение 10 с при 95 °С, отжиг праймеров в течение 30 с при 60 °С (ДНК-дуплексы) или 10 с при 58 °С (ДНК-матрицы), элонгацию в течение 20 с при 72 °С, 3) финальная элонгация в течение 5 мин при 72 °С. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле, и визуализировали с помощью окрашивания бромистым этидием. Определение длины продуктов проводили по ДНК-маркеру Sky High. Выделение ДНК проводили набором DR-50 в 60 мкл буфера для элюции EB (см. разд. 2.1.1).

Аналогично проводили наработку ДНК-матриц для синтеза sgРНК и tracrРНК. Из расчета 1 нг матрицы на одну реакцию (25 мкл).

16 ДНК-субстратов с мисматчами в области протоспейсера направляющей РНК и один контрольный субстрат, содержащими фрагмент гена *ANXA6*, были собраны из библиотеки олигонуклеотидов с соответствующими мисматчами (Приложение В). По описанному выше протоколу методом ПЦР с прямым флуоресцентно-меченым праймером (см. разд. 2.1.4) были синтезированы флуоресцентно-меченые ДНК-субстраты с мутациями.

2.2.3 Синтез sgРНК и tracrРНК *in vitro*

Короткие crРНК синтезировали на автоматическом синтезаторе АСМ800 («Биоссет», Россия) стандартным твердофазным фосфитамидным методом. Все tracrРНК и sgРНК (Таблица 1) были получены с помощью T7-транскрипции *in vitro* с использованием ДНК-матриц.

Транскрипцию tracrРНК и sgРНК *in vitro* проводили при 37°C в течение 4 ч и 16 ч соответственно. Для получения полностью модифицированных tracrРНК/sgРНК соответствующие канонические мономеры заменяли на модифицированные нуклеозид трифосфаты m6A, m5C, Ψ и m1Ψ (BiolabMix, Россия). Глубину модификации варьировали (10, 25, 50, 60, 75, 100%), изменяя соотношения модифицированных трифосфатов к каноническим аналогам: m6АТР/АТР, m5СТР/СТР, ΨТР/УТР и m1ΨТР/УТР. Реакционная смесь объемом 100 мкл содержала 300 нг ДНК-матрицы, 18 ед. акт. РНК-полимеразы T7 из бактериофага T7 (Biosan, Россия), буфер для транскрипции и смесь рНТФ по 3 мМ каждого. После реакции проводили гидролиз ДНК-матриц, добавляя 1 ед. акт. ДНКазы I на каждые

100 мкл реакционной смеси и инкубируя смесь при 37°C в течение 30 мин. РНК выделяли фенол-хлороформной экстракцией с использованием набора LRU-100-50 с адсорбцией РНК на колонках (BiolabMix, Россия) и элюировали в 60 мкл стерильной воды. Очищенную РНК анализировали с помощью гель-электрофореза и количественно определяли путем измерения концентрации набором Qubit RNA BR Assay Kit.

2.2.4 Расщепление плазмидного ДНК-субстрата *in vitro*

В экспериментах использовали плазмиду рАНХА6, несущую фрагмент гена ANXA6 (рАНХА6, OriGene # RC202086, Приложение А Рисунок А4). Предварительно crРНК гибридизовали с tracrРНК (по 0,2 мкМ) в воде при 95°C в течение 30 с, а затем охлаждали 3 мин на льду для образования дуплекса. При использовании sgРНК (0,2 мкМ) данный этап пропускали. Для получения каталитически активных комплексов 0,2 мкМ белок Cas9 инкубировали с направляющими РНК в реакционном буфере HEPES (см. раз. 2.1.3). К 50-кратному избытку комплекса Cas9/crРНК:tracrРНК или Cas9/sgРНК добавляли плазмиду 0,008 мкМ рАНХА6, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Для инактивации нуклеазы Cas9 смесь помещали в лед с добавлением 10 мкл буфера с протеиназой К (см. раз. 2.1.3) и 1 мкл 50 мМ ЭДТА с последующей инкубацией при 37 °C в течение 15 мин. Продукты расщепления плазмиды разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле, окрашивали 0,5 мкг/мл бромистого этидия и визуализировали с помощью УФ-спектрофотометра.

Результаты гель-электрофореза количественно рассчитывали с использованием программы Quantity One 4.6.8 (Bio-Rad, США). Процент одно- и двуцепочечного расщепления плазмиды (SSB и DSB соответственно) и общего расщепления рассчитывали по формулам 1-3:

$$\text{Одно – цепочечное расщепление} = \frac{I_{\text{рел}}}{I_{\text{рел}} + I_{\text{лин}} + I_{\text{суперск}} \cdot k} \cdot 100\% \quad (1)$$

$$\text{Двуцепочечное расщепление, \%} = \frac{I_{\text{лин}}}{I_{\text{рел}} + I_{\text{лин}} + I_{\text{суперск}} \cdot k} \cdot 100\% \quad (2)$$

$$\text{Общее расщепление, \%} = DSB + SSB \quad (3)$$

где I — интенсивность полос, соответствующих релаксированной ($I_{\text{рел}}$), линейной ($I_{\text{лин}}$) и суперскрученной ($I_{\text{суперск}}$) формы плазмиды, а $k = 1.14$ — коэффициент интеркаляции

бромистого этидия в суперскрученную форму плазмиды. Также были внесены дополнительные поправки в распределение плазмидных форм в отсутствие белка Cas9.

2.2.5 Определение содержания неканонических мономеров в составе РНК, полученных ферментативно

Исчерпывающий ферментативный гидролиз РНК проводили в буфере для гидролиза РНК (см.разд. 2.1.3). Реакционную смесь инкубировали от 2 до 18 ч при 37°C, затем ферменты дезактивировали при 75°C в течение 10 мин. Нерастворимую фракцию отделяли центрифугированием при 12000×g в течение 3 мин. Супернатант экстрагировали хлороформом и сушили в вакууме. Выпаренные осадки растворяли в деионизированной воде и анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с многоволновым УФ-детектированием на колонке ProntoSIL-20-3-C18 AQ на хроматографе серии Милихром А-02 (ЭкоНова, Новосибирск).

2.2.6. Расщепление ДНК-дуплексов *in vitro*

Флуоресцентно-меченые ДНК-субстраты (Приложение В) и ДНК-субстраты с мутациями (Приложение Б) получали путем ПЦР-амплификации плазмиды pANXA6 с флуоресцентно-мечеными праймерами. Эксперименты проводили в тех же условиях, что описаны для плазмидного субстрата, за исключением времени проведения реакции и концентраций компонентов (конечные концентрации: 0,25 мкМ Cas9, 1,25 мкМ tracrRNA и 1,25 мкМ crRNA или 0,25 мкМ Cas9 и 1,25 мкМ sgRNA; 0,01 мкМ ДНК-дуплекса). Время инкубации варьировали в зависимости от задачи: 1) кинетические реакции останавливали через 0, 30, 60, 120, 180, 360 или 1440 мин; 2) реакции расщепления для определения глубины природной модификации останавливали через 120 мин; 3) реакции расщепления для оценки специфичности природных модификаций проводили в течение 120 мин; 4) реакции расщепления для оценки специфичности ФГ-химерных crRNA проводили в течение 1440 минут. Продукты расщепления были очищены с помощью магнитных частиц, затем 5-10 нг продуктов были высушены на SpeedVac при 60 °C.

Результаты были проанализированы методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI 3500 (ThermoFisher, США). Эффективность расщепления рассчитывали как процент интегрированной площади пиков продукта по отношению к сумме пиков субстрата и продукта. Кинетические кривые были обработаны в программе «SigmaPlot 11.0» и аппроксимированы с помощью формулы 4:

$$P(t) = A_{\text{макс}}(1 - e^{-k_{\text{наб}}t}) \quad (4)$$

где $P(t)$ — количество продукта в момент времени t , $A_{\text{макс}}$ — максимальная теоретическая степень расщепления дуплекса, а $k_{\text{наб}}$ — наблюдаемая константа скорости. Показатель специфичности ($S_{NM}^{mod.}$) для модифицированной РНК (mod.) относительно контрольной РНК (NM) - рассчитывали по формуле 5:

$$S_{NM}^{mod.} = \frac{r_{on}^{mod.}/r_{off}^{mod.}}{r_{on}^{NM}/r_{off}^{NM}} \quad (5)$$

где r_{on} и r_{off} — средние значения эффективности расщепления контрольного ДНК-дуплекса (WT) и ДНК-дуплексов с мисматчами соответственно.

2.2.7. Выделение ДНК с помощью магнитных частиц

Продукты Cas9-опосредованного расщепления протяженных линейных ДНК-субстратов выделяли магнитными частицами (Биолабмикс, Россия) на автоматической станции Allsheng-AS-17060-Dx (Allsheng, Китай). Для приготовления реагента с магнитными частицами к магнитным частицам добавляли буфер для связывания (см. разд. 2.1.3) в соотношении 1:8. Выделяемую ДНК смешивали с реагентом в 2.5-кратном избытке, смесь инкубировали в течение 5 мин при 25 °С. После отделения магнитных частиц магнитным штативом удаляли надосадочную жидкость. Частицы отмывали 100 мкл 80% этанолом. После отмывки этанол удаляли, осадок высушивали на воздухе в течение 10 минут. ДНК элюировали в 10 мкл воды с инкубацией 5 мин при 25 °С.

2.2.8. Неон трансфекция РНП клеток 293Т

В буфере для ресуспендирования (буфер R из Neon™ Transfection System Kit (Thermo Scientific, США)) подготавливали смеси объемом 10 мкл, состоящие из направляющих РНК (sgРНК или crРНК:tracrРНК) и стерильного белка *Streptococcus pyogenes* Cas9 NLS (по 100 пмоль каждого компонента). В случае использования crРНК:tracrРНК осуществляли предынкубацию при 90 °С в течение 5 мин. Для формирования РНП проводили инкубацию при комнатной температуре (20–25 °С) в течение 15 мин. Клетки НЕК293Т/17 собирали, промывали и распределяли в отдельные пробирки по 2×10^5 клеток на пробирку. Затем клетки ресуспендировали в буфере R с РНП. Трансфекцию проводили по протоколу производителя Неон с использованием насадки объемом 10 мкл со следующими параметрами: 1450 В/30 мс/1 импульс. В качестве

отрицательного контроля использовали клетки 293T, ресуспендированные в буфере R без добавок и подвергнутые стандартной «негативной» трансфекции производителя (0 В/1 мс/0 импульсов). После трансфекции клетки переносили в 500 мкл среды DMEM/F12 с 10% сыворотки FBS и без добавления антибиотиков, и инкубировали при 37 °C во влажном CO₂-инкубаторе. Через два дня после трансфекции геномную ДНК выделяли набором D-cells-250 (BiolabMix, Россия). Эффективность редактирования (%) анализировали с помощью цифровой ПЦР.

2.2.9. Цифровая ПЦР

Для оценки эффективности редактирования системой CRISPR/Cas9 целевого гена ANXA6 в культуре клеток проводили цифровую ПЦР. Праймеры и зонды подобрали с помощью сайта Primer3 plus (<http://primer3plus.com>).

Контрольный зонд содержал флюорофор 5'-HEX (гексахлорфлуоресцеин), а зонд, специфичный для сайта мутации, включал 5'-FAM (флуоресцеин) метку. Оба зонда содержали на 3'-конце тушител ВНQ-1. Цифровую ПЦР проводили на платформе QIAcuity One Platform System (Qiagen, Германия). Реакционная смесь объемом 40 мкл состояла из: 10 мкл 4×QIAcuity Probe PCR Master Mix (Qiagen, Германия), 15 нг геномной ДНК, праймеров (0,8 мкМ), контрольного зонда (0,4 мкМ), зонда на мутацию (0,04 мкМ), и фермента рестрикции HindIII (0,25 ед./мкл, New England BioLab, Великобритания). Каждую реакцию предварительно смешивали в планшете, а затем переносили в 24-луночный планшет QIAcuity Nanoplate (Qiagen, Германия). Программа термоциклирования включала следующие стадии: 1) предварительная денатурация в течение 2 мин при 95 °C, 2) 40 циклов, включающих денатурацию в течение 15 с при 95 °C и отжиг праймеров в течение 30 с при 60 °C. Последней стадией была визуализация, которая включала считывание как мутантного (канал FAM), так и контрольного (канал HEX) сигналов. Данные анализировали с помощью программного обеспечения QIAcuity Suite V1.1.3. 193. Эффективность редактирования генов рассчитывали как соотношение между популяцией клеток положительных только по зонду на место предполагаемой мутации с FAM (только FAM-положительные точки) и популяцией положительной по обоим каналам (HEX/FAM-двойные положительные точки).

2.2.10. Статистика

Статистический анализ проводился с использованием двустороннего t-критерия Стьюдента. Все планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение от

среднего. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$. Формула t-критерия Стьюдента для независимых выборок 6:

$$t = \frac{|M_1 - M_2|}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{N_1} + \frac{\sigma_2^2}{N_2}}} \quad (6)$$

где M_1 – среднее арифметическое первой выборки, M_2 – среднее арифметическое второй выборки, σ_1 – стандартное отклонение первой выборки, σ_2 – стандартное отклонение второй выборки, N_1 – объем первой выборки, N_2 – объем второй выборки.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В настоящее время существует множество областей применения системы CRISPR/Cas9. Однако остаются актуальными проблемы данной технологии, связанные с ошибками в расщеплении ДНК и цитотоксичностью. На сегодняшний день наиболее популярными стратегиями борьбы с данными препятствиями являются получение мутантных вариантов белка Cas9 и модификация направляющих РНК, как в виде sgРНК, так и в виде комплекса crРНК и tracrРНК. По сравнению с разработкой новых нуклеаз Cas9 синтез модифицированных направляющих РНК представляется более простым, эффективным и экономически выгодным подходом.

Наиболее известными химическими модификациями направляющих РНК являются модификации сахарофосфатного остова, которые вводятся с помощью твердофазного синтеза. Одной из них является фосфорилгуанидиновая (ФГ) группа. Ранее ФГ-группы в комбинации с 2'-О-метилованием были введены в малые интерферирующие РНК, что позволило снизить нецелевую активность и повысить уровень подавления экспрессии целевых генов [112]. С другой стороны, природные модификации малоизучены, за исключением 2'-О-метилованных рибонуклеотидов. Однако включение природных неканонических мономеров в синтетические РНК способствует снижению клеточного иммунного ответа, а также могут быть использованы как для синтеза аналогов коротких регуляторных РНК, например, малых ядрышковых РНК [113], так и для увеличения эффективности трансляции искусственных мРНК при трансфекции в клетки человека [114].

В данной работе была проведена оценка влияния как модифицированных нуклеотидных остатков, так и остатков дезоксирибонуклеотидов с ФГ-группами в структуре направляющих РНК на активность и специфичность функционирования системы CRISPR/Cas9.

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

3.1.1. Включение модифицированных азотистых оснований в tracrРНК

3.1.1.1. Синтез направляющих РНК с различной глубиной модификации

В данной работе для модификации sgРНК и tracrРНК, были выбраны четыре модифицированных мономера, которые обнаруживаются в природных типах РНК, а именно: m6A, m5C, Ψ и m1Ψ (Рисунок 15).

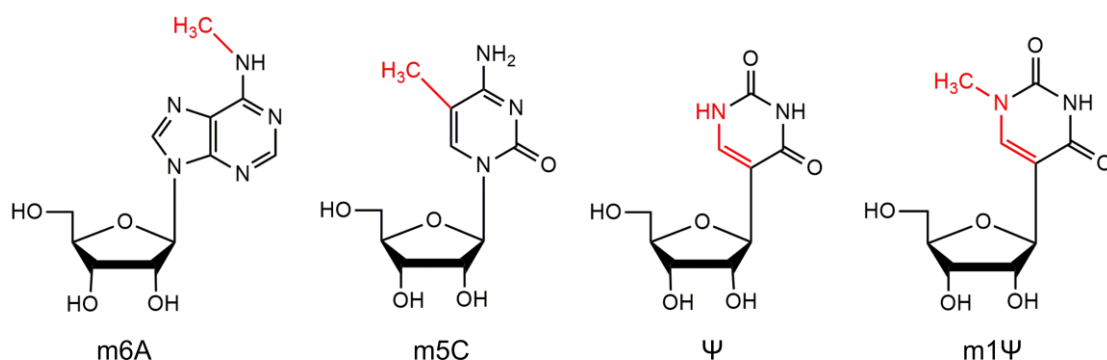


Рисунок 15. Модифицированные нуклеозиды m6A, m5C, Ψ и m1Ψ, которые были использованы в работе.

Для оценки влияния выбранных неканонических нуклеотидных остатков методом Т7-транскрипции *in vitro* были синтезированы модифицированные sgРНК и tracrРНК (Рисунок 16).

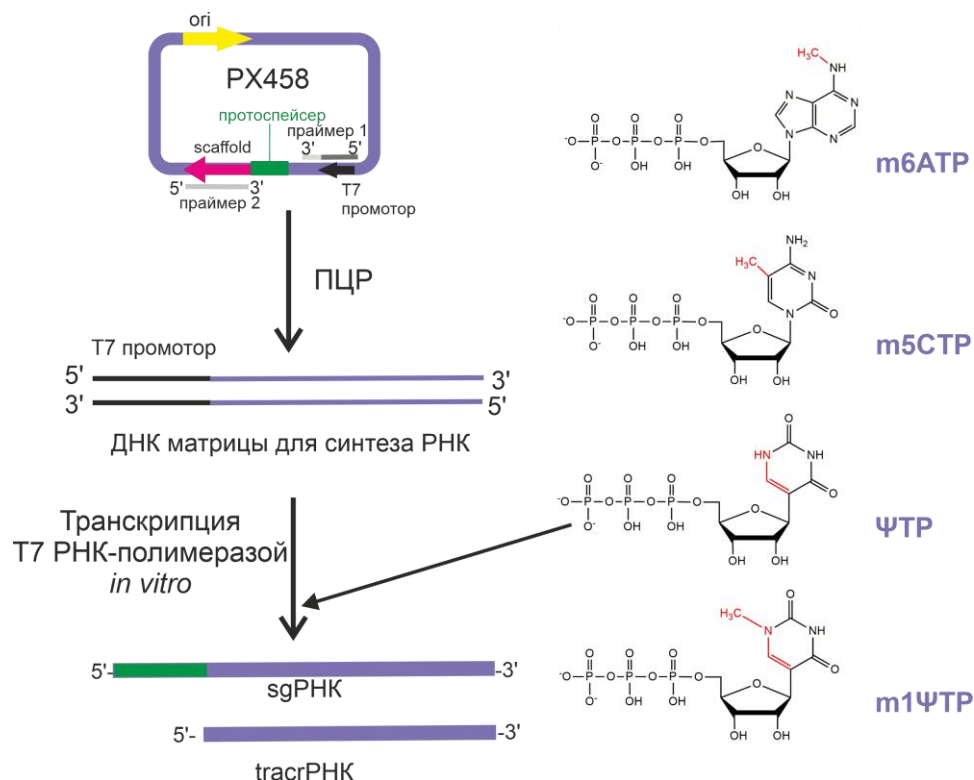


Рисунок 16. Схема синтеза sgРНК и tracrРНК, содержащих модифицированные нуклеотидные остатки m6A, m5C, Ψ и m1Ψ. В плазмиде PX458 зеленым цветом обозначен протоспейсер ДНК-мишени, черным – T7- промотор РНК-полимеразы фага T7, желтым ori – участок начала репликации, а малиновым – невариабельный фрагмент направляющих РНК (scaffold). Серым цветом указаны праймеры для получения ДНК-матриц с фрагментом гена ANXA6.

Известно, что во время транскрипции модифицированные мономеры статистически включаются в РНК и глубина модификации варьируется в зависимости от начального соотношения модифицированный/немодифицированный нуклеозид трифосфат (НТФ) вследствие разной эффективности их включения. Поэтому в рамках данной работы для достижения эквивалентных условий была проведена оценка глубины модификации путем исчерпывающего гидролиза модифицированной направляющей РНК до рибонуклеозидов с последующим анализом продуктов методом высокоэффективной обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ с многоволновой УФ-детекцией). В результате было показано, что остатки m6A включаются в 26% возможных положений направляющей РНК при использовании транскрипционной смеси с 50% исходным содержанием неканонического мономера. Для остатков m5C, Ψ и m1Ψ, в тех же условиях, глубина модификации составляет 48%, 38% и 30% соответственно (Рисунок 17). Таким образом, во

всех дальнейших экспериментах ожидаемую глубину модификаций sgРНК и tracrРНК рассчитывали, исходя из содержания, модифицированного НТФ в реакционной смеси и проанализированной относительной эффективности включения.

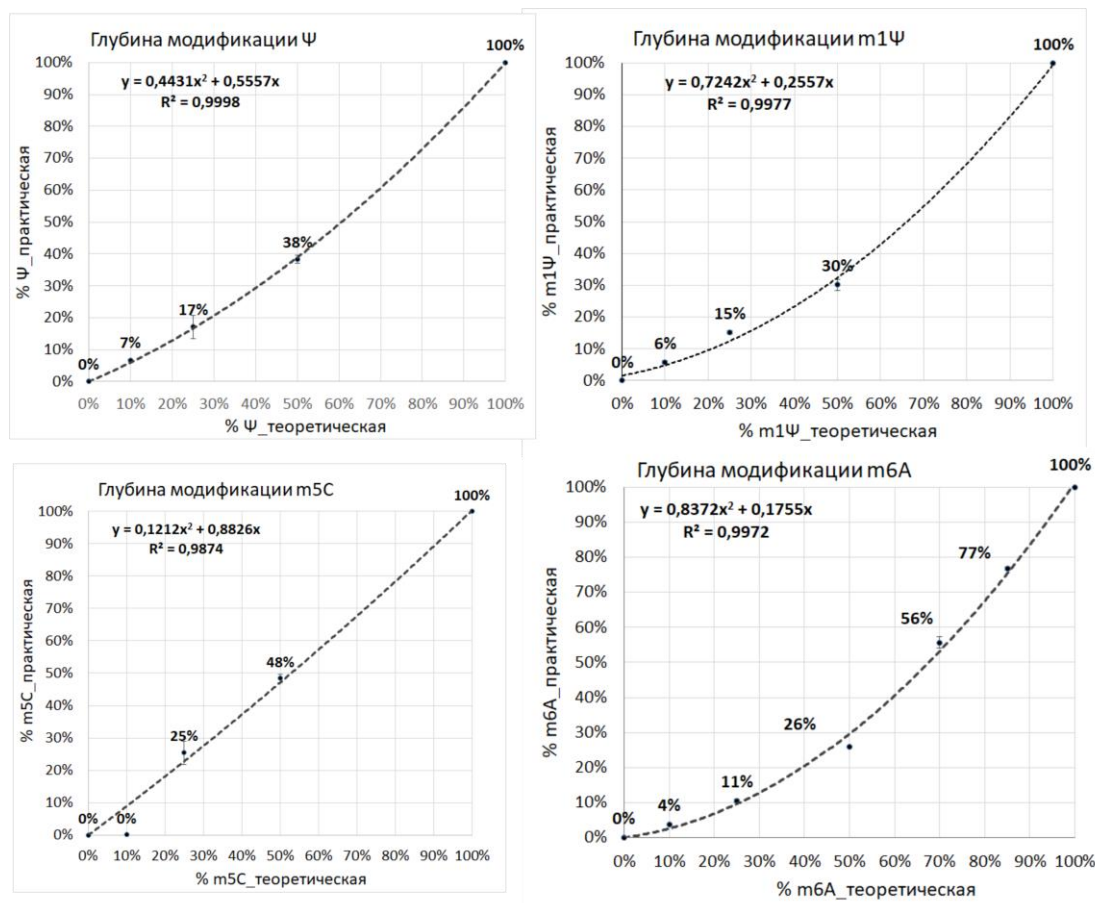


Рисунок 17. Сравнение теоретической и практической глубины модификации направляющих РНК, содержащих Ψ, m1Ψ, m5C и m6A. Указаны уравнения для расчета необходимого процентного соотношения модифицированный/немодифицированный НТФ для каждой модификации.

Для определения влияния остатков m6A, m5C, Ψ и m1Ψ в составе sgРНК или tracrРНК на активность системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 *in vitro*, были использованы два метода: гидролиз плазмидного субстрата с последующим электрофорезом в агарозном геле и гидролиз протяженных флуоресцентно-меченых линейных ДНК-субстратов с последующим денатурирующим капиллярным гель-электрофорезом (Рисунок 18).

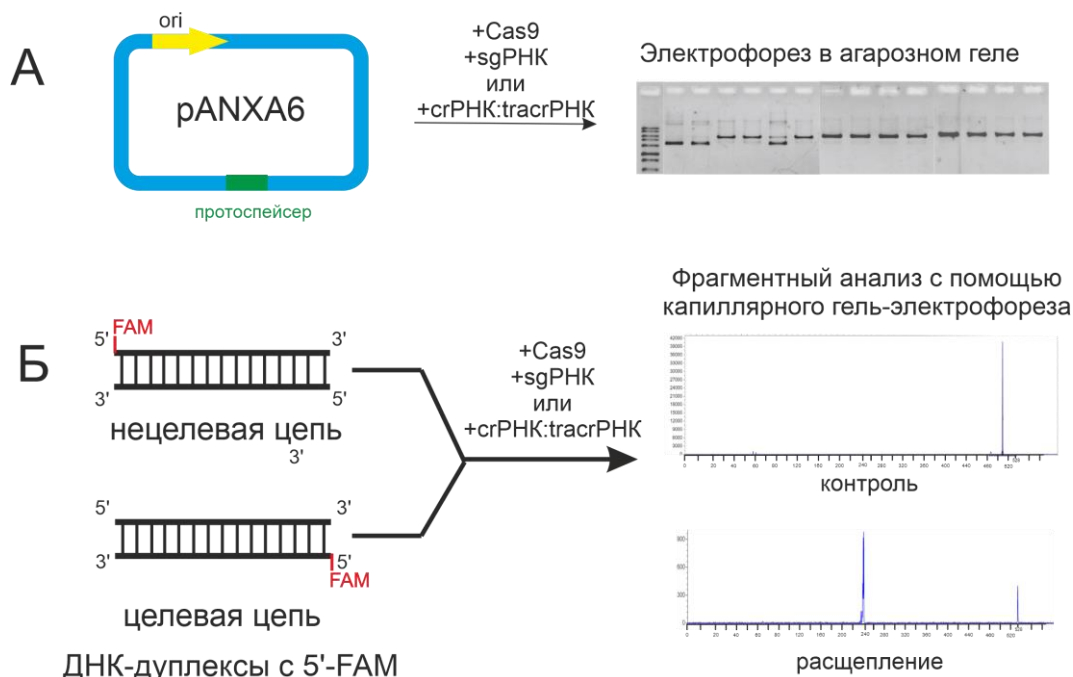


Рисунок 18. Модели для оценки активности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* на ДНК-субстратах. А – плаزمида (pANXA6) несущая фрагмент гена ANXA6 и использованная для качественной оценки протекания реакции; Б – флуоресцентно-меченые ДНК-дуплексы для количественного анализа эффективности расщепления. Флуоресцеин (FAM) был присоединен с 5'-конца целевой или нецелевой цепи ДНК-дуплекса.

Плазмидный субстрат был использован для качественной оценки протекания реакции, а с помощью флуоресцентно-меченых ДНК-дуплексов был проведен количественный анализ эффективности расщепления ДНК-субстратов. Наличие флуоресцентной метки только на одной цепи ДНК-дуплекса позволяло оценивать эффективность гидролиза конкретной цепи.

Все ДНК-субстраты содержали фрагмент человеческого гена ANXA6. Ген ANXA6 является членом семейства аннексиновых белков, которые представляют собой многофункциональные кальциевые и мембраносвязывающие белки [115]. ANXA6 участвует в регуляции миграции холестерина, рецепторов клеточной мембраны, выполняет функцию каркаса для связывания мембранных микродоменов с цитоскелетом и др [115]. Из литературных данных известно, что подавление экспрессии гена ANXA6 увеличивает наработку вируса гриппа А в клетках человека, что может быть использовано при создании высоко перmissive клеточной линии для проверки вакцин против гриппа [111]. Выбранный нами фрагмент гена ANXA6 представляет собой наиболее вариативную последовательность. Ранее в нашей лаборатории для данного фрагмента были подобраны

три протоспейсера с минимальной прогнозируемой нецелевой активностью и проявляющие высокую эффективность редактирования в культивируемых клетках человека [111], поэтому при проведении данной работы был использован вышеупомянутый фрагмент гена *ANXA6*.

Первоначально был исследован эффект модифицированных нуклеотидных остатков m6A, m5C, Ψ и m1Ψ в структуре *tracrRNA* на активность системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 *in vitro*, чтобы оценить эффективность связывания модифицированной направляющей РНК с белком Cas9, а затем в составе *sgRNA*, чтобы изучить влияние спейсера на эффективность расщепления ДНК-субстратов.

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

Известно, что *tracrRNA* играет ключевую роль в функционировании системы CRISPR/Cas9 и отвечает за взаимодействие с белком Cas9 [8]. Ранее было показано, что как единичные [116], так и множественные модификации могут быть введены в область гибридизации *crRNA:tracrRNA* без ингибирования работы системы CRISPR/Cas9 [117]. Кроме того, включение химических модификаций в *tracrRNA* позволяет значительно увеличить активность белка Cas9 [118].

В первую очередь были получены *tracrRNA*, содержащие 100% остатков m6A, m5C, Ψ или m1Ψ, чтобы оценить их способность образовывать каталитически активные комплексы с белком Cas9 и немодифицированными *crRNA* (Рисунок 19А). Для этого в качестве ДНК-субстрата использовали плазмиду *pANXA6*, содержащую фрагмент гена *ANXA6*.

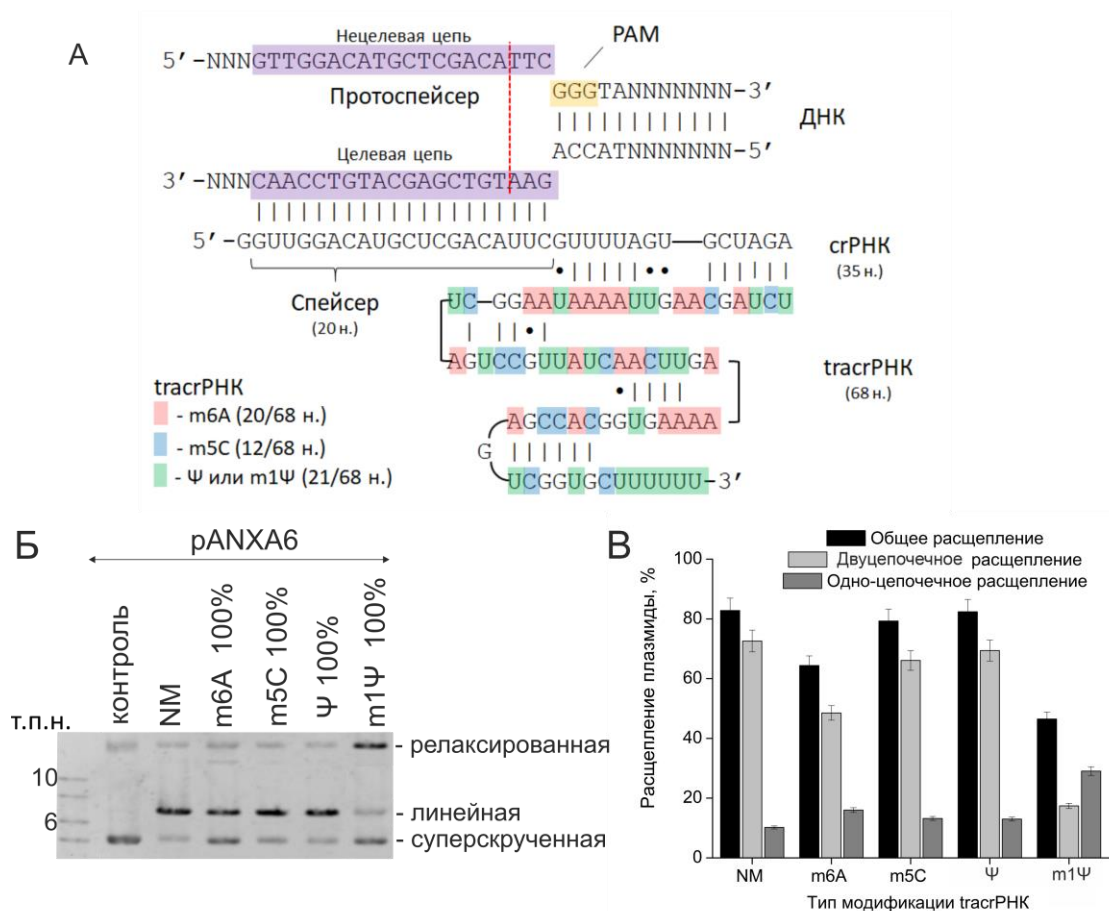


Рисунок 19. Оценка гидролиза плазмиды комплексами белка Cas9 с немодифицированной crPHK и tracrPHK, содержащими 100% остатков m6A, m5C, Ψ и m1Ψ. А – схема взаимодействия комплекса crPHK:tracrPHK и ДНК-субстрата; Б – гидролиз плазмиды комплексами Cas9 с модифицированными tracrPHK и немодифицированной tracrPHK (NM). Плазмиду без добавления белка Cas9 использовали в качестве отрицательного контроля. Положительный контроль плазмиды (K⁺) включен в Приложение Г, Рисунок Г1. Две верхние полосы представляют собой продукты расщепления (релаксированная и линейная формы), а нижняя полоса представляет собой интактную плазмиду (суперскрученную форму); В – процент плазмиды, гидролизованной белком Cas9 с модифицированными tracrPHK. Показаны средние значения ± стандартное отклонение из трех независимых экспериментов.

Электрофоретический анализ показал, что включение остатков m6A и m1Ψ в состав tracrPHK приводит к заметному снижению эффективности гидролиза плазмиды (Рисунок 19Б). В то же время, замена уридина на Ψ не снижала эффективность расщепления ДНК-субстрата. Аналогичный результат наблюдали при введении m5C в tracrPHK. Важно

отметить, что для m5C и Ψ глубина гидролиза мишени сравнима с глубиной гидролиза, наблюдаемой для немодифицированной РНК. (Рисунок 19В).

Выявленный негативный эффект от включения остатков m6A в tracrRNA может быть связан с многочисленными остатками аденозина в области повтор-антиповтора, которая комплементарно взаимодействует с crRNA, обеспечивая формирование каталитически активного комплекса с белком Cas9 (Рисунок 19А). Возможно замена аденозина на m6A, дестабилизирует данный дуплекс, что затрудняет первоначальное связывание crRNA и tracrRNA и снижает активность РНП. Недавняя работа по исследованию влияния m6A в разных областях tracrRNA подтверждает наши предположения [119]. Действительно, включение нескольких остатков m6A в области повтор-антиповтора снижает эффективность расщепления ДНК-субстратов, тогда как в других положениях практически не влияет на функционирование системы CRISPR/Cas9. Аналогично действию m6A, включение в tracrRNA остатков m1Ψ негативно влияет на эффективность гидролиза плазмиды. Данный эффект может объясняться тем, что присутствие m1Ψ в РНК-дуплексах повышает стабильность спаривания оснований и усиливает стэкинг взаимодействие между основаниями в РНК, что приводит к увеличению жесткости сахарофосфатного остова и ограничивает динамику РНК-дуплексов [120].

Таким образом, введение модифицированных нуклеотидных остатков m5C, Ψ и в меньшей степени m6A и m1Ψ в состав tracrRNA в сочетании с crRNA и белком Cas9 не препятствует формированию каталитически компетентных комплексов и гидролизу плазмидного ДНК-субстрата.

3.1.1.3. Исследование кинетики расщепления ДНК-дуплексов комплексами белка Cas9 с модифицированными tracrRNA

С целью более детального изучения эффекта модификаций в tracrRNA на степень гидролиза нецелевой и целевой цепи ДНК, были проанализированы кинетические зависимости реакций расщепления комплексами белка Cas9 с crRNA и полностью модифицированными tracrRNA. Кроме того, были рассчитаны наблюдаемые константы скорости ($k_{\text{наб}}$) и максимальные теоретические степени расщепления ДНК-дуплекса ($A_{\text{макс}}$) для модифицированных направляющих РНК (Таблица. 3). Для этого в качестве субстратов использовали протяженные флуоресцентно-меченые ДНК-дуплексы (Приложение В), а результаты анализировали с помощью капиллярного гель-электрофореза. Флуоресцентная

метка была присоединена к 5'-концу целевой либо нецелевой цепи, что позволяло оценивать эффективность их расщепления по отдельности (Рисунок 20).

Таблица 3. Наблюдаемые константы скорости ($k_{\text{наб}}$) и максимальная теоретическая степень расщепления ДНК ($A_{\text{макс}}$) для модифицированных *tracrRNA*.

	Целевая цепь					Нецелевая цепь				
	NM	m6A	m5C	ψ	m1 ψ	NM	m6A	m5C	ψ	m1 ψ
$k_{\text{наб}}$, мин ⁻¹	0.04 9±0. 011	0.009 ±0.00 1	0.086 ±0.01 7	0.046 ±0.01 3	0,024 ±0,003	0.04 9±0. 011	0.006 ±0.00 2	0.045 ±0.00 7	0.030 ±0.00 3	0.013 ±0.001
$A_{\text{макс}}$	79.0 ±3.0	48.2± 2.6	83.8± 1.5	74.7± 4.0	46,9± 1,5	70.1 ± 2.9	48.3± 8.4	79.0± 2.3	63.4± 1.4	45.6± 1.6

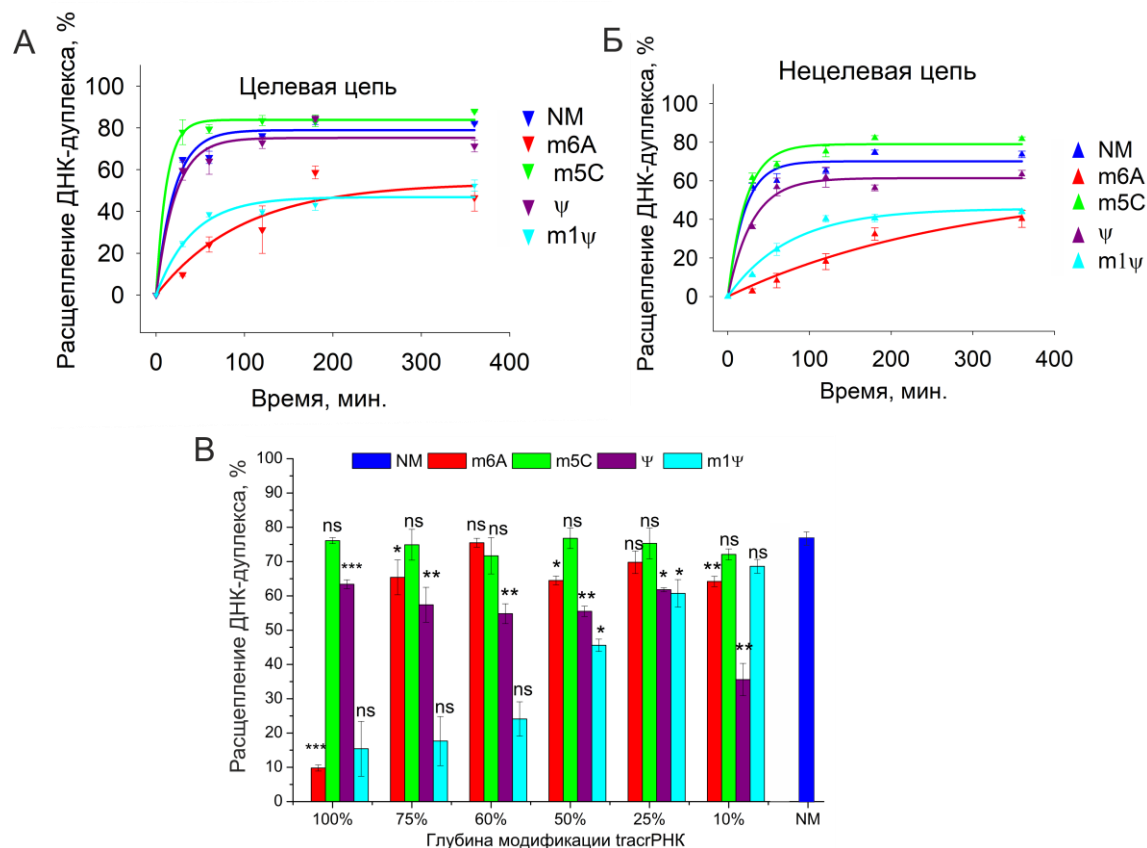


Рисунок 20. Влияние природных модификаций в tracrRNA на эффективность расщепления флуоресцентно-меченных ДНК-дуплексов. А, Б – зависимость эффективности расщепления двух цепей ДНК -дуплекса: целевой (А) и нецелевой (Б) от времени протекания реакции белка Cas9 с crRNA и tracrRNA, содержащих 100% остатков m6A, m5C, Ψ или m1Ψ. В качестве контроля использовали немодифицированную tracrRNA (NM); В – корреляция эффективности расщепления от глубины модификации tracrRNA. Данные представлены как средние значения $\pm$ SD по результатам трех независимых экспериментов. Значения p определены при сравнении с немодифицированным контролем (критерий Стьюдента: ns- незначимо, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Анализ кинетических кривых выявил, что 100% замена аденозина на m6A в tracrRNA приводит к существенному снижению скорости реакции расщепления для обеих цепей ДНК. Так, расщепление, наблюдаемое для tracrRNA с остатками m6A, через 1 час было в 3–6 раз ниже (в зависимости от цепи ДНК-субстрата), чем для немодифицированной РНК (Рисунок 20А, Б). Однако при увеличении времени гидролиза до 6 часов эффективность расщепления возрастала до 50%. По аналогии с действием m6A, замена уридина на m1Ψ

заметно замедляла протекание реакции, и 50% эффективности расщепления субстрата достигалась только через 6 часов. С другой стороны, m5C модификация увеличивала глубину расщепления примерно на 20% независимо от времени реакции, и включение остатков Ψ в состав tracrRNA незначительно снижало эффективность расщепления ДНК-субстрата по сравнению с немодифицированной tracrRNA (Рисунок 20А, Б). Сравнение наблюдаемых констант скорости и максимальных степеней расщепления дуплексов подтверждает, что введение остатков m6A или m1Ψ значительно замедляет реакцию расщепления, а остатки m5C оказывают противоположный эффект (Таблица. 3).

Согласно литературным данным, гидролиз целевой и нецелевой цепи осуществляется разными каталитическими центрами белка Cas9 – HNH и RuvC, соответственно [8]. В результате проведенной нами оценки кинетики расщепления нецелевой и целевой цепей ДНК-дуплексов была выявлена разная скорость их гидролиза. По полученным результатам скорость расщепления нецелевой цепи была заметно ниже по сравнению с целевой цепью, что свидетельствует о возможном разобщении расщепления каталитическими центрами HNH и RuvC (Таблица. 3). Кроме того, снижение эффективности расщепления нецелевой цепи свидетельствует о накоплении в системе одноцепочечных разрывов [121]. Однако через два часа реакции расщепление достигало плато, и дальнейших различий не наблюдалось, за исключением tracrRNA, содержащих остатки m6A или m1Ψ, для которых оптимальное время реакции составляло более 6 ч (Рисунок 20).

Для достижения высокой эффективности расщепления ДНК-дуплекса с использованием модифицированных tracrRNA и определения оптимальной глубины модификации было проварьировано соотношение модифицированных НТФ и канонических мономеров при синтезе tracrRNA, при этом глубина модификации составляла от 10 до 100% (Рисунок 20В). tracrRNA, содержащая остатки m5C, при любой глубине модификации расщепляла ДНК-субстрат на уровне сопоставимом с немодифицированным контролем. Для остатков m6A в tracrRNA высокая эффективность расщепления ДНК-дуплекса наблюдалась для любой глубины модификации, за исключением 100% (Рисунок 20В). В случае tracrRNA с остатками Ψ наблюдалась прямая зависимость: увеличение глубины модификации обеспечивало повышение эффективности расщепления. С другой стороны, для остатков m1Ψ в tracrRNA характерно постепенное снижение эффективности гидролиза с ростом глубины модификации. Полученные результаты позволяют определить

оптимальную глубину модификации для каждого природного модифицированного мономера: 10-75% остатков m6A, 25-100% – Ψ, 10-50% – m1Ψ и 100% – m5C.

Таким образом, комплексы белка Cas9 с crPНК и tracrPНК, содержащими модифицированные нуклеотидные остатки, эффективно расщепляют различные ДНК-субстраты, а оптимизация времени реакции и глубины модификации tracrPНК позволяет достичь наибольшей эффективности расщепления. Согласно полученным результатам, включение m5C в составе tracrPНК позволяет расщеплять ДНК-субстраты *in vitro* с эффективностью, достигающей 80%.

3.1.2. Включение модифицированных азотистых оснований в sgPНК

3.1.2.1. Оценка влияния модифицированных азотистых оснований в sgPНК на активность CRISPR/Cas9 *in vitro*

На следующем этапе работы было изучено влияние природных модификаций в спейсере направляющей PНК и проведена оценка диапазона глубины модификации sgPНК, поддерживающих эффективное расщепление ДНК в комплексе с белком Cas9 (Рисунки 21–22). Для этого были синтезированы sgPНК со 100%, 75%, 50%, 25% или 10% заменами канонических нуклеотидных остатков на модифицированные аналоги: m6A, m5C, Ψ или m1Ψ (Рисунок 21А).

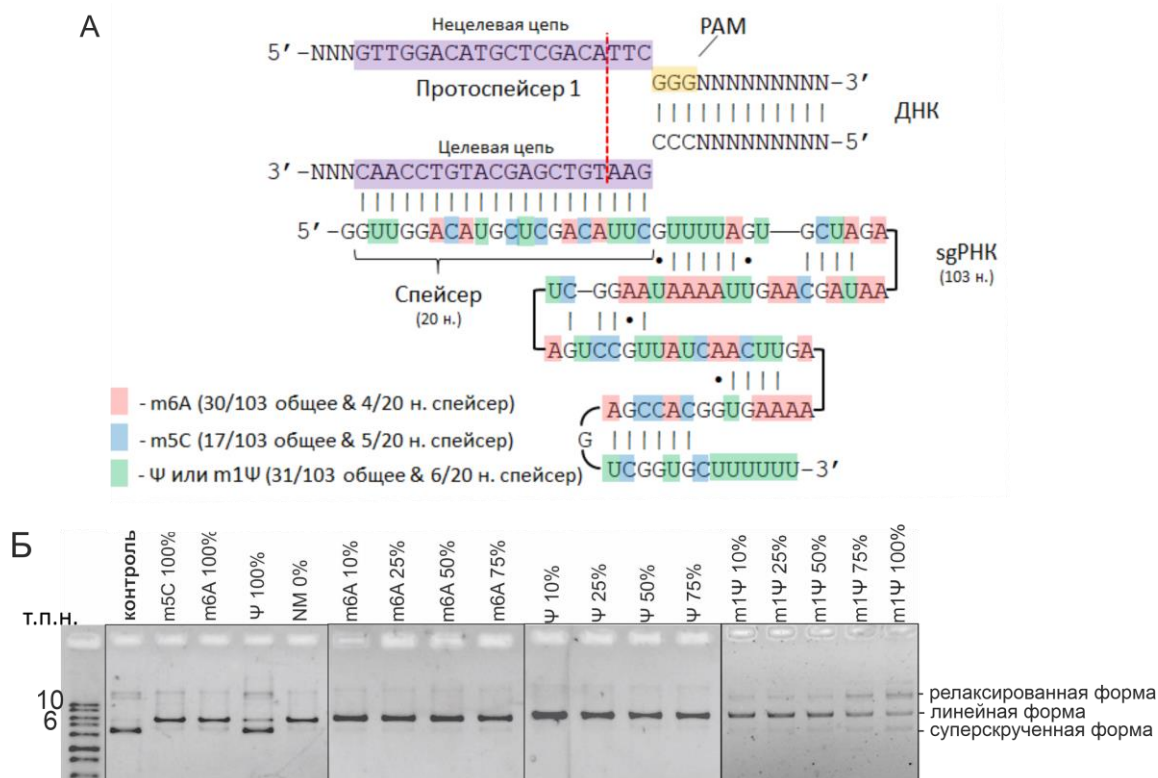


Рисунок 21. sgRNA, модифицированные остатками m6A, m5C, Ψ или m1Ψ, поддерживают расщепление плазмидного субстрата. А – схема взаимодействия sgRNA и протоспейсера 1 ДНК-мишени. Вероятные позиции включения модификаций выделены для m6A (красным), m5C (синим) и Ψ или m1Ψ (зеленым), указано количество этих сайтов во всей sgRNA и в спейсере. Б – расщепление плазмиды комплексами белка Cas9 с sgRNA, содержащими разную глубину модификации, и немодифицированной sgRNA (NM). Плазмиду без добавления белка использовали в качестве отрицательного контроля реакции. Положительный контроль плазмиды (K⁺) включен в Приложение Г, Рисунок Г1. Две верхние полосы представляют собой продукты расщепления (релаксированная и линейная формы), а нижняя полоса представляет собой субстрат (суперскрученную форму).

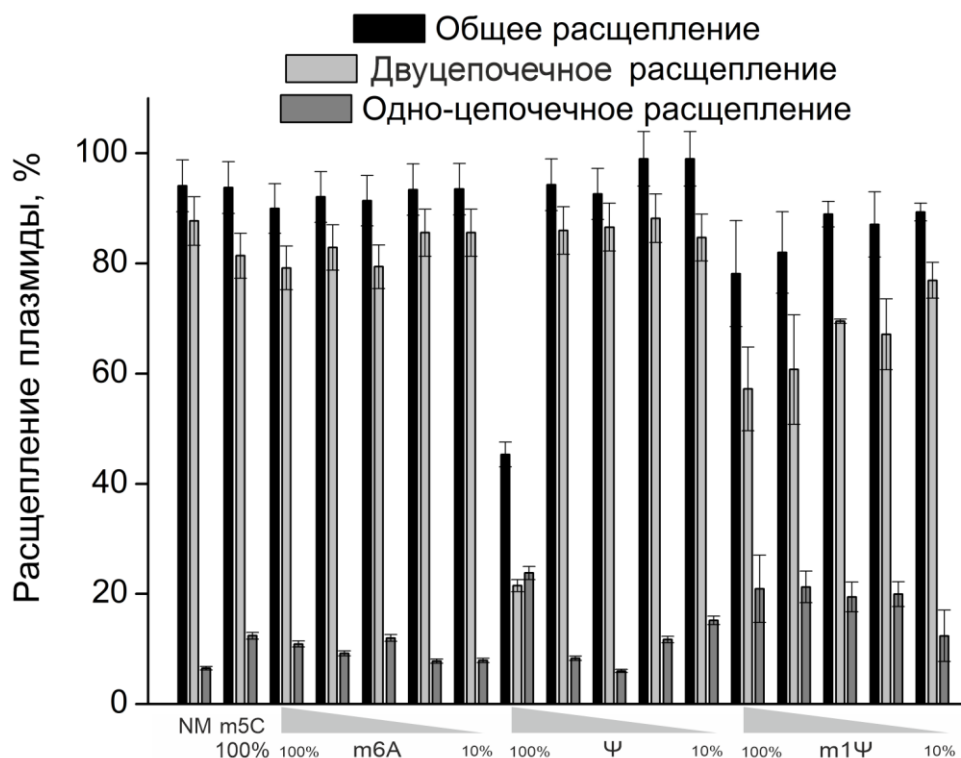


Рисунок 22. Диаграмма эффективности расщепления плазмиды комплексами белка Cas9 с модифицированными sgРНК. Показаны средние значения $\pm$ SD по трём независимым экспериментам.

По сравнению с результатами, полученными для tracrРНК, для sgРНК расщепление плазмиды лишь незначительно уменьшалось при увеличении глубины модификации m6A с 10% до 100%, и практически не изменялось при любой глубине m5C (Рисунок 21Б). С другой стороны, 100% замещение уридина на Ψ значительно снижало расщепление плазмидного субстрата (Рисунки 21-22). Возможно, большое количество позиций в sgРНК для включения остатков Ψ: 6 внутри спейсера и 25 в невариабельной части направляющей РНК, а также два уридина, непосредственно примыкающих к сайту расщепления ДНК-мишени (положения 2 и 3 от PAM) и расположенных в PAM-проксимальной области, особенно чувствительной к любому отклонению от идеальной структуры дуплекса РНК:ДНК, ингибируют работу системы CRISPR/Cas9 (Рисунок 21А). Другой причиной наблюдаемого эффекта остатков Ψ может быть образование жесткой структуры гетеродуплекса РНК:ДНК, что ограничивает динамику РНК. Известно, что наличие модификации Ψ в РНК увеличивает термическую стабильность вторичных структур РНК и уменьшает подвижность соседних оснований при молекулярно-динамическом

моделировании [122,123]. Однако уменьшение глубины модификации Ψ (10-75%) позволяло достичь эффективности гидролиза субстрата сравнимой с эффективностью, наблюдаемой для немодифицированной sgРНК. Интересно, что замена уридина на m1Ψ в направляющей РНК существенно не изменяла процент расщепленной плазмиды независимо от глубины модификации (Рисунок 22). Данный эффект может объясняться наличием метильной группы в m1Ψ, блокирующей способность m1Ψ формировать дополнительную водородную связь что, тем самым может препятствовать образованию жесткой структуры РНК:ДНК дуплекса, как в случае остатков Ψ.

С целью установления возможной зависимости эффекта природных модификаций от последовательности спейсера были синтезированы модифицированные sgРНК, нацеленные на 2 и 3 протоспейсер гена *ANXA6* (Рисунок 23А, Б). Полученные результаты выявили, что при включении остатков m6A (2 спейсер) и Ψ (3 спейсер) в РАМ-проксимальную область, особенно вблизи сайта гидролиза, снижается степень гидролиза плазмидного субстрата (Рисунок 23В).

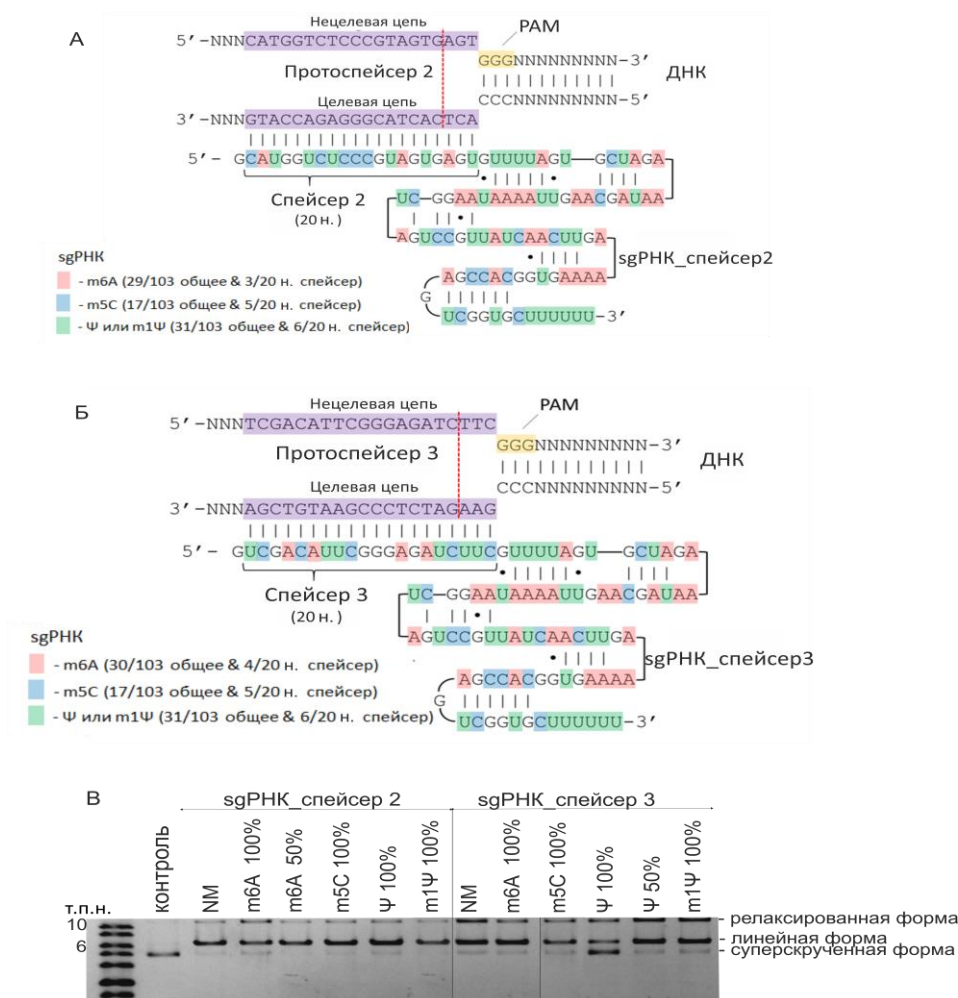


Рисунок 23. Зависимость влияния природной модификации в структуре sgRNA от последовательности протоспейсера плазмидного субстрата. А, Б – схема взаимодействия sgRNA и протоспейсеров 2 и 3. В – расщепление плазмиды комплексами белка Cas9 с sgRNA, содержащими разную глубину модификации для спейсеров 2 и 3, и немодифицированной sgRNA (NM).

Однако уменьшение глубины модификации m6A и Ψ вдвое восстанавливает эффективность расщепления плазмиды до уровня, соответствующего немодифицированной направляющей РНК (Рисунок 24). Напротив, наличие как остатков m1Ψ, так и m5C в обоих спейсерах sgRNA обеспечивает расщепление ДНК-субстрата сопоставимого с немодифицированной РНК (NM) (Рисунок 24).

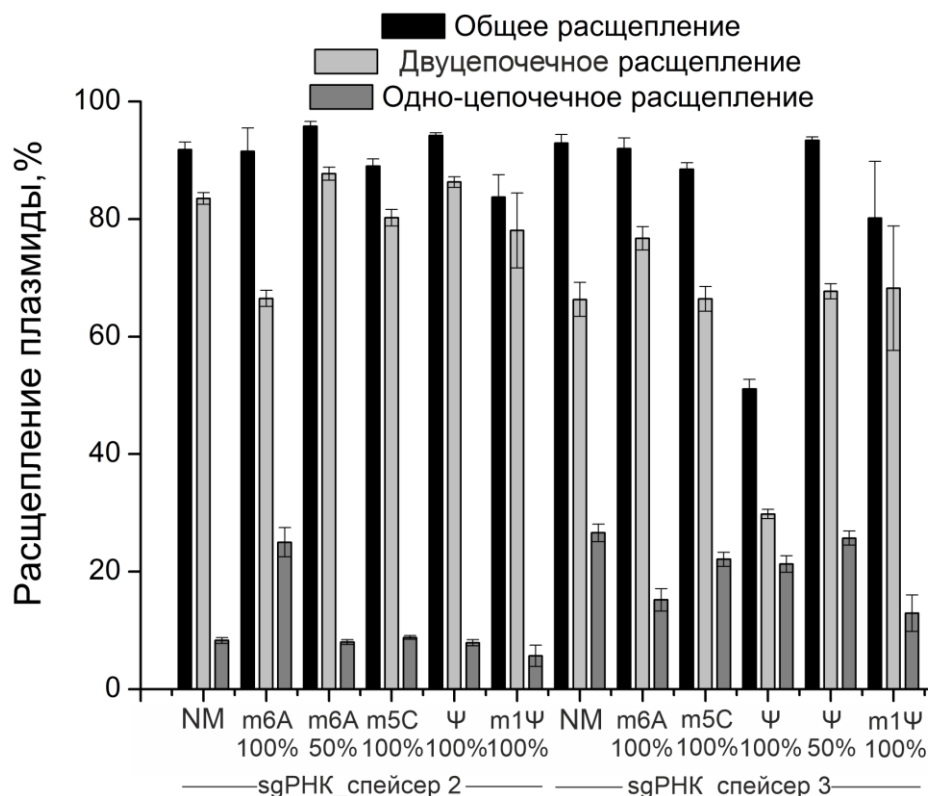


Рисунок 24. Диаграмма эффективности расщепления плазмиды комплексами белка Cas9 с модифицированными sgPHK, содержащими 2 и 3 спейсер, соответственно. Показаны средние значения $\pm$ SD по трем независимым экспериментам.

Таким образом, влияние природных модификаций в sgPHK частично обусловлено составом спейсера, и, в частности, РАМ-проксимальной области, поскольку расщепление субстрата сильно зависит от образования гетеродуплекса направляющая РНК:ДНК. Поэтому включение модификаций в данную область способно затруднить образование эффекторного комплекса Cas9:sgPHK и прекалитического комплекса Cas9:sgPHK:ДНК или обоих вместе [121]. Однако подбор оптимальной глубины модификации позволяет добиться высокой эффективности расщепления ДНК-субстрата, достигающей 90%, при любой последовательности спейсера направляющей РНК.

3.1.2.2. Исследование кинетики модифицированных sgPHK

Для определения количественных характеристик белка Cas9, нацеленного с помощью модифицированных sgPHK, по аналогии с tracrPHK, были проанализированы кинетические зависимости расщепления отдельных цепей ДНК-дуплекса (Рисунок 25А, Б).

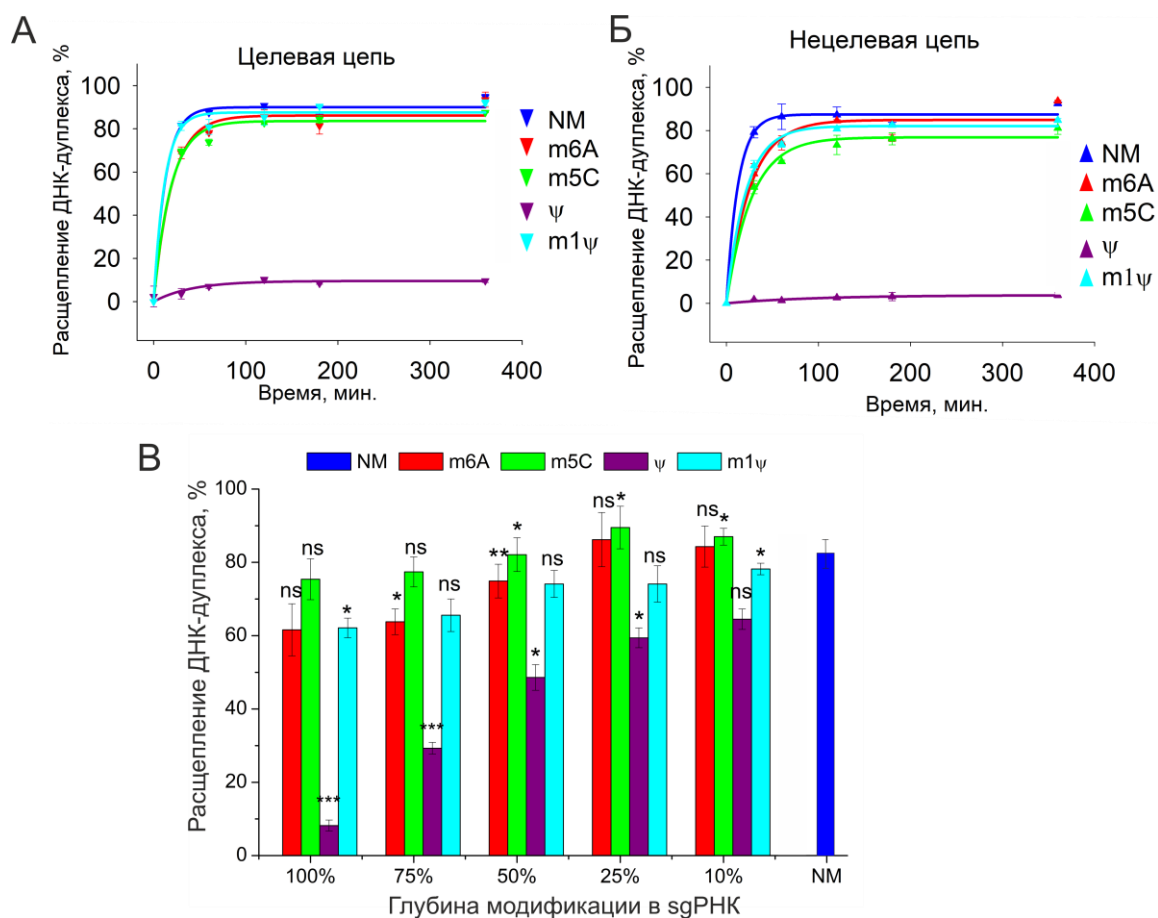


Рисунок 25. Кинетика расщепления ДНК-дуплексов комплексами белка Cas9 с модифицированными sgРНК. А, Б – кинетические кривые для sgРНК, содержащих 100% остатков m6A, m5C, Ψ или m1Ψ на А – целевой и Б – нецелевой цепи ДНК-дуплекса. В качестве контроля использовали немодифицированную sgРНК (NM); В – зависимости эффективности расщепления ДНК-дуплекса от глубины модификации sgРНК. Данные представлены в виде среднее значение $\pm$ SD по результатам трех независимых экспериментов. Значения p определены при сравнении с немодифицированным контролем (критерий Стьюдента: ns- незначимо, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

На основании полученных кинетических кривых было выявлено, что 100% замена С на m5C, А на m6A, или U на m1Ψ в sgРНК незначительно снижает расщепление ДНК-дуплексов, что согласуется с рассчитанными кинетическими параметрами (Рисунок 25А, Б и Таблица 4). Так константы скорости $k_{\text{наб}}$ уменьшились лишь в 1,5–2,1 раза, а максимальная теоретическая степень расщепления снизилась не более чем на 10% по сравнению с немодифицированной sgРНК (Таблица 4). Стоит отметить, что по аналогии с результатами, полученными для модифицированных tracrРНК, наиболее выраженный эффект наблюдался на нецелевой цепи (Рисунок 25А, Б). Как и в случае с плазмидным

субстратом, 100% модификация спейсерной области sgРНК остатками Ψ значительно снижала эффективность расщепления ДНК-дуплексов (Рисунок 25А, Б). На основании значений констант скоростей в случае остатков Ψ для целевой и нецелевой цепи активность белка Cas9 была снижена в 4,3 и 7,8 раз соответственно, и расщеплялось не более 10% ДНК-субстрата (Таблица. 4). В результате, среди исследованных модификаций введение в sgРНК остатков m1 Ψ обеспечивает наибольшую скорость реакции и эффективность расщепления ДНК-субстратов.

Таблица 4. Наблюдаемые константы скорости ($k_{\text{наб}}$) и максимальная степень расщепления ДНК ($A_{\text{макс}}$) для модифицированных sgРНК.

	Целевая цепь					Нецелевая цепь				
	NM	m6A	m5C	ψ	m1 ψ	NM	m6A	m5C	ψ	m1 ψ
$k_{\text{наб}}$, мин ⁻¹	0.078 ± 0.0 14	0.051 $\pm$ 0.009	0.053 $\pm$ 0.009	0.018 $\pm$ 0.004	0.083 ± 0.013	0.079 $\pm$ 0.016	0.039 $\pm$ 0.008	0.037 $\pm$ 0.004	0.005 $\pm$ 0.003	0.047 $\pm$ 0.002
$A_{\text{макс}}$	90.3 ± 1.7	86.2 $\pm$ 2.7	83.5 $\pm$ 2.4	10.3 $\pm$ 0.6	87.6 $\pm$ 0.9	87.4 $\pm$ 1.8	84.9 $\pm$ 3.6	76.8 $\pm$ 1.9	4.5 $\pm$ 1.8	82.1 $\pm$ 0.8

Таким образом, sgРНК, содержащие 100% остатков Ψ , можно использовать в системе CRISPR/Cas9, но их эффективность расщепления ДНК-мишени, зависит от последовательности спейсера sgРНК. Однако, замена псевдоуридина его аналогом – m1 Ψ позволяет эффективно расщеплять как плазмидный субстрат, так и ДНК-дуплексы. Более того, m1 Ψ по сравнению с другими исследованными природными модификациями более эффективен для достижения высокой степени гидролиза ДНК-субстратов.

Аналогично эксперименту, проведенному для tracrРНК, была определена глубина модификации sgРНК, обеспечивающая эффективное расщепление ДНК-субстрата. Согласно полученным результатам, при любой глубине модификации m5C или m1 Ψ в sgРНК эффективность расщепления дуплекса сопоставима с немодифицированным контролем (Рисунок 25В). Для остатков m6A при изменении глубины модификации с 10 до 100% степень гидролиза ДНК-субстрата уменьшалась с 80 до 60 %. При включении остатков Ψ в sgРНК также наблюдалась обратная зависимость, но максимум эффективности расщепления ДНК-дуплекса был ниже, чем для остатков m6A, и составлял 60% при 10% глубине модификации. В результате, оптимальной глубиной модификации для достижения

наибольшей эффективности расщепления ДНК-субстратов являются для sgРНК: 100% остатков m5C, m6A и m1Ψ и 10-50% – остатков Ψ.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что введение природных модифицированных нуклеотидов в sgРНК приводит к снижению активности комплексов Cas9:sgРНК *in vitro* с увеличением глубины модификации. Оптимизация этого параметра позволяет использовать модифицированные sgРНК при редактировании генома, так как модификация позволяет повысить устойчивость sgРНК к гидролизу и уменьшить иммуностимулирующий и цитотоксический эффекты [124]. Кроме того, возможно, что направляющие РНК, содержащие природные модификации, с меньшей эффективностью формируют комплексы с белком Cas9, за счет чего происходит снижение степени гидролиза ДНК-субстратов.

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

Одной из основных проблем системы CRISPR/Cas9 является наличие нецелевых эффектов [95]. В настоящее время существует множество исследований по введению модификаций в направляющие РНК [125] и белок Cas9 [61] для повышения специфичности распознавания ДНК-мишени. Однако, согласно литературным данным, модификации, способствующие увеличению точности работы системы CRISPR/Cas9, часто приводят к снижению эффективности редактирования.

В ходе данной работы для оценки влияния модифицированных нуклеотидных остатков в направляющих РНК на специфичность белка Cas9, был получен набор из шестнадцати ДНК-субстратов, содержащих мисматчи в области 1 протоспейсера гена ANXA6, 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 (Рисунок 26А). Положения одиночных и двойных мутаций были выбраны на основании литературных данных о том, что РАМ-проксимальные области протоспейсеров более чувствительны к мутациям, чем РАМ-дистальные районы [54,125,126]. Для оценки специфичности был использован фрагментный анализ с применением капиллярного гель-электрофореза и были рассчитаны как эффективности расщепления ДНК-субстратов с мисматчами, так и показатели специфичности (Рисунок 26Б). В данной работе была проведена оценка специфичности

работы системы CRISPR/Cas9 с модифицированными 100% m6A, 100% m5C, 100% m1Ψ и 50% Ψ sgPHK, а также 50% m6A и m1Ψ, 100% m5C и Ψ tracrPHK. Глубина модификации некоторых модифицированных природных нуклеотидов была снижена до 50% для достижения максимальной эффективности расщепления контрольного ДНК-субстрата.

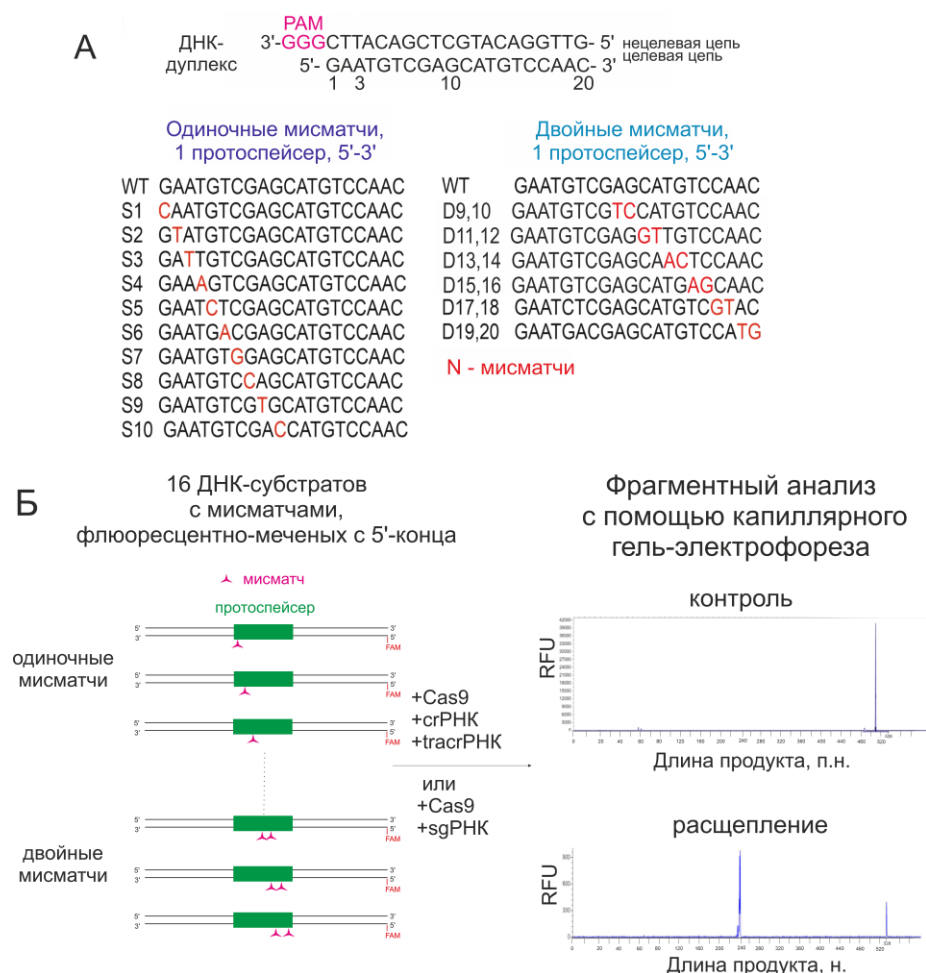


Рисунок 26. Схема оценки специфичности системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. А – протоспейсерные последовательности ДНК-субстратов с одиночными (S1-S10) или двойными (D9,10-D19,20) мисматчами на 1 протоспейсер гена *ANXA6*. Мисматчи отмечены оранжевым цветом. Номера ДНК-субстратов соответствуют положениям мутаций с 5'-конца. WT - контрольный немодифицированный ДНК-дуплекс; Б – схема проведения эксперимента.

Согласно полученным данным, для немодифицированной sgPHK различий в эффективности расщепления контрольного ДНК-дуплекса (WT) и дуплексов с мисматчами практически не наблюдается, за исключением нескольких сайтов (Рисунок 27). Умеренное снижение эффективности расщепления происходит при одиночных мисматчах,

расположенных в области гидролиза (S3 и S4), а критический спад при двойных мисматчах D13,14, D15,16 и D17,18 (Рисунок 27А – Г).

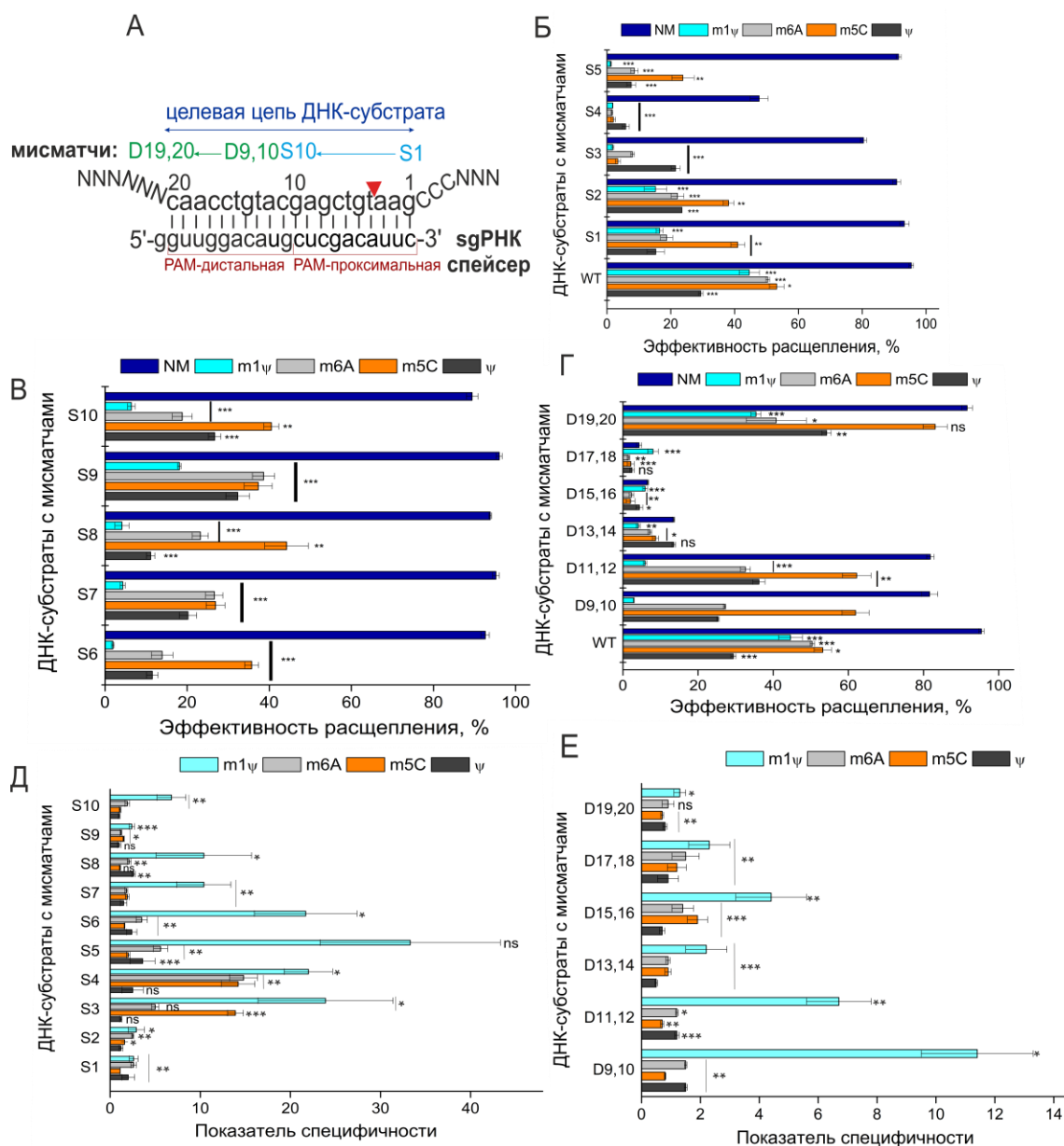


Рисунок 27. sgРНК с природными модификациями повышают специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. А – схема взаимодействия протоспейсера ДНК-субстрата и спейсера направляющей sgРНК. Б–Г– эффективности расщепления (%) для субстратов, содержащих однонуклеотидные (Б, В) и двунуклеотидные мисматчи (Г), на которые нацелены sgРНК, содержащие 100% остатков m6A, m5C, m1Ψ и 50% остатков Ψ, и немодифицированная sgРНК (NM). WT – контрольный немодифицированный ДНК-дуплекс. Д, Е – показатели специфичности для модифицированных направляющих РНК. Среднее значение ± SD, полученное по трем независимым экспериментам. р-значения

рассчитывались с использованием двустороннего критерия Стьюдента относительно немодифицированной sgРНК (ns, не значимо; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$).

С другой стороны, при использовании комплексов белка Cas9 с модифицированными sgРНК эффективность расщепления ДНК-дуплексов с мисматчами существенно отличается от эффективности, наблюдаемой для контрольной ДНК-мишени. Показано, что точность нуклеазы Cas9 с модифицированными sgРНК значительно увеличивается практически для всех мутантных субстратов. Наибольший эффект наблюдается для одиночных мисматчей в РАМ-проксимальной области, где скорость гидролиза значительно снижается (Рисунок 27Б, В). Чувствительность белка Cas9 к мисматчам вблизи сайта гидролиза и РАМ-проксимальной области объясняется тем, что данные положения важны для успешного образования фермент-субстратного комплекса и дальнейшего расщепления ДНК-субстрата [127,128]. Особенно это заметно в положениях 3 и 4, в которых показатель специфичности увеличивается примерно в десять раз при включении остатков m6A и m5C в sgРНК. С другой стороны, наличие двойных мутаций в РАМ-дистальном районе мало влияет на эффективность расщепления ДНК-субстрата по сравнению с немодифицированной sgРНК (Рисунок 27Г). Наименьшее изменение специфичности происходит в позициях мисматчей 17–18 и 19–20 (Рисунок 27Д, Е). Например, показатель специфичности для m6A достигает значений 6–10 для первых пяти однонуклеотидных мутаций и составляет примерно 2–3 для остальных мисматчей (Рисунок 27Д, Е). На основании полученных результатов можно утверждать, что включение остатков Ψ в sgРНК незначительно изменяет точность системы CRISPR/Cas9, при этом наибольший показатель специфичности составляет 4, если мисматч находится в области гидролиза (Рисунок 27Д). В то же время, m1Ψ в составе sgРНК оказывает более заметный эффект и ингибирует реакцию расщепления при наличии одиночных мисматчей в РАМ-проксимальной области (S3–S5, Рисунок 27Б, В). Также эффективность расщепления значительно снижается при реакции с ДНК-дуплексами, содержащими двойные мисматчи в РАМ-дистальной области кроме позиций 19–20 (Рисунок 27Г). В результате, m1Ψ позволяет увеличивать показатель специфичности как для однонуклеотидных, так и для двухнуклеотидных мисматчей (Рисунок 27Д, Е). При использовании m1Ψ-модифицированной sgРНК для одиночных мисматчей показатель специфичности возрастает от 5 до 35 раз, а для двойных мутаций точность белка Cas9 увеличивается до десяти раз. Таким образом, среди изученных природных модификаций реакция

расщепления наиболее специфично происходит в присутствии остатков m1Ψ, m6A и m5C, а наименее — в присутствии остатков Ψ.

Кроме того, мы рассмотрели, как наличие мисматчей влияет на точность системы CRISPR/Cas9 *in vitro* при использовании модифицированных tracrRNA (Рисунок 28). По полученным данным, при включении модификаций в tracrRNA эффективность расщепления практически не изменяется в сравнении с немодифицированной РНК (Рисунок 28А, Б). Точность белка Cas9 незначительно увеличивается в 1,4–1,8 раза при включении модификаций m1Ψ или Ψ в tracrRNA, а m6A или m5C не оказывают существенного эффекта (Рисунок 28В–Г). tracrRNA отвечает за связывание с белком Cas9 и напрямую не взаимодействует с ДНК-субстратом. Согласно нашим результатам, возможно, что для формирования комплекса с белком tracrRNA преимущественно задействует сахарофосфатный остов, из-за чего модификации азотистых оснований слабо влияют на связывание с нуклеазой Cas9, а, следовательно, и на специфичность системы.

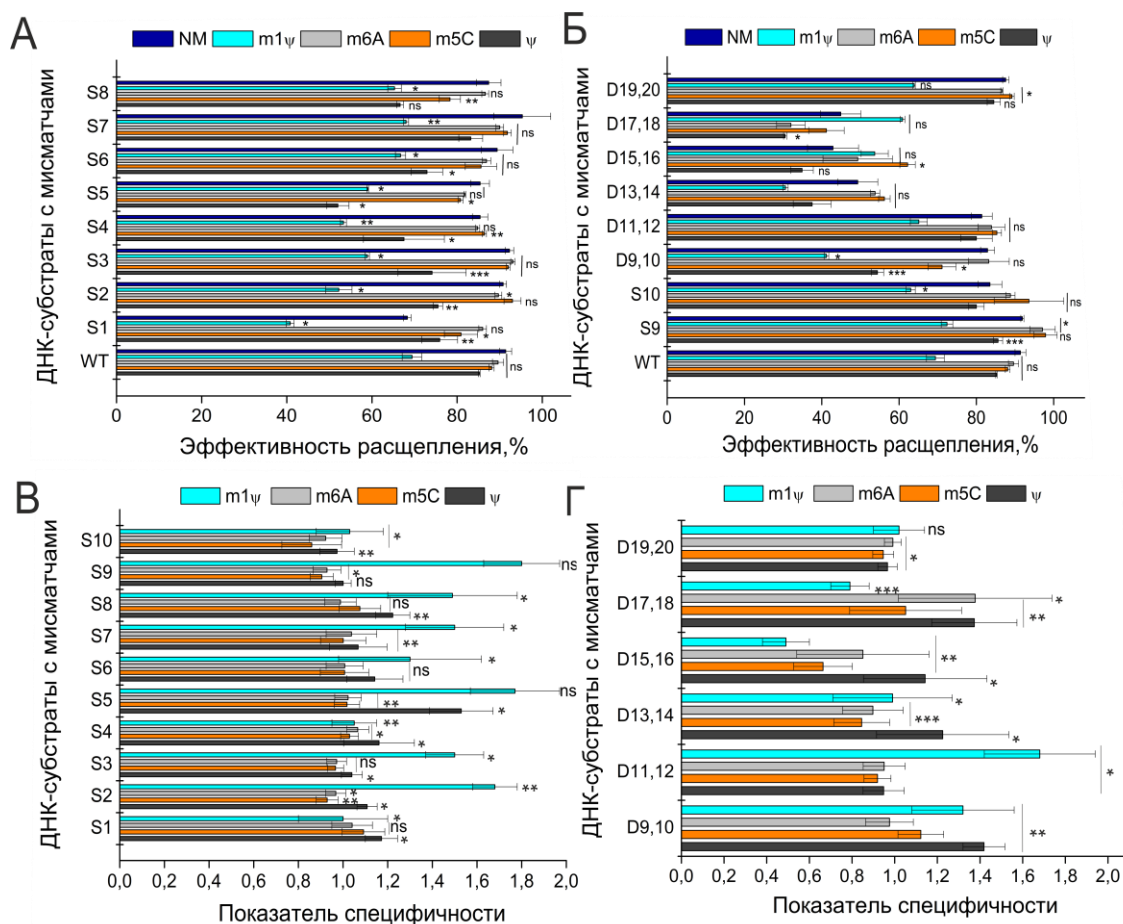


Рисунок 28. Влияние природных модификаций в tracrRNA на специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. А, Б – эффективности расщепления (%) для субстратов, содержащих А – однонуклеотидные и Б – двунуклеотидные мисматчи, на которые нацелены tracrRNA, содержащие 100% остатков m6A и m5C, 50% Ψ и 50% m1Ψ, и немодифицированная tracrRNA (NM). WT, контрольный немодифицированный ДНК-дуплекс. В, Г – показатели специфичности для модифицированных tracrRNA. Среднее значение $\pm$ SD, полученное по трем независимым экспериментам. р -значения рассчитывались с использованием двустороннего критерия Стьюдента (ns, не значимо; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Согласно литературным данным, основные стратегии к повышению специфичности системы CRISPR/Cas9 заключаются либо в ослаблении взаимодействий белок:ДНК или белок:RNA, либо в снижении аффинности взаимодействий РНП:ДНК-мишень, а также снижении скорости расщепления [129]. Возможно, увеличение специфичности при включении модифицированных нуклеотидных остатков в направляющие RNA происходит

за счет нарушения взаимодействия РНК:белок в комплексах РНП:ДНК, что может влиять на один или несколько термодинамических барьеров, регулирующих специфичность.

В совокупности данные результаты указывают на то, что модификации в спейсерной области оказывают большее влияние на распознавание мисматча. Таким образом, использование модифицированных sgРНК сильнее увеличивает специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*, чем модификация tracrРНК. Кроме того, включение остатков m1Ψ в sgРНК позволяет достичь наибольшего показателя специфичности и значительно снизить нецелевые эффекты в отличие от других модифицированных нуклеотидных остатков.

3.1.4. Оценка влияния модифицированных нуклеотидных остатков в sgРНК на активность системы CRISPR/Cas9 в клетках

Часто химические модификации направляющих РНК способствуют повышению эффективности редактирования генов в клетках человека. Ярким примером является введение 2'-F и тиофосфатных модификаций, повышающих стабильность направляющих РНК и эффективность системы CRISPR/Cas9 в клетках [77]. Известно, что природные модификации повышают стабильность и снижают иммуногенность различных типов синтетических РНК [130]. Например, модифицированные нуклеотидные остатки, включая m6A, m5C и Ψ, подавляют передачу сигналов на ранних этапах RIG-I-подобного пути активации врожденного иммунитета [124], а m1Ψ в составе мРНК снижает иммунный ответ и цитотоксичность [131]. Поэтому использование направляющих РНК с природными модификациями позволяет избежать негативного влияния на клетки человека.

В ходе данной работы была исследована способность модифицированных sgРНК поддерживать Cas9-опосредованное редактирование генов в клетках млекопитающих. Для этого были получены sgРНК, содержащие m6A, m5C, Ψ или m1Ψ. На основании результатов предыдущих *in vitro* экспериментов глубина модификации для Ψ была снижена до 50% для достижения оптимальной эффективности геномного редактирования. Комплексы белка Cas9 с модифицированными sgРНК были нацелены на ген ANXA6. Клеточную линию HEK293T/17 подвергали электропорации с помощью РНП с использованием системы трансфекции NeonTM согласно схеме, указанной на Рисунке 29А. После трансфекции клетки продемонстрировали 80% жизнеспособность, и ни один из протестированных типов РНП не вызывал резкого снижения уровня жизнеспособности. Геномную ДНК выделяли через 48 часов после трансфекции.

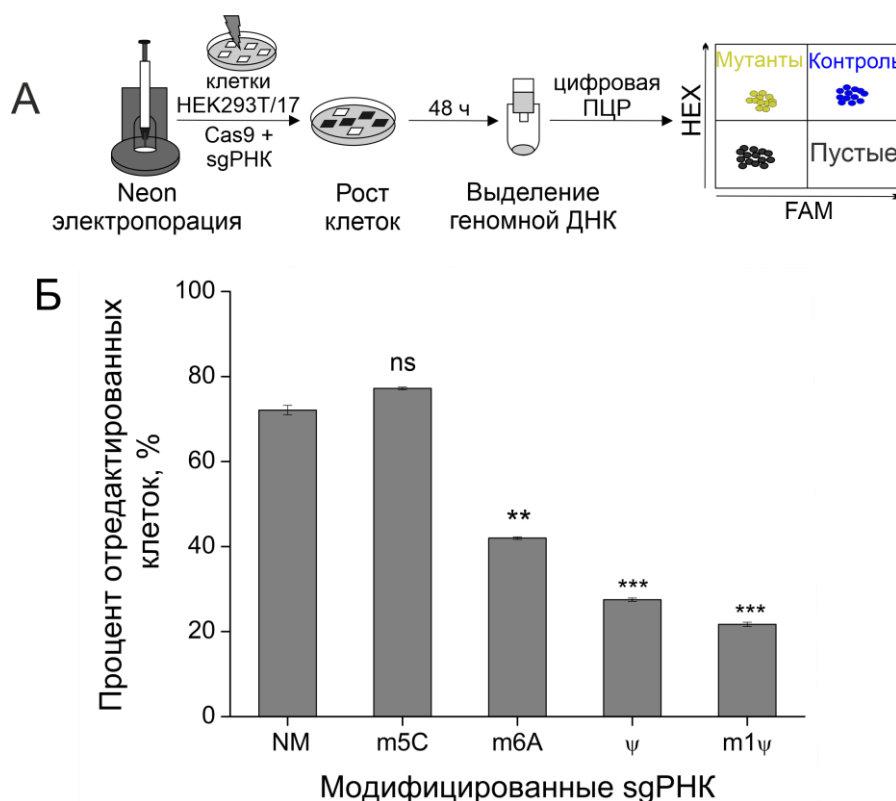


Рисунок 29. Комплексы белка Cas9 с модифицированными sgRNA поддерживают геномное редактирование клеток человека в культуре. А – схема оценки эффективности редактирования модифицированными sgRNA клеток в культуре. Б – процент отредактированных клеток (%) при использовании sgRNA, которые содержали 100% остатков m5C m1ψ и m6A и 50% остатков ψ, и немодифицированной контрольной РНК (NM). Данные трех независимых экспериментов представлены как средние значения $\pm$ SD. Значения p рассчитывали с использованием двустороннего t-критерия Стьюдента (ns: незначительно, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Для оценки эффективности редактирования РНК, использовали цифровую ПЦР с праймерами и зондами на фрагмент гена ANXA6. Система специфичных зондов содержала контрольный зонд на участок без мутаций, меченый HEX, и зонд на сайт предполагаемой мутации, меченый FAM. Зонд с FAM использовали для расчета процентного содержания мутантных клеток, а зонд с HEX – для количественного определения общего числа клеток дикого типа. Двумерные графики результатов цифровой ПЦР для каждой модифицированной sgRNA представлены в Приложении Д.

Анализ результатов показал, что для немодифицированной sgRNA процент отредактированных клеток составляет примерно 70% (Рисунок 29Б). С другой стороны, включение модифицированных нуклеотидных остатков в направляющие РНК изменяет

эффективность геномного редактирования. Замена цитидина на m5C в sgРНК позволяет достичь эффективности редактирования сопоставимой с немодифицированным вариантом sgРНК. Однако, эффективность редактирования снижается до 40% при введении m6A и до 30% при включении Ψ в sgРНК. m6A и Ψ модификации стабилизируют стэкинг оснований в одноцепочечной РНК [132,133], что может нарушать связывание направляющей РНК и белка Cas9. Кроме того, известно, что включение данных неканонических оснований в положения связывания человеческого одноцепочечного РНК-связывающего белка Pumilio 2 (hPUM2) ослабляет аффинность данного белка [134]. Поскольку Cas9 является РНК-связывающим белком, образование каталитически-активных РНП может быть затруднено, что соответственно снизит эффективность редактирования. Замены U на m1Ψ в sgРНК примерно втрое уменьшает количество мутантных клеток по сравнению с немодифицированной sgРНК (Рисунок 29Б). Наблюдаемый для m1Ψ эффект может быть результатом дестабилизации комплекса направляющей РНК и геномной ДНК [135]. Дестабилизация происходит за счет того, что m1Ψ в структуре РНК принимает *син*-конформацию, не позволяя ей спариваться с dA ДНК в *анти*-конформации [135]. Кроме того, из предыдущих экспериментов известно, что включение остатков m6A, Ψ и m1Ψ в sgРНК нарушает формирование каталитически-активных комплексов sgРНК с белком Cas9, что приводит к меньшему числу РНП в клетках и тем самым снижает эффективность редактирования.

Таким образом, систему CRISPR/Cas9 с модифицированными sgРНК можно использовать для редактирования генома клеток, хотя модифицированные нуклеотидные остатки снижают эффективность редактирования генома по сравнению с немодифицированной sgРНК. Однако, сочетание модификации с достаточно высоким уровнем эффективности редактирования (m5C) и модификации с высокой специфичностью (m1Ψ) может способствовать балансу между двумя данными свойствами и получению эффективной системы геномного редактирования CRISPR/Cas9.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что встречающиеся в природе модифицированные нуклеотидные остатки в пределах определенного диапазона глубины модификации могут быть включены в состав tracrРНК или sgРНК без значительного снижения эффективности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* и в клетках. А

именно, комплексы белка Cas9 с направляющими РНК, содержащими остатки m6A, m5C, Ψ и m1Ψ, расщепляют как протяженные ДНК-дуплексы, так и плазмидные субстраты *in vitro*. Кроме того, включение модифицированных мономеров в направляющие РНК повышает специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro* и позволяет поддерживать функционирование системы CRISPR/Cas9 в клетках человека. Таким образом, направляющие РНК, содержащие модифицированные нуклеотидные остатки, являются перспективным подходом для улучшения технологии геномного редактирования.

3.2. ФГ-модификации в химерных направляющих crРНК для системы CRISPR/Cas9

Несколько лет назад в ИХБФМ СО РАН был описан новый аналог нуклеиновых кислот — фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) [136]. После разработки высокоэффективного метода получения фосфат-модифицированных производных нуклеиновых кислот стало возможным создавать олигонуклеотиды с частично или полностью нейтральным зарядом остова с использованием стандартных фосфорамидитных мономеров [137]. Благодаря нейтральному заряду ФГО, данные аналоги способны эффективно и свободно проникать в клетки [137]. Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие фосфорилгуанидиновые (ФГ) модификации, имеют низкую токсичность для эукариотических клеток и не влияют на жизнеспособность клеток [138]. Другими преимуществами включения ФГ-модификаций в олигонуклеотиды является их способность образовывать устойчивые дуплексы с РНК и ДНК [139], и их стабильность к действию нуклеаз [138]. Наряду с высокой аффинностью, при включении ФГ-групп в ДНК, не изменяется конформация химерного дуплекса ДНК:РНК и она схожа с конформацией немодифицированного аналога [139]. ФГ-группы могут быть введены и в структуру РНК [112]. Например, было показано, что малые интерферирующие РНК, содержащие ФГ-модификации, более устойчивы к действию РНКазы А, и их применение позволяет снизить нецелевую активность и повысить уровень сайленсинга целевых генов [112]. Однако ФГ-группы в олигонуклеотидах препятствуют образованию комплекса эндонуклеазы APE1 с ДНК или РНК, поэтому введение ФГ-групп в tracrРНК, отвечающую за взаимодействие с белком Cas9, является нецелесообразным [140].

ФГО применяются в различных областях в качестве: биохимических зондов [141], праймеров для ПЦР и ПЦР с обратной транскрипцией, а также в качестве потенциальных терапевтических агентов [142]. Введение нескольких ФГ-модификаций способно улучшить эффективность, распределение и срок действия соответствующих терапевтических олигонуклеотидов с различными типами биологического действия [143,144], включая сайт-направленное редактирование РНК с использованием эндогенных ферментов ADAR [145].

Фундаментальной задачей для многих исследователей, стремящихся усовершенствовать систему CRISPR/Cas9, является поддержание баланса между высокой точностью и эффективностью. Однако, введение в направляющую РНК модификаций, повышающих специфичность, часто приводит к снижению эффективности редактирования [81,93]. В попытке разрешить данную проблему мы скомбинировали два типа

модификаций: рибозы и фосфата. Согласно литературным данным, ДНК мономеры в направляющих РНК способны улучшить специфичность системы CRISPR/Cas9 [82,93], а ФГ-группы в РНК позволяют повысить устойчивость к нуклеазам и упростить доставку в клетки [144]. В ходе данной работы ФГ-модификации были впервые введены в направляющие химерные crРНК и было проведено исследование их влияния на активность системы CRISPR/Cas9 (Рисунок 30).

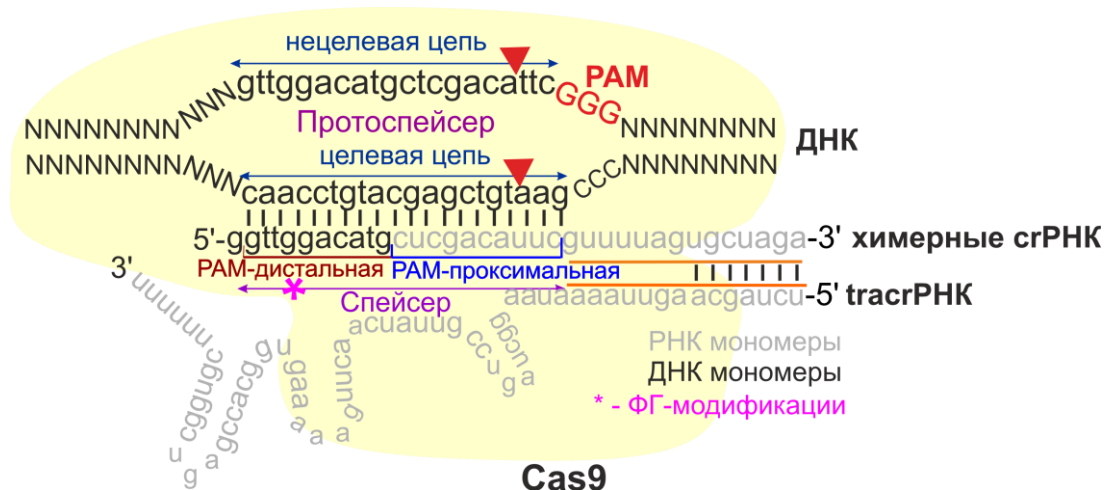


Рисунок 30. Схематическое изображение системы CRISPR/Cas9. Схема иллюстрирует ДНК-дуплекс, содержащий целевую и нецелевую цепь, а также химерную crРНК, состоящую из спейсера, охватывающего PAM-дистальную и PAM-проксимальную области и tracrРНК. Звездочкой обозначена область включения ФГ-модификаций.

3.2.1. Дизайн химерных crРНК с ФГ-модификациями

Известно, что укороченные crРНК используются как для увеличения эффективности редактирования генов клеток млекопитающих [79,146], так и для изучения влияния модификаций в направляющих РНК [80]. В рамках данной работы были использованы crРНК длиной 35 нуклеотидов и tracrРНК – 67 нуклеотидов. Кроме того, для повышения эффективности геномного редактирования в культивируемых клетках на 5'-конец всех crРНК был включен дополнительный гуанозин [85,86]. Ранее было показано, что 10-12 дезоксирибонуклеотидов на 5'-конце crРНК оказывают лишь незначительное влияние на эффективность, одновременно повышая специфичность системы CRISPR/Cas9 [93]. В ходе данной работы была проведена замена рибо- на дезоксирибонуклеотиды и модификация фосфатов с использованием ФГ-групп, а именно 1,3-диметилимидазолидин-2-илиденфосфорамидата (Рисунок 31А–В). В результате были получены химерные crРНК с десятью 5'-концевыми дезоксирибонуклеотидами, в которых фосфодиэфирные связи

заменены на ФГ-группы (Рисунок 31А). Положения ФГ-модификаций были выбраны так, чтобы минимизировать их влияние на контакты водородных связей между белком Cas9, направляющей РНК и ДНК-мишенью. Первоначально была синтезирована серия химерных crРНК с последовательным включением ФГ-модификации с 1-ой по 10-ую позицию РАМ-дистальной спейсерной области crРНК (IG2 – IG11) (Рисунок 31Г). Впоследствии количество ФГ-групп было увеличено до трех и были определены сайты, которые снижают эффективность расщепления при модификации (Рисунок 31Д). Кроме того, были получены варианты crРНК, в которых 10-ть межнуклеотидных фосфатов были модифицированы (IGF) или ФГ-группы были расположены последовательно, на расстоянии двух нуклеотидов друг от друга (IGZ). Пул crРНК, несущих одну или несколько ФГ-групп, был использован для сравнительной оценки влияния количества и месторасположения ФГ-модификаций на эффективность расщепления ДНК-субстрата (Рисунок 31В-Д). Кроме того, для исключения влияния последовательности провели оценку влияния ФГ-модификации на активность системы CRISPR/Cas9, используя три разных спейсера (Рисунок 31Б).

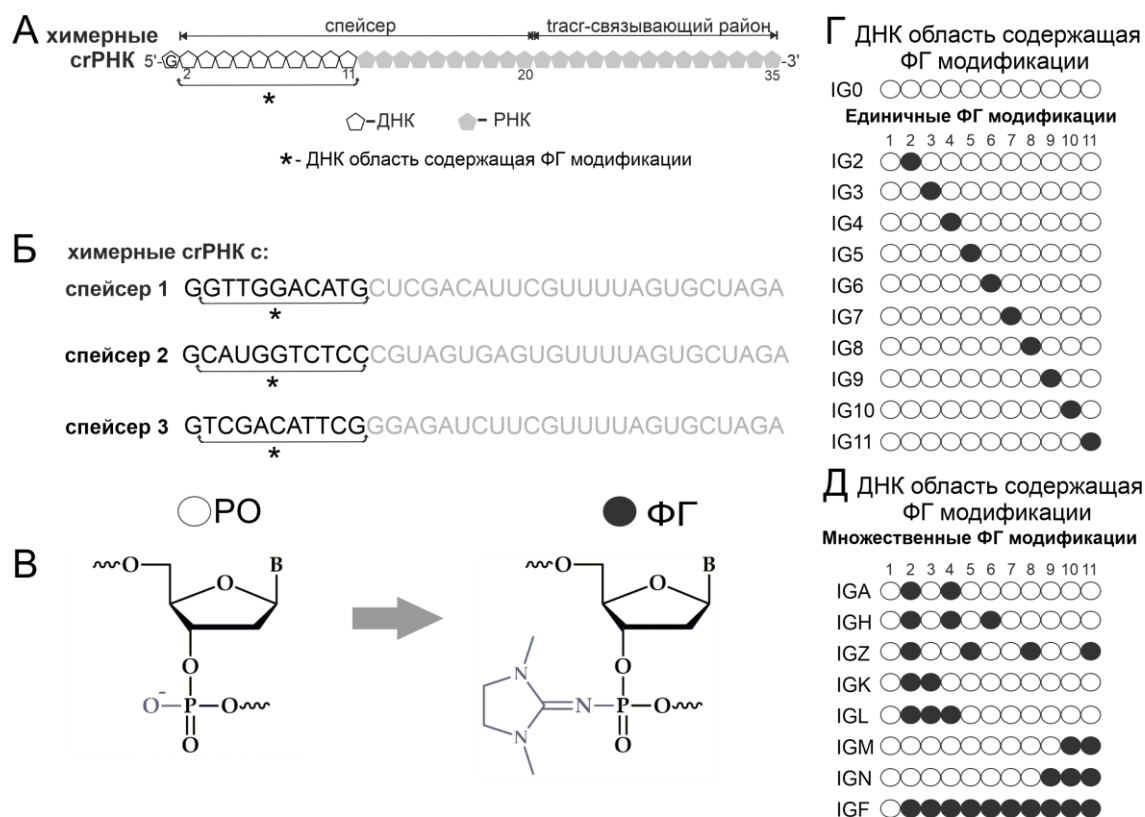


Рисунок 31. Структуры химерных crРНК с ФГ-модификациями. А – схематическое изображение химерных crРНК с ФГ-группами; Б – модифицированные химерные crРНК, содержащие спейсер 1, спейсер 2 и спейсер 3, звездочкой обозначена ДНК область crРНК,

несущая ФГ-группы; В – химические структуры групп фосфодиэфира (РО) и фосфорилгуанидина (ФГ); Г, Д – схема положений, в которых фосфодиэфирные связи заменены одной (Г) или несколькими (Д) ФГ-модификациями.

3.2.2. Изучение влияния ФГ-групп в химерных crРНК на активность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*

Для оценки активности системы CRISPR/Cas9, содержащей химерные crРНК с ФГ-группами, использовали протокол, описанный в пункте 3.1.1.1, а для достижения высокой эффективности белка Cas9 были выбраны 3 протоспейсера на фрагмент гена *ANXA6* и синтезированы соответствующие направляющие РНК. Для изначальной характеристики системы с ФГ-химерными направляющими РНК был выбран 1 протоспейсер, и чтобы оценить принципиальную возможность использования химерных crРНК, содержащих ФГ-группы, для сборки каталитически активных комплексов с белком Cas9 был использован плазмидный ДНК-субстрат

Анализ результатов выявил, что для химерных вариантов crРНК, содержащих одну ФГ-модификацию, эффективность расщепления плазмиды варьируется от 50 до 88% относительно немодифицированной химерной crРНК (IG0) в зависимости от положения модификации (Рисунок 32). Эффективность расщепления ДНК-субстрата заметно снижается при включении ФГ-группы в четвертое положение с 5'-конца crРНК (Рисунок 32Б-Г).

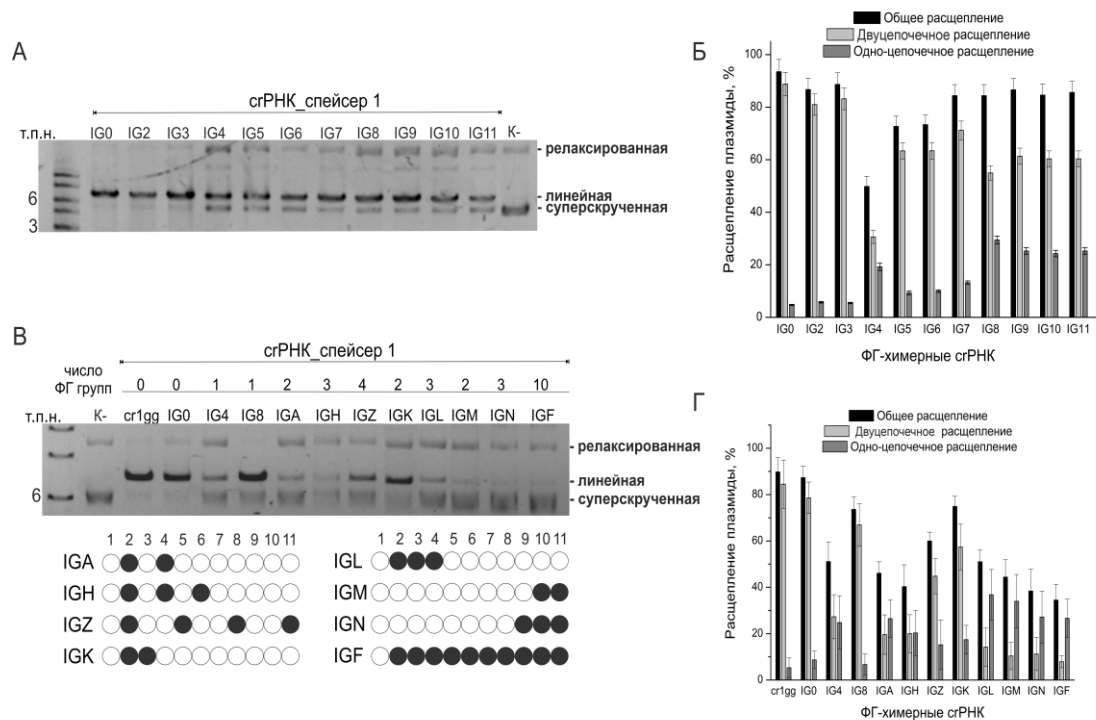


Рисунок 32. Сайт-зависимое влияние ФГ-модификаций в химерной crRNA на эффективность расщепления плазмиды. А – расщепление плазмиды pANXA6 с помощью белка Cas9, образующего комплекс с химерными вариантами crRNA, содержащими единичную ФГ-группу в различных положениях РАМ-дистальной области спейсера 1. IG0 представляет собой химерную crRNA, не содержащую ФГ-модификаций. Цифры в названии модифицированных вариантов указывают положение соответствующих нуклеотидов, несущих ФГ-группу. К- представляет собой контрольную реакцию без Cas9. Две верхние полосы представляют собой продукты расщепления: релаксированную – одноцепочечную форму расщепления и линейную – двуцепочечную форму расщепления, а нижняя полоса представляет собой интактную суперскрученную плазмиду. Б – диаграмма процентного соотношения одноцепочечного и двуцепочечного расщепления, а также их суммы - общего расщепления. В – аналогична панели А, но представляет собой варианты crRNA, содержащие множественные ФГ-модификации. Г – аналогична панели Б, представляющая проценты расщепления для вариантов, показанных в панели В. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD по трем независимым повторам.

Для выявления наблюдается ли негативный эффект от модификации 4-го положения при увеличении числа ФГ-групп, были синтезированы crRNA, содержащие дополнительно одну или две ФГ-модификации, введенные через один нуклеотид (IGA, IGH). Также был исследован эффект нескольких ФГ-групп в зависимости от их расположения в ДНК области

спейсера сгРНК: на 5'-конце РАМ-дистальной области (IGK, IGL), равномерно распределенные по всей РАМ-дистальной области (IGZ) или прилегающие к РАМ-проксимальной области (IGM, IGN) (Рисунок 32В).

При увеличении количества ФГ-модификаций в сгРНК происходит заметное снижение эффективности двуцепочечного расщепления плазмиды по сравнению с включением единичных ФГ-групп (Рисунок 32В). Например, включение десяти ФГ-модификаций в направляющую РНК IGF приводит к снижению гидролиза плазмидного субстрата до 10% (Рисунок 32Г). Интересно, что 4-ая позиция проявляет самую высокую чувствительность к введению ФГ-группы, при этом даже единичная модификация приводит к снижению двуцепочечного расщепления до 30%. Дополнительное включение одной и двух ФГ-групп ведет к дальнейшему снижению активности расщепления до 20% и 12% для химерных вариантов сгРНК IGA, IGN и IGL соответственно (Рисунок 32Г). Тандемные вставки ФГ-модификаций в районе, прилегающему к РАМ-проксимальной области, особенно в 9-ом – 11-ом положениях, аналогично значительно снижают процент расщепленного продукта (IGM, IGN, Рисунок 32Г). Интересно, что направляющая РНК IGK, включающая две тандемные ФГ-группы в РАМ-дистальной области, демонстрирует минимальный негативный эффект и поддерживает эффективность общего расщепления, сравнимую с IG8, содержащей одну ФГ-модификацию (Рисунок 32Г). При этом IGZ с 4-мя равномерно распределенными ФГ-группами, снижает общую эффективность расщепления по сравнению с IGK и IG8, однако остается на достаточно высоком уровне в 60%. Таким образом, исключение модификации 4-го положения способствует эффективному гидролизу плазмиды.

Чтобы учесть возможное влияние последовательности, результаты, полученные для направляющих РНК нацеленных на 1 протоспейсер, были подтверждены для двух дополнительных вариантов протоспейсера 2 и 3 (Рисунок 33). В результате мы показали, что тенденции, наблюдаемые для первого протоспейсера, сохранялись для всех протоспейсеров, что подтверждает надежность представленных результатов.

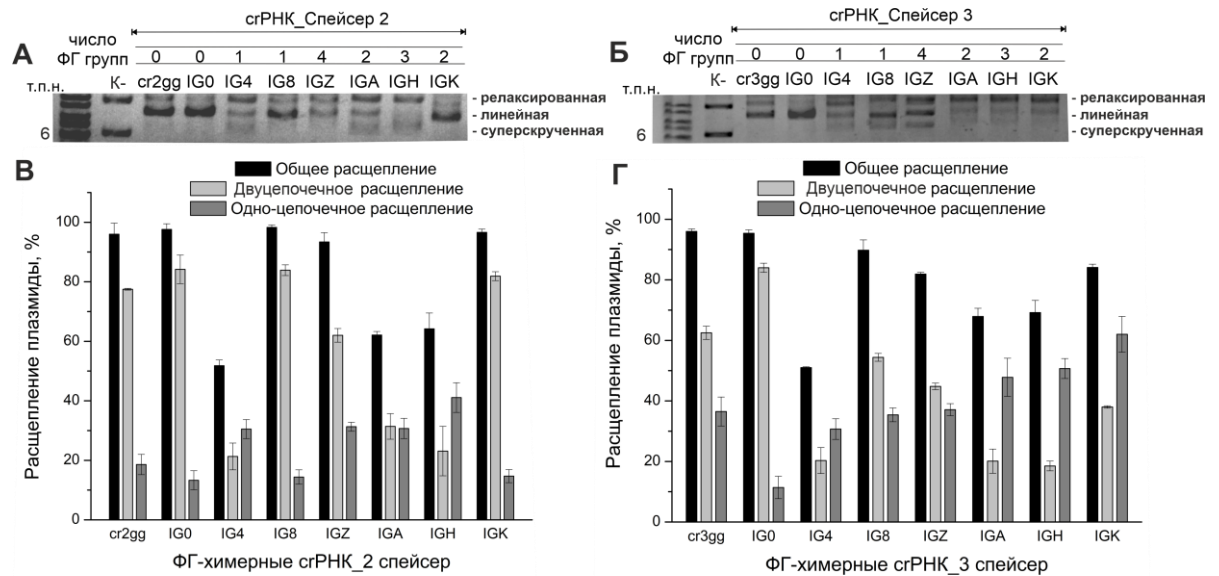


Рисунок 33. Химерные crRNA с ФГ-модификациями поддерживают расщепление плазмидных субстратов по двум дополнительным локусам (2 и 3 протоспейсерам). А, Б – расщепление плазмиды pANXA6 с помощью комплексов белка Cas9 с ФГ-модифицированными химерными crRNA, содержащими спейсеры 2 (А) и 3 (Б), немодифицированными crRNA (cr2gg, cr3gg) или немодифицированными химерными crRNA (IG0). Плазмиду без белка использовали в качестве контроля реакции (К-). Две верхние полосы представляют собой продукты расщепления: релаксированную – одно-цепочечную форму расщепления и линейную – двуцепочечную форму расщепления, а нижняя полоса представляет собой интактную суперскрученную плазмиду. В, Г – процент расщепления плазмиды, на который нацелены комплексы белка Cas9 с модифицированными crRNA со спейсерами 2 (В) и 3 (Г) соответственно. Показаны средние значения $\pm$ SD по трем независимым экспериментам.

Исходя из полученных результатов, ФГ-модификация в четвертом положении и ФГ-группы вблизи РАМ-проксимальной области химерных crRNA замедляют реакцию расщепления. Мы связываем это снижение эффективности с неблагоприятным конформационным расположением активного домена белка Cas9, подчеркивая критическую роль модификации 4-ого положения в crRNA на работу системы CRISPR/Cas9. Ранее было продемонстрировано, что фосфатные группы нуклеотидов во 2-ом и 4-ом – 6-ом положениях взаимодействуют с доменом REC1, и опосредованно влияют на каталитический центр HNH [19]. На основании этих данных, можно предположить, что

объемная ФГ-модификация в 4-ом положении отталкивает центр HNH от комплекса ДНК:РНК, в результате снижая активность белка Cas9.

Таким образом, химерные crРНК, содержащие либо одну, либо несколько ФГ-модификаций, за исключением 4-го положения, способны образовывать каталитически активные комплексы с tracrРНК и белком Cas9, что позволяет эффективно расщеплять плазмидный ДНК-субстрат *in vitro*.

3.2.3. Исследование кинетики ФГ-модифицированных химерных crРНК

В рамках данной работы, чтобы изучить, как положения вставки и количество ФГ-групп влияют на эффективность расщепления, рассчитали, как наблюдаемые константы скорости ($k_{\text{наб}}$), так и максимальные теоретические степени ($A_{\text{макс}}$) реакций расщепления как на нецелевых, так и на целевых цепях ДНК (Таблицы 5 – 6). Проведенное сравнение скорости гидролиза каждой цепи ДНК-дуплекса позволяет оценить влияние ФГ-модификаций на функциональность активных центров HNH и RuvC нуклеазы Cas9 (Рисунок 34А).

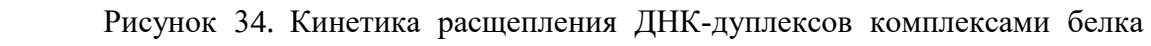
Таблица 5. Наблюдаемые константы скорости ($k_{\text{наб}}$) и максимальная теоретическая степень расщепления ДНК ($A_{\text{макс}}$) при использовании ФГ-модифицированных химерных crРНК для гидролиза целевой цепи ДНК-дуплекса.

Число ФГ-групп	Целевая цепь								
	0	0	1	1	2	3	4	2	3
crРНК	cr1gg	IG0	IG4	IG8	IGA	IGH	IGZ	IGK	IGL
$k_{\text{наб}}$, мин ⁻¹	0.048 ±0.00 5	0.038± 0.004	0.007± 0.001	0.048± 0.004	0.0051 ± 0.0005	0.0048± 0.0004	0.010± 0.001	0.017 ±0.00 1	0.004 0± 0.000 4
$A_{\text{макс}}$	95.5± 0.8	90.5± 0.9	72.2± 3.9	98.1± 0.5	73.8± 2.6	63.4± 2.2	84.4± 3.3	94.3± 1.0	64.6± 3.0

Таблица 6. Наблюдаемые константы скорости ($k_{\text{наб}}$) и максимальная теоретическая степень расщепления ДНК ($A_{\text{макс}}$) при использовании химерных ФГ-модифицированных crРНК для гидролиза нецелевой цепи ДНК-дуплекса.

Число ФГ- групп	Нецелевая цепь								
	0	0	1	1	2	3	4	2	3
crРНК	cr1gg	IG0	IG4	IG8	IGA	IGH	IGZ	IGK	IGL
$k_{\text{наб}}$, мин ⁻¹	0.038 ± 0.002	0.019± 0.005	0.0047± 0.0004	0.045± 0.006	0.0061 ± 0.0004	0.0045 ± 0.0002	0.0123 ± 0.0007	0.014 ±0.00 1	0.001 9± 0.000 2
$A_{\text{макс}}$	88.1± 0.6	75.9± 4.5	71.4± 2.8	84.9± 1.0	54.9± 1.5	56.8± 0.9	69.4± 1.1	85.1± 1.9	57.2± 2.1

Согласно полученным данным Таблиц 5 и 6, вариант IG8 проявляет более высокую скорость расщепления ДНК-субстратов, чем немодифицированная crРНК (Рисунок 34А). С другой стороны, в соответствии с предыдущими результатами (Рисунки 32-33), наличие ФГ-группы в 4-ом положении ингибирует реакцию расщепления, что приводит к 10-кратному снижению скорости гидролиза обеих цепей ДНК-дуплекса для crРНК IG4, несущей единичную модификацию, а также для вариантов IGA, IGH и IGL, содержащих одну или две дополнительные ФГ-группы, по сравнению с немодифицированной crРНК (Рисунок 34Б, В).



Анализ кинетических кривых показал, что среди химерных crПНК, содержащих несколько ФГ-модификаций, наибольший ингибирующий эффект на активность белка Cas9 оказывает направляющая crПНК IGL, а наименьшее влияние на скорость реакции расщепления — варианты IGK и IGZ. В последних случаях $k_{\text{наб}}$ уменьшается лишь в три раза, а максимальная степень расщепления снижается примерно на 10% по сравнению с контрольными crПНК (cr1gg, IG0, Рисунок 34Б, В).

В совокупности исследование кинетики расщепления ФГ-модифицированных химерных crРНК выявило разную скорость гидролиза нецелевых и целевых цепей. Наличие ФГ-модификаций, аналогично результатам с природными модификациями, приводит к более низкой скорости расщепления нецелевой цепи по сравнению с целевой цепью, что свидетельствует о возможном разобщении расщепления каталитическими центрами HNH и RuvC внутри белка Cas9 [121]. Следовательно, ФГ-модификации влияют не только на расщепление целевой цепи ДНК, с которой непосредственно связывается направляющая

РНК, но и на расщепление нецелевой цепи. Данный эффект, аналогично описанному в пункте 3.2.2 объяснению, может быть вызван размером ФГ-группы.

Ближайшим аналогом ФГ-группы является тиофосфатная (PS) модификация, которая принадлежит к фосфатным модификациям и позволяет значительно увеличить эффективность геномного редактирования [77,79]. Другой известной модификацией направляющих РНК является модификация рибозы — 2'-F, которая в настоящее время широко применяется в системах CRISPR/Cas9 и аналогично PS группе повышает целевую эффективность расщепления [78,79]. Однако данные модификации обладают существенными недостатками, а именно высокой токсичностью для клеток и низкой специфичностью. В ходе данной работы для сравнения ФГ-групп с другими модификациями были синтезированы три аналога: 1) sgРНК с тремя PS модификациями на 5'-конце (3PS), которая по литературным данным проявляет высокую эффективность расщепления ДНК-субстратов [76]; 2) sgРНК с одной PS группой в 4-ом положении с 5'-конца (IG4_PS) для проверки сохранения закономерности влияния данной модификации, как в случае с ФГ-группой, на активность белка Cas9; 3) sgРНК с 2'-F группами (sgF), в которой модификации были введены в положения, позволяющие достичь максимальной эффективности расщепления ДНК-субстратов (Рисунок 35А) [78]. Было проведено исследование кинетики расщепления ДНК-субстрата комплексами белка Cas9 с вышеперечисленными модифицированными направляющими sgРНК (Рисунок 35).

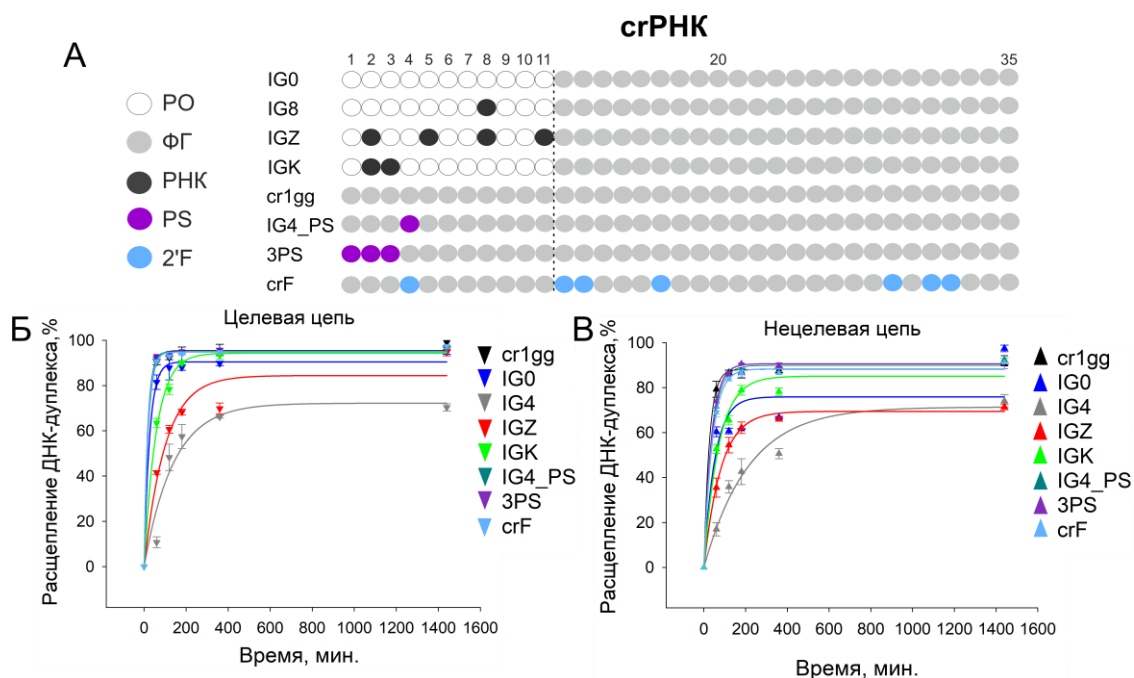


Рисунок 35. Сравнение влияния ФГ, PS и 2'-F модификаций в направляющих РНК на активность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. А — схематическое представление направляющих РНК; Б, В — сравнение кинетики расщепления ДНК-субстрата для crРНК с тиофосфатными (IG4_PS, 3PS), 2'-фтор (crF) и ФГ-группами (IG4, IGK, IGZ) по целевой (Б) и нецелевой (В) цепи. Данные показаны как средние значения $\pm$ SD по трем независимым экспериментам.

В результате сравнения кинетических кривых было выявлено, что при включении PS и 2'-F модификаций в crРНК существенных различий в эффективности расщепления ДНК-дуплексов не наблюдается по сравнению с немодифицированным контролем (cr1gg), а в сравнении с немодифицированной химерной crРНК (IG0) даже происходит небольшое увеличение скорости гидролиза (Рисунок 35Б, В). Кроме того, в отличие от ФГ-модификации наличие как PS группы, так и 2'-F в 4-ом положении не замедляет протекание реакции (IG4_PS, crF, Рисунок 35). Возможно, это происходит из-за небольшого размера PS и 2'-F модификаций в отличие от стерически объемного фосфорилгуанидина. Однако, включение ФГ-групп в другие позиции (IGZ, IGK) позволяет достичь скорости гидролиза обеих цепей ДНК-субстрата, которая незначительно ниже скорости, полученной для аналогов с PS и 2'-F модификациями (Рисунок 35). Стоит отметить что для crРНК, содержащими PS и 2'-F модификации, $k_{\text{наб}}$ изменяются лишь в 1.2-1.5 раза в зависимости от цепи, а максимальные теоретические степени расщепления сопоставимы с контрольной crРНК (Таблица 7). Рассчитанные значения кинетических параметров подтверждают, что

PS и 2'-F модификации наравне с единичными и несколькими ФГ-модификациями позволяют поддерживать эффективность расщепления на уровне контрольной немодифицированной направляющей crРНК (Таблицы 5 – 7). Согласно литературным данным, тиофосфатные связи и 2'-F модификации повышают эффективность расщепления ДНК-мишени за счет повышения стабильности дуплексов ДНК:crРНК [78,79]. Можно предположить, что за счет пространственных ограничений, возникающих при включении ФГ-группы, ФГ-химерные crРНК проявляют сниженную активность по сравнению с схожими аналогами.

Таблица 7. Сравнение наблюдаемых констант скорости ($k_{\text{наб}}$) и максимальных степеней расщепления ДНК ($A_{\text{макс}}$) для crРНК с тиофосфатными (PS), фтор (2'-F) и ФГ-группами.

	Целевая цепь					Нецелевая цепь				
	cr1gg	IG4	IG4_PS	3PS	crF	cr1gg	IG4	IG4_PS	3PS	crF
$k_{\text{наб}}$, мин ⁻¹	0.048	0.007±	0.048±	0.056	0.051±	0.038	0.004	0.026±	0.028	0.025
	±	0.001	0.005	±	0.004	±	7±	0.001	±	±
	0.005			0.004		0.002	0.000		0.001	0.001
							4			
$A_{\text{макс}}$	95.5	72.2±	95.5±	94.9±	94.8±	88.1±	71.4±	89.9±	90.6±	88.3±
	± 0.8	3.9	0.8	0.4	0.4	0.6	2.8	0.6	0.5	0.6

Таким образом, включение ФГ-группы в 4-е положение существенно снижает скорость реакции расщепления. Однако, точный выбор количества ФГ-модификаций и положений их вставки в химерной направляющей РНК позволяет достичь эффективности расщепления ДНК-субстратов, сравнимой с эффективностью для контрольных crРНК и crРНК, содержащих тиофосфатные и 2'-F группы.

3.2.4. Оценка влияния ФГ-групп в химерных crРНК на специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*

Ранее было показано, что использование crРНК с десятью 5'-концевыми дезоксирибонуклеотидами позволяет снизить нецелевые эффекты системы CRISPR/Cas9 [80,95,147]. Однако, включение ДНК мономеров в направляющие РНК сопровождается снижением эффективности расщепления ДНК-мишени. В данной работе были объединены

ФГ-модификации и дезоксирибонуклеотиды для достижения наибольшей специфичности без значительного снижения эффективности геномного редактирования. Для оценки влияния ФГ-групп в химерных sgРНК на специфичность Cas9, использовали набор мутантных ДНК-субстратов, описанный в пункте 3.1.3. Схема эксперимента представлена на Рисунке 36А.

Согласно полученным данным, белок Cas9 в комплексе с немодифицированной sgРНК (cg1gg) расщепляет ДНК-субстраты с одиночными мисматчами с эффективностью аналогичной эффективности расщепления нативного ДНК-субстрата (WT). Тем не менее, при использовании ДНК-субстратов D13,14, D15,16 и D17,18 наблюдается значительное снижение эффективности (Рисунок 36Б – Г). С другой стороны, комплекс с химерной sgРНК, не содержащей модификаций (IG0), незначительно снижает эффективность расщепления ДНК-дуплексов с одиночными мисматчами по сравнению с немодифицированной sgРНК (Рисунок 37).

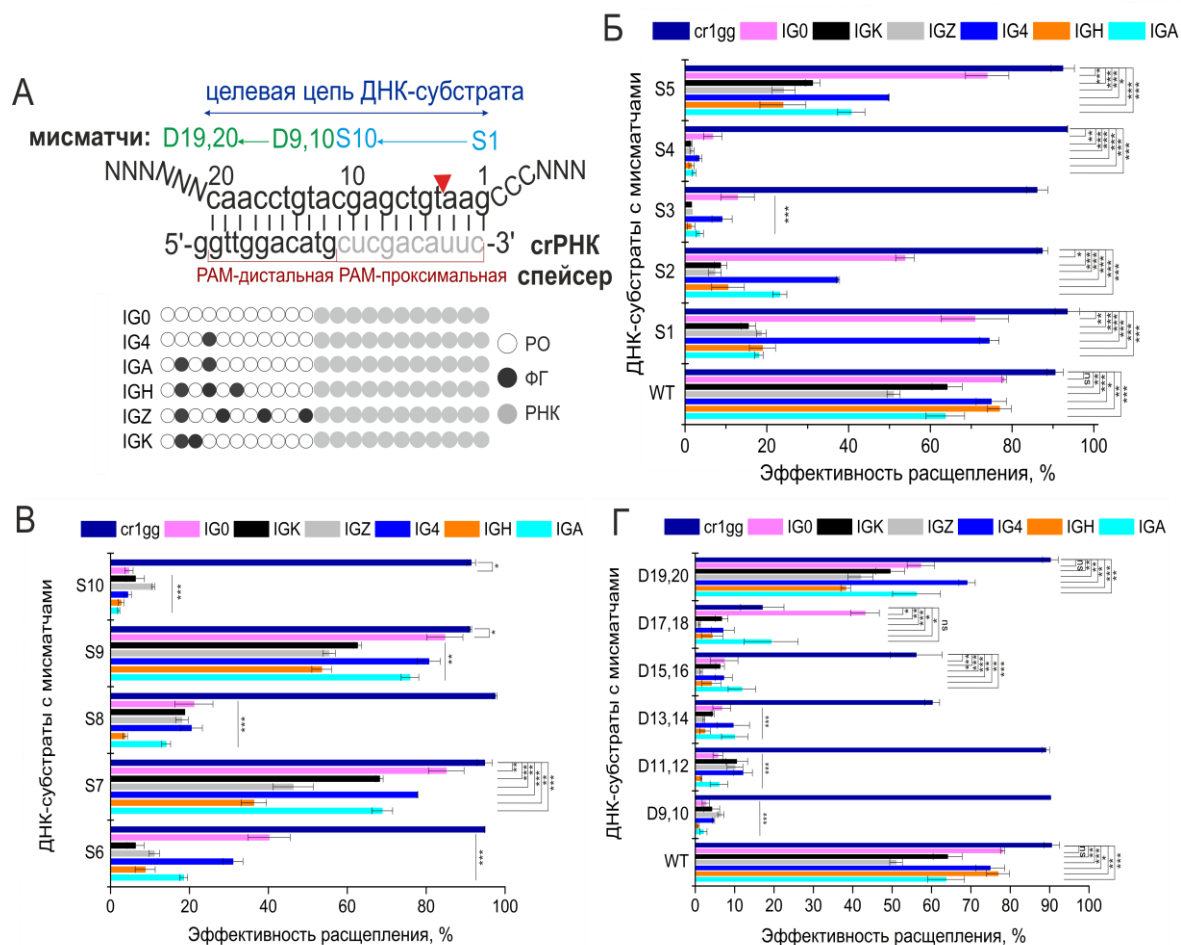


Рисунок 36. Оценка специфичности работы системы при использовании химерных crRNA с ФГ-группами. А — схема эксперимента, по оценке специфичности. Б – Г — эффективность расщепления (%) ДНК-субстратов с одиночными (Б, В) и двойными мисматчами (Г), комплексами белка Cas9 с немодифицированными tracrRNA и химерными crRNA, содержащими одну (IG4) или несколько (IGA, IGH, IGZ, IGK) ФГ-модификаций. В качестве контролей использовались немодифицированная crRNA (cr1gg) и немодифицированная химерная crRNA (IG0). Результаты представлены как средние значения $\pm$ SD по трем независимым экспериментам. Значения p рассчитывали с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента в сравнении с соответствующей выборкой результатов, полученных при использовании немодифицированных crRNA (cr1gg) (ns: незначительно, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

Для оценки влияния ФГ-модификаций на специфичность системы CRISPR/Cas9 было выбрано подмножество из трех ФГ-модифицированных sgRNA, каждая из которых

содержит модификацию в 4-ом положении: либо без модификации остальных положений (IG4), либо с одной (IGA), либо с двумя дополнительными модификациями (IGH) в других положениях (Рисунок 36А). Дополнительно были исследованы и другие варианты направляющих *сгРНК*, показавших высокую степень гидролиза ДНК-субстратов в предыдущих экспериментах, а именно: IGK с двумя ФГ-группами, и IGZ с четырьмя ФГ-модификациями, введенными в положения отличные от четвертого (Рисунок 36А). Хотя все варианты демонстрируют эффективность расщепления WT ДНК-субстрата, сравнимую с немодифицированной *сгРНК*, однако степень расщепления соответствующих мутантных ДНК-субстратов зависит от положения ФГ-модификации относительно позиций мисматчей (Рисунок 36). В соответствии с ранее представленными кинетическими данными, включение ФГ-модификации в 4-ое положение химерной *сгРНК* приводит к умеренному снижению эффективности расщепления ДНК-субстратов с мисматчами (Рисунок 36). На основании результатов по оценке специфичности, при использовании IGZ и IGK практически для всех мисматчей наблюдается достоверное снижение процента расщепленного продукта (Рисунок 36). Однако, в положениях мисматчей S10, D9,10 и D11,12, эффективность расщепления для ФГ-модифицированных *сгРНК* сопоставима с эффективностью расщепления для контрольной химерной ДНК:РНК направляющей (IG0). Данные мисматчи, приводящие к снижению эффективности расщепления, расположены в области, где РНК:ДНК дуплекс А-формы переходит в ДНК:ДНК дуплекс В-формы, воздействуя на геометрию межспиральной области и тем самым, возможно, изменяя конформацию переходного состояния. Что, в свою очередь, влияет на каталитическую скорость работы центра HNH нуклеазы Cas9, а также дестабилизирует дуплекс, за счет дезоксирибонуклеотидов, которые снижают максимальную теоретическую степень расщепления ($A_{\text{макс}}$) и наблюдаемую константу скорости. Однако, известно, что ФГ-модификации не изменяют А-форму РНК при образовании дуплекса между РНК и ДНК [139]. Поэтому можно предположить, что в позициях мисматчей S10, D9,10 и D11,12 ФГ-модифицированные *сгРНК* проявляют более высокую эффективность расщепления по сравнению с IG0 из-за частичного сохранения А-формы РНК в дуплексе РНК:ДНК.

Для количественной оценки точности белка Cas9 рассчитывали показатель специфичности, представляющий собой кратное уменьшение эффективности расщепления в сайте мисматча относительно эффективности расщепления WT ДНК-субстрата, нормализованного на относительную активность немодифицированной *сгРНК* или немодифицированной химерной *сгРНК* (IG0) в данном мисматче (Рисунок 37). Анализ

показателей специфичности для направляющей РНК IG0 выявил умеренный и неизменный вклад дезоксирибонуклеотидов в специфичность ФГ-модифицированных химерных crРНК (Рисунок 37А-В). Однако комбинация дезоксирибонуклеотидов и ФГ-групп позволяет дополнительно повысить показатель специфичности, особенно вблизи сайта гидролиза ДНК-субстрата (S3; S4) и в определенных положениях РАМ-дистальной области crРНК (D9,10; D15,16 и D17,18) (Рисунок 37). Эффект положения мисматча на специфичность определяется его влиянием на каталитическую активность белка Cas9, особенно в процессах связывания и расщепления.

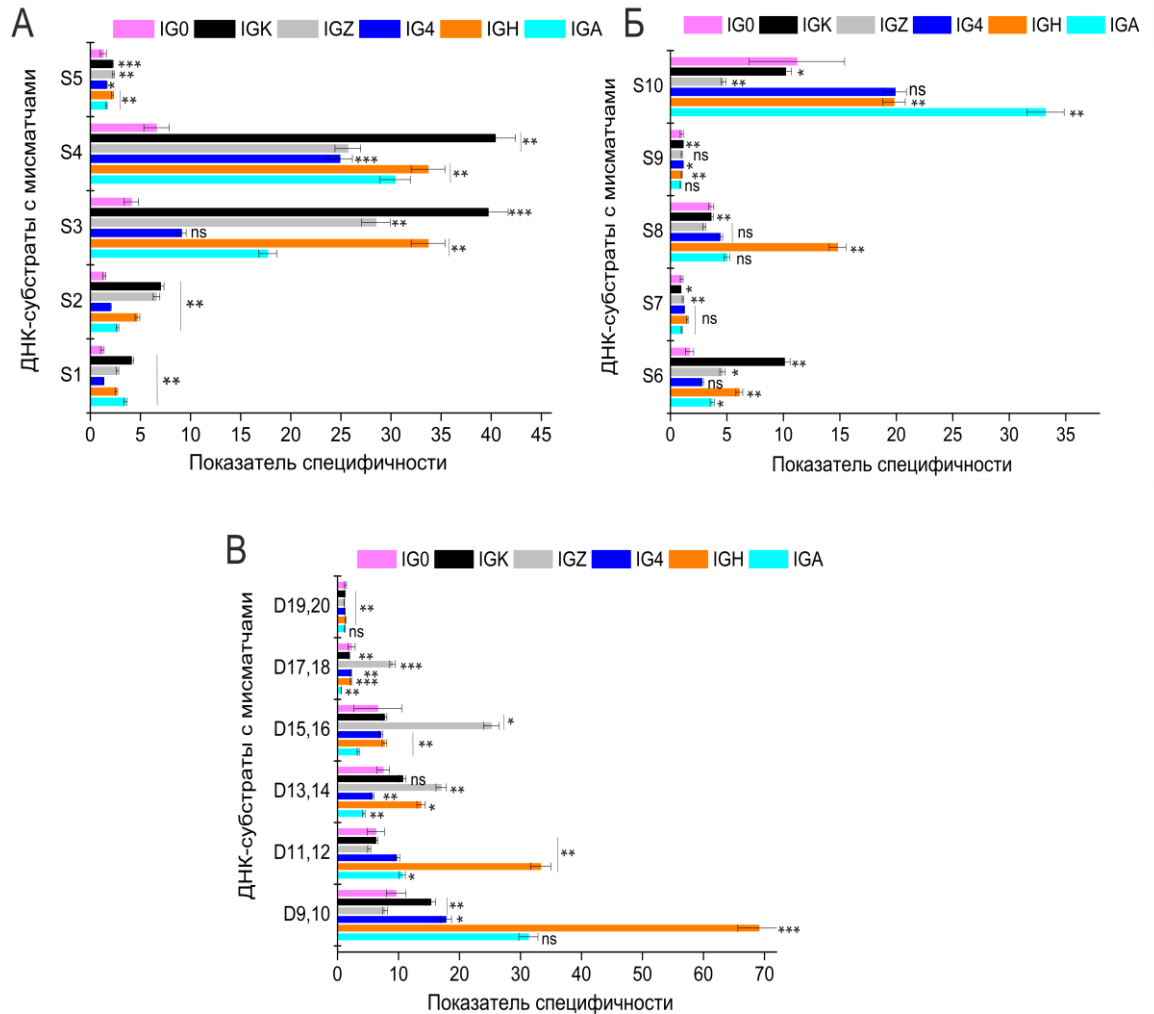


Рисунок 37. Анализ показателей специфичности для химерных crRNA, содержащих ФГ-модификации. А - В — показатели специфичности немодифицированной химерной crRNA (IG0) и химерных crRNA, содержащих ФГ-группу в 4-ом положении (IG4, IGA, IGH) и в других позициях (IGK, IGZ) для ДНК-субстратов, содержащих одиночные мисматчи (А, Б) или двойные мисматчи (В), рассчитанные относительно немодифицированной crRNA. Показаны средние значения $\pm$ SD по трем независимым экспериментам. Значения p рассчитывали с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента в сравнении с соответствующей выборкой результатов, полученных при использовании немодифицированной crRNA (cr1gg) (ns: незначительно, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Включение ФГ-модификации в 4-ое положение (IG4, IGA, IGH) способствует увеличению точности белка Cas9 в 2-6 раз (Рисунок 38), что согласуется с литературными данными об изучении влияния химических модификаций фосфата, таких как 2'-О-метил-

3'-фосфоацетат, в 4-ой позиции crPНК, которые также увеличивают специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro* [82]. Однако, среди всех изученных модифицированных crPНК наибольший вклад ФГ-модификации в повышение специфичности наблюдается для IGZ и IGK, не содержащих ФГ-группы в 4-м положении, причем как в РАМ-проксимальной, так и в РАМ-дистальной областях протоспейсера (Рисунок 38). При этом точность белка Cas9 *in vitro* увеличивается в 5-40 раз в зависимости от положения мисматча.

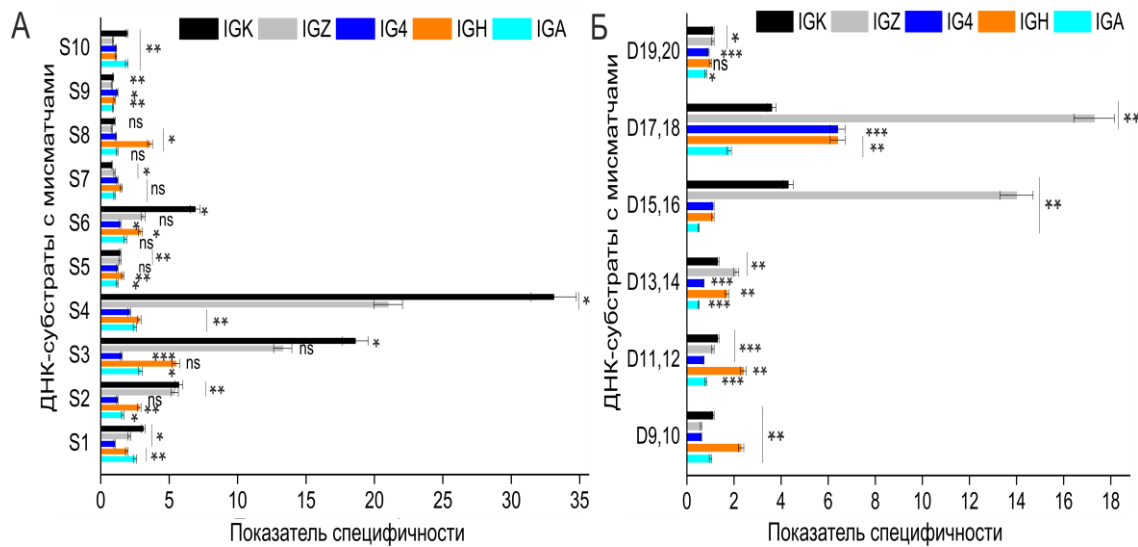


Рисунок 38. Вклад ФГ-групп химерных crPНК в специфичность системы CRISPR/Cas9. А, Б — показатели специфичности ФГ-модифицированных химерных crPНК для одиночных (А) и двойных мисматчей (Б), рассчитанные относительно IG0. Показаны средние значения $\pm$ SD по трем независимым экспериментам. Значения p рассчитывали с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента в сравнении с соответствующей выборкой результатов, полученных при использовании немодифицированной химерной crPНК (IG0) (ns: незначительно, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Можно предположить, что включение ФГ-модификаций ингибирует конформационные перестройки в каталитическом центре HNH белка Cas9 во время реакции расщепления, особенно в случае РАМ-дистальных несоответствий [148]. Кроме того, важную роль в изменении специфичности белка Cas9 играет кинетика дуплекса crPНК-ДНК, которая выявила снижение скорости реакции расщепления при включении ФГ-модификаций [149]. Вместе с тем, возможно, что высокая точность является результатом стерических препятствий, вызванных размером ФГ-группы. Аналогичный эффект наблюдается при введении LNA и BNA мономеров в направляющие РНК, которые способны нарушать взаимодействия РНК:белок в комплексах РНП:ДНК [81].

В рамках данной работы для оценки степени преимущества введения ФГ-модификаций перед другими существующими химическими модификациями было проведено сравнение специфичности ФГ-химерных sgРНК с аналогами, содержащими PS и 2'F модификации, описанными в пункте 3.2.3. Согласно полученным результатам, при использовании sgРНК с 2'-F или PS модификациями эффективность гидролиза WT ДНК-субстрата и ДНК-субстратов с мисматчами не изменяется в сравнении с немодифицированной sgРНК и достигает примерно 95% (Рисунок 39А – В).

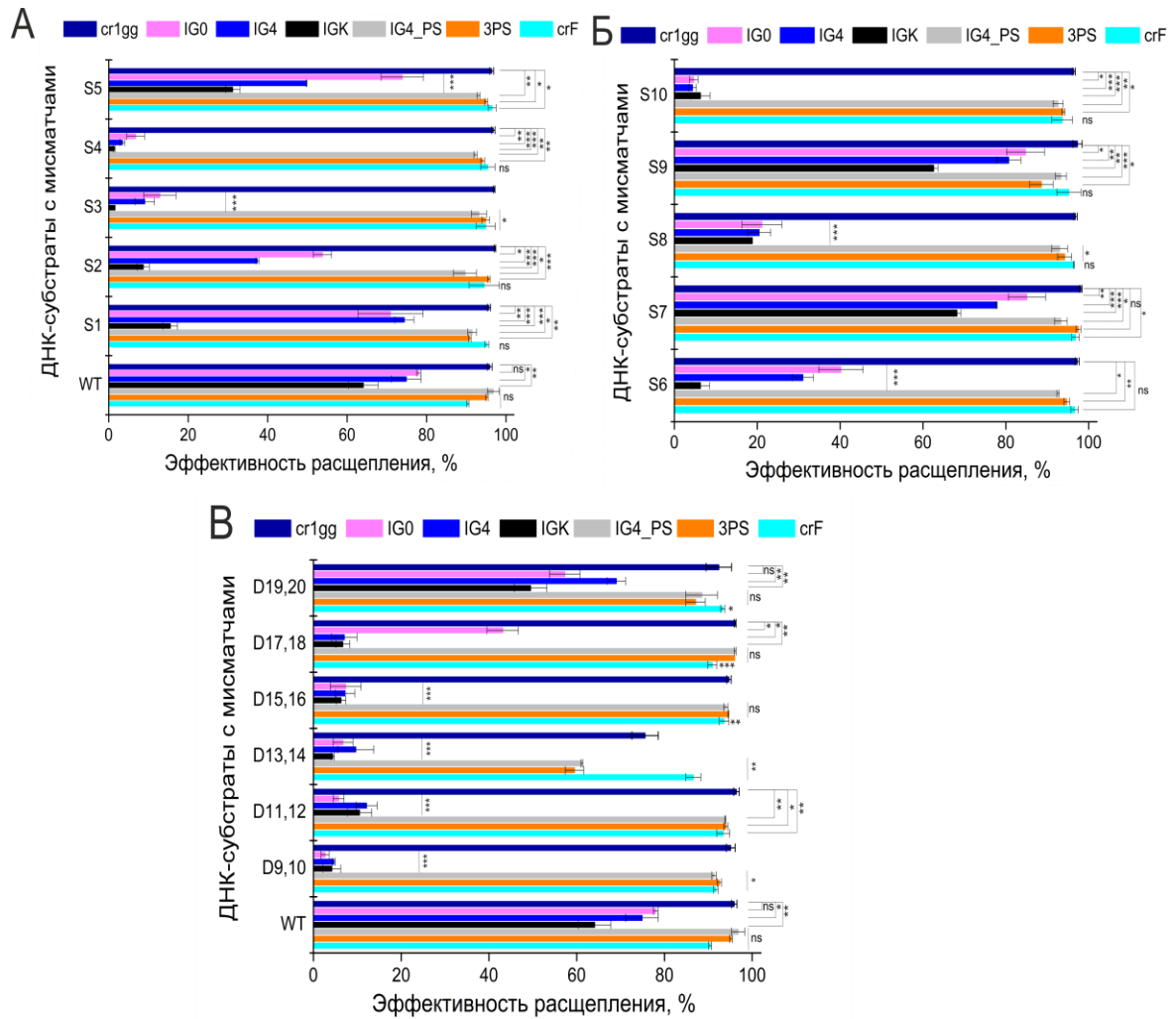


Рисунок 39. Сравнение специфичности системы CRISPR/Cas9 при использовании ФГ-химерных crПНК и crПНК, содержащих PS и 2'F модификации. А – В — эффективность расщепления (%) ДНК-субстратов с одиночными (А, Б) и двойными мисматчами (В), комплексами белка Cas9 с немодифицированной tracrПНК и химерными crПНК, содержащими одну или несколько ФГ-модификаций, а также направляющими РНК с одной и несколькими PS и множественными 2'F группами. В качестве контролей использовали немодифицированную crПНК (cr1gg) и немодифицированную химерную crПНК (IG0). Результаты представлены как средние значения $\pm$ SD по трем независимым экспериментам. Значения p рассчитывали с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента в сравнении с соответствующей выборкой результатов, полученных при использовании немодифицированной crПНК (cr1gg) (ns: незначительно, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Показатель специфичности для crРНК с 2'-F или PS модификациями относительно немодифицированной crРНК не превышает единицы для любого положения мисматча (Рисунок 40). Кроме того, по сравнению с ФГ-группой включение PS или 2'-F модификации в 4-ое положение не приводит к увеличению специфичности реакции. Можно сделать вывод, что точность системы CRISPR/Cas9 существенно повышается при включении ФГ-модификаций в направляющие crРНК в сравнении с 2'-F и PS группами.

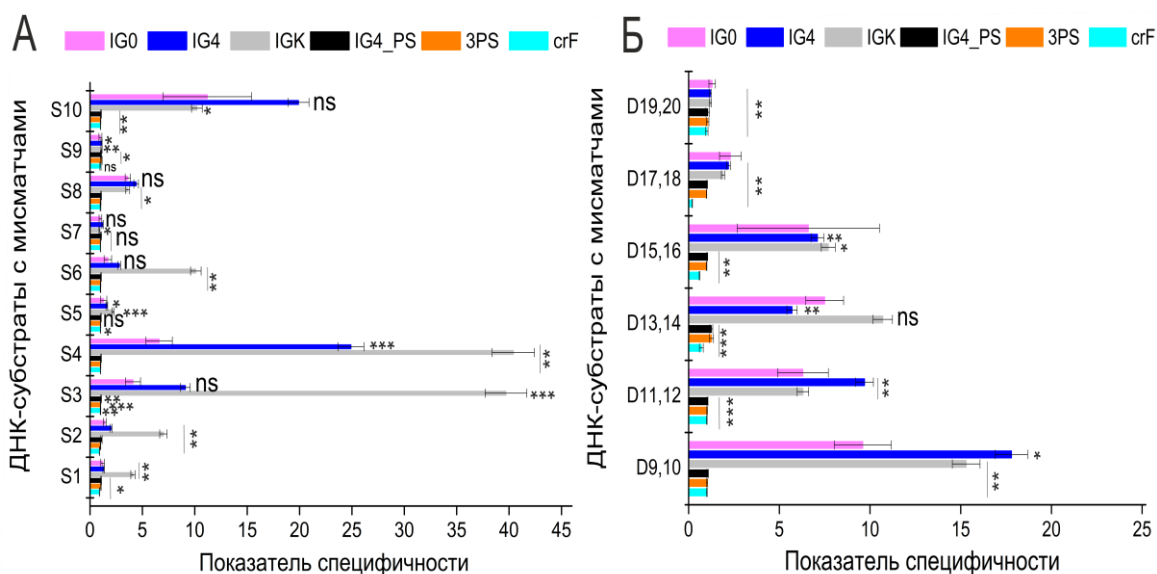


Рисунок 40. Анализ показателей специфичности при использовании ФГ-химерных crРНК и аналогов с PS и 2'-F группами в системе CRISPR/Cas9. А, Б — показатели специфичности для ФГ-химерных crРНК и для crРНК, содержащих PS (IG4_PS, 3PS) и 2'-F (crF) модификации на ДНК-субстратах, содержащих одиночные мисматчи (А) или двойные мисматчи (Б), рассчитанные относительно немодифицированной crРНК.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что химерные crРНК, содержащие ФГ-модификации, повышают специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. Химерная crРНК IGK выгодно отличается от остальных модифицированных crРНК как по показателю специфичности, так и по эффективности расщепления. Таким образом, она является наиболее перспективным вариантом для дальнейших экспериментов. Кроме того, в сравнении с ближайшим аналогом PS группой и широко распространенной 2'-F модификацией ФГ-модификации позволяют добиться достоверного увеличения специфичности практически при любом положении и числе мисматчей.

3.2.5. Исследование влияния ФГ-групп в химерных *сгРНК* на активность системы CRISPR/Cas9 в клетках

Известно, что частичная замена до десяти рибонуклеотидов на дезокси аналоги с 5'-конца направляющей РНК позволяет редактировать клетки в культуре [93]. Для оценки возможности использования системы CRISPR/Cas9 с ФГ-модифицированными химерными *сгРНК* в клетках применяли схему, представленную на Рисунке 41А, а эффективность редактирования оценивали с помощью цифровой ПЦР. Для достижения наилучшей эффективности редактирования клеток число ДНК мономеров в химерных направляющих *сгРНК* уменьшили с 10 до 4 [93].

Оценку проводили для химерных *сгРНК*, содержащих различное количество ФГ-групп (Рисунок 41Б). Кроме того, проверили сохранение закономерностей, полученных в результате *in vitro* экспериментов, на культуре клеток человека, для этого оценили эффективность редактирования в случае IG4, поскольку, согласно литературным данным, зависимости, полученные *in vitro*, не всегда совпадают с результатами на клетках [99]. Дополнительно провели сравнение влияния ФГ-модификаций и их аналогов PS групп в направляющих РНК на Cas9-опосредованное редактирование генов в клетках млекопитающих (Рисунок 41Б). В качестве контролей использовали немодифицированную *сгРНК* (*сг3gg*) и химерную *сгРНК* (IG0_4D) без модификаций (Рисунок 41Б). Двумерные графики результатов цифровой ПЦР для каждой модифицированной *сгРНК* представлены в Приложении Е.

Согласно полученным данным процент отредактированных клеток при использовании немодифицированных направляющих РНК (*сг3gg* и IG0) составляет примерно 20% (Рисунок 41В). В то же время химерные *сгРНК* с единичными ФГ-группами сохраняют эффективность редактирования на уровне с немодифицированными аналогами (IG2_4D и IG3_4D, Рисунок 41Б, В). С другой стороны, аналогично результатам, полученным *in vitro*, включение ФГ-модификации в 4-ое положение снижает количество мутантных клеток (IG4_4D, $p \leq 0.01$, Рисунок 41В). Ранее мы продемонстрировали, что паттерн из двух tandemных ФГ-групп в РАМ-дистальной области *сгРНК* значительно увеличивает специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. Тестирование аналогичной направляющей РНК (IGK_4D) в культуре клеток показало эффективность редактирования сопоставимую с немодифицированными контролями. Аналогичный результат был получен при включении как одной, так и нескольких тиофосфатных модификаций, при этом процент отредактированных клеток составил примерно 20%. Сравнение ФГ-модифицированных

Рисунок 41. Комплексы белка Cas9 с ФГ-модифицированными химерными crRNA поддерживают 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), а также crRNA с PS группами (IG4_PS_3, 3PS_3), а также в качестве контролей — немодифицированная crRNA (cr3gg) и немодифицированная химерная crRNA (IG0_4D). Б — 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 sgRNA (ns: незначительно, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Таким образом, систему CRISPR/Cas9 с ФГ-модифицированными химерными sgRNA можно использовать для редактирования клеток в культуре. Кроме того, ФГ-группы являются более перспективными модификациями, чем тиофосфатные модификации, так как способны значительно повышать специфичность.

В ходе данной работы мы изучили, как ФГ-группы в химерных sgRNA в зависимости от их расположения и количества влияют на активность и специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. В результате, было показано, что sgRNA, содержащие остатки дезоксирибонуклеотидов с одной или несколькими ФГ-группами в РАМ-дистальном районе, позволяют контролировать активность системы CRISPR/Cas9, одновременно улучшая ее специфичность *in vitro*. На основании полученных данных были определены позиции включения ФГ-модификаций в sgRNA, которые повышают специфичность, существенно не влияя на эффективность расщепления ДНК-мишени. РАМ-дистальная область на 5'-конце sgRNA, исключая 4-ое положение, наиболее благоприятна для введения ФГ-модификаций. Кроме того, ФГ-модифицированные химерные sgRNA способны поддерживать Cas9-опосредованное редактирование генов в культивируемых клетках человека. Также сравнение наших производных с тиофосфатными и 2'-F аналогами выявило, что ФГ-модификации перспективнее, так как значительно увеличивают специфичность, и не вызывают резкого снижения эффективности расщепления *in vitro* и *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система CRISPR/Cas на сегодняшний день является одним из наиболее удобных, доступных и широко применяемых инструментов редактирования генома и регуляции экспрессии генов. С момента открытия технологии геномного редактирования область ее применения значительно увеличилась и прошла путь от фундаментальных исследований до медицины и сельского хозяйства. Наиболее оптимизированной и изученной среди систем CRISPR/Cas является система CRISPR/Cas9, в частности, она обладает большим потенциалом для внедрения в терапию в качестве технологии для лечения генетических и вирусных заболеваний. В настоящее время на ее основе создаются новые инструменты для точечного редактирования без образования двухцепочечных разрывов или использования экзогенных ДНК матриц.

Однако несмотря на все преимущества и перспективы использования системы CRISPR/Cas9 существуют препятствия внедрения технологии геномного редактирования в практику. К основным проблемам относится: возникновение нецелевых эффектов, низкая эффективность расщепления и проблемы доставки. В настоящее время одной из стратегий решения этих проблем является модификация направляющей РНК как в виде crРНК/tracrРНК, так и в виде sgРНК. Ранее в литературе был описан ряд химических модификаций направляющих РНК, позволяющих улучшать специфичность или активность системы CRISPR/Cas9. Кроме того, модифицированные РНК способствуют эффективному редактированию генома *in vitro* и *in vivo*. Поэтому разработка и изучение свойств новых модификаций является перспективным направлением для усовершенствования системы CRISPR/Cas9.

В рамках настоящей диссертационной работы были получены и описаны направляющие РНК с двумя типами модификаций: модификациями азотистых оснований – m6A, m5C, Ψ и m1Ψ, и модификациями сахаро-фосфатного остова – дезоксирибонуклеотидные остатки с ФГ-модификациями. Проведенные эксперименты показали, что полученные производные способны поддерживать активность системы CRISPR/Cas9.

В данной работе был изучен эффект четырех широко распространенных модифицированных азотистых оснований: m6A, m5C, Ψ и m1Ψ в направляющих РНК на активность системы CRISPR/Cas9. Следует отметить, что в литературе по модификациям направляющих РНК преобладают работы по изучению химических и структурных

модификаций. Примеров использования природных РНК модификаций и оценки их влияния на системы геномного редактирования описано значительно меньше [99,100]. Нами была продемонстрирована принципиальная возможность использования m6A, m5C, Ψ и m1Ψ как в sgРНК, так и в tracrРНК для формирования каталитически активных комплексов с белком Cas9. В ходе работы был проведен систематический анализ эффективности расщепления от глубины модификации и времени реакции. В результате были определены оптимальные глубины модификации tracrРНК и sgРНК в случае каждого модифицированного мономера для эффективного расщепления ДНК-субстратов. Стоит отметить, что при включении m6A, Ψ, m5C и m1Ψ в sgРНК эффективность расщепления ДНК-субстрата является сиквенс-специфичной и зависит от последовательности спейсера, особенно РАМ-проксимальной области. Учитывая то, что одна из основных проблем системы CRISPR/Cas9 связана с возникновением нецелевых эффектов, была проведена оценка точности расщепления ДНК-субстратов комплексами белка Cas9 с направляющими РНК, содержащими m6A, Ψ, m5C и m1Ψ. Показано успешное применение неканонических азотистых оснований в sgРНК для повышения точности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* по сравнению с немодифицированным вариантом sgРНК. Другим безусловным преимуществом направляющих РНК с модифицированными нуклеотидными остатками является их низкая иммуногенность и цитотоксичность. Кроме того, полученные нами результаты показали, что модифицированные направляющие РНК способны поддерживать Cas9-опосредованное редактирование генов в культивируемых клетках человека. Таким образом, среди исследованных модифицированных азотистых оснований m5C позволяет достичь максимальной эффективности расщепления необходимой ДНК-мишени, а m1Ψ обеспечивает наибольший показатель специфичности и значительно снижает нецелевые эффекты. Поэтому перспективным направлением является сочетание данных модификаций для достижения баланса между активностью и точностью и в дальнейшем получение эффективной системы геномного редактирования CRISPR/Cas9.

Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды были открыты несколько лет назад и на данный момент мало изучены. Следует отметить, что в рамках данной работы ФГ-модификации были впервые введены в направляющие РНК и исследован их эффект на активность системы CRISPR/Cas9. Ранее в литературе были описаны crРНК, в которых рибонуклеотиды были заменены на дезокси-аналоги, и было показано, что они повышают точность редактирования генома. Для использования данного преимущества нами были получены химерные crРНК, содержащие остатки дезоксирибонуклеотидных остатков с ФГ-

группами. Было показано, что включение ФГ-групп в направляющие РНК не препятствует формированию каталитически активных комплексов с белком Cas9. В данной работе впервые проведена оценка эффективности расщепления ДНК-субстратов в зависимости от положения и количества ФГ-групп в химерных sgРНК. В результате обнаружено, что РАМ-дистальная область на 5'-конце sgРНК, исключая 4-е положение, наиболее благоприятна для введения ФГ-модификаций. Кроме того, рассмотрено влияние ФГ-групп на специфичность системы CRISPR/Cas9, и проведено их сравнение с широко распространенными тиофосфатными и 2'-F модификациями. Показано, что ФГ-модифицированные химерные sgРНК по сравнению с известными аналогами до 40 раз увеличивают специфичность реакции расщепления ДНК-субстратов белком Cas9. Кроме того, система CRISPR/Cas9 с модифицированными химерными sgРНК, содержащие ФГ-группы, способны поддерживать Cas9-опосредованное редактирование генов в культивируемых клетках человека.

Таким образом, как модифицированные азотистые основания, так и ФГ-модификации в направляющих РНК являются перспективными альтернативами существующих химических модификаций для усовершенствования функционирования системы CRISPR/Cas9.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что комплексы белка Cas9 с направляющими РНК, tracrRNA и sgRNA, содержащими модифицированные нуклеотидные остатки m6A, Ψ, m5C и m1Ψ, и химерными crRNA, содержащими остатки дезоксирибонуклеотидов с фосфорилгуанидиновыми группами, расщепляют ДНК-субстраты *in vitro* с эффективностью, достигающей 95%. Наиболее критичными областями включения модификаций m6A, Ψ, m5C и m1Ψ в sgRNA является РАМ-проксимальная область спейсера, а при включении ФГ-групп в химерные crRNA – четвертое положение с 5'-конца химерной crRNA.
2. Установлено, что включение Ψ, m5C, m6A и m1Ψ в sgRNA максимально повышает специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro* соответственно в 4, 14, 15 и 35 раз по сравнению с немодифицированным вариантом sgRNA; в то же время включение модификаций в tracrRNA не изменяет специфичности реакции.
3. Показано, что включение как единичных, так и нескольких ФГ-групп в РАМ-дистальный район химерных crRNA увеличивает точность расщепления ДНК-субстратов белком Cas9 *in vitro* в 5–40 раз по сравнению с немодифицированной crRNA и crRNA, содержащими тиофосфатные и 2'-F модификации, в зависимости от положения мисматча.
4. Продемонстрирована принципиальная возможность использования системы CRISPR/Cas9 с направляющими sgRNA, содержащими m6A, Ψ, m5C и m1Ψ, а также ФГ-модифицированными химерными crRNA, для редактирования генов в культивируемых клетках человека.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering // Trends Biotechnol. – 2013. – Vol. 31. – N 7. – P. 397.
2. Richter H., Randau L., Plagens A. Exploiting CRISPR/Cas: Interference Mechanisms and Applications // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – V. 14. – N 7. – P. 14518.
3. Tang Y., Fu Y. Class 2 CRISPR/Cas: an expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing // Cell Biosci. – 2018. – V. 8. N 1. P. 1–13.
4. McCarty N.S., Graham A.E., Studená L., Ledesma-Amaro R. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation // Nat. Commun. 2020 111. Nature Publishing Group, 2020. V. 11. – N 1. P. 1–13.
5. Modell A.E., Lim D., Nguyen T.M., Sreekanth V., Choudhary A. CRISPR-based therapeutics: current challenges and future applications // Trends Pharmacol. Sci. – 2022. – V. 43. – N 2. – P. 151–161.
6. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakamura A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product // J. Bacteriol. – 1987. – V. 169. – N 12. – P. 5429–5433.
7. Mojica F.J.M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // J. Mol. Evol. – 2005. – V. 60. – N 2. – P. 174–182.
8. Jiang F., Doudna J.A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms // Annual Review of Biophysics. – 2017. – V. 46. – P. 505–529.
9. Wright A. V., Nuñez J.K., Doudna J.A. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering // Cell. – 2016. – V. 164 – P. 29–44.
10. Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Wolf Y.I., Yakunin A.F., et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems // Nature Reviews Microbiology. – 2011. – V. 9. – N 6. – P. 467–477.

11. Pinilla-Redondo R., Mayo-Muñoz D., Russel J., Garrett R.A., Randau L., Sørensen S.J., Shah S.A. Type IV CRISPR–Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – V. 48. – N 4. – P. 2000–2012.
12. Koonin E. V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2017. – V. 37. – P. 67–78.
13. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science.* – 2013. – V. 339. – N 6121. – P. 819–823.
14. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9 // *Science.* – 2013. – V. 339. – N 6121. – P. 823–826.
15. Garneau J.E., Dupuis M.È., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadán A.H., Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA // *Nature.* – 2010. – V. 468. – N 7320. – P. 67–71.
16. Saprunauskas R., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – N 21. – P. 9275–9282.
17. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III // *Nature.* – 2011. – V. 471. – N 7340. – P. 602–607.
18. Mojica F.J.M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system // *Microbiology.* – 2009. – V. 155. – N 3. – P. 733–740.
19. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA // *Cell.* – 2014. – V. 156. – N 5. – P. 935.
20. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science* – 2012. – V. 337. – N 6096. – P. 816–821.

21. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2012. – V. 109. – N 39. – P. E2579–E2586.
22. Safari F., Zare K., Negahdaripour M., Barekati-Mowahed M., Ghasemi Y. CRISPR Cpf1 proteins: structure, function and implications for genome editing // *Cell Biosci.* – 2019. – V. 9. – N 1. – P. 1–21.
23. Chen J.S., Ma E., Harrington L.B., Da Costa M., Tian X., Palefsky J.M., Doudna J.A. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity // *Science.* – 2018. – V. 360. – N 6387. – P. 436–439.
24. Shmakov S., Abudayyeh O.O., Makarova K.S., Wolf Y.I., Gootenberg J.S., Semenova E., Minakhin L., Joung J., Konermann S., Severinov K., et al. Discovery and functional characterization of diverse Class 2 CRISPR-Cas systems // *Mol. Cell.* – 2015. – V. 60. – N 3. – P. 385.
25. Strecker J., Jones S., Koopal B., Schmid-Burgk J., Zetsche B., Gao L., Makarova K.S., Koonin E. V., Zhang F. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10. – N 1. – P. 1–8.
26. Teng F., Cui T., Feng G., Guo L., Xu K., Gao Q., Li T., Li J., Zhou Q., Li W. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering // *Cell Discov.* – 2018. – V. 4. – N 1. – P. 1–15.
27. Kim D., Kim J., Hur J.K., Been K.W., Yoon S.H., Kim J.S. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells // *Nat. Biotechnol.* – 2016. – V. 34. – N 8. – P. 863–868.
28. Paul B., Montoya G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications // *Biomed. J.* – 2020. – V. 43. – N 1. – P. 8.
29. Anantharaman V., Makarova K.S., Burroughs A.M., Koonin E. V., Aravind L. Comprehensive analysis of the HEPN superfamily: identification of novel roles in intra-genomic conflicts, defense, pathogenesis and RNA processing // *Biol. Direct.* – 2013. – V. 8. – N 1. – P. 1–28.
30. Grynberg M., Erlandsen H., Godzik A. HEPN: a common domain in bacterial drug resistance and human neurodegenerative proteins // *Trends Biochem. Sci.* – 2003. – V. 28.

- N 5. – P. 224–226.
31. Ahmadzadeh V., Farajnia S., Baghban R., Rahbarnia L., Zarredar H. CRISPR-Cas system: Toward a more efficient technology for genome editing and beyond // *J. Cell. Biochem.* – 2019. – V. 120. – N 10. – P. 16379–16392.
 32. 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., et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector // *Science.* – 2016. – V. 353. – N 6299. – P. aaf5573.
 33. East-Seletsky A., O’Connell M.R., Burstein D., Knott G.J., Doudna J.A. RNA Targeting by Functionally Orthogonal Type VI-A CRISPR-Cas Enzymes // *Mol. Cell.* – 2017. – V. 66. – N 3. – P. 373-383.e3.
 34. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., Joung J., Collins J.J., Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 // *Science.* – 2018. – V. 360. – N 6387. – P. 439.
 35. Granados-Riveron J.T., Aquino-Jarquín G., Malpeli G., Taguchi Y.-H. CRISPR/Cas13-Based Approaches for Ultrasensitive and Specific Detection of microRNAs // *Cells.* – 2021. – V. 10. – N 7. – P. 1655.
 36. Smargon A.A., Cox D.B.T., Pyzocha N.K., Zheng K., Slaymaker I.M., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.A., Essletzbichler P., Shmakov S., Makarova K.S., et al. Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28 // *Mol. Cell.* – 2017. – V. 65. – N 4. – P. 618-630.e7.
 37. Barrangou R., Gersbach C.A. Expanding the CRISPR Toolbox: Targeting RNA with Cas13b // *Mol. Cell.* – 2017. – V. 65. – N 4. – P. 582–584.
 38. Cox D.B.T., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Franklin B., Kellner M.J., Joung J., Zhang F. RNA editing with CRISPR-Cas13 // *Science* – 2017. – V. 358. – N 6366. – P. 1019–1027.
 39. Cui J., Techakriengkrai N., Nedumpun T., Suradhat S. Abrogation of PRRSV infectivity by CRISPR-Cas13b-mediated viral RNA cleavage in mammalian cells // *Sci. Reports.* – 2020. – V. 10. – N 1. – P. 1–13.

40. Zhang C., Konermann S., Brideau N.J., Lotfy P., Wu X., Novick S.J., Strutzenberg T., Griffin P.R., Hsu P.D., Lyumkis D. Structural Basis for the RNA-Guided Ribonuclease Activity of CRISPR-Cas13d // *Cell*. – 2018. – V. 175. – N 1. – P. 212-223.e17.
41. Konermann S., Lotfy P., Brideau N.J., Oki J., Shokhirev M.N., Hsu P.D. Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors // *Cell*. – 2018. – V. 173. – N 3. – P. 665-676.e14.
42. Xu C., Zhou Y., Xiao Q., He B., Geng G., Wang Z., Cao B., Dong X., Bai W., Wang Y., et al. Programmable RNA editing with compact CRISPR–Cas13 systems from uncultivated microbes // *Nat. Methods* – 2021. – V. 18. – N 5. – P. 499–506.
43. Vakulskas C.A., Dever D.P., Rettig G.R., Turk R., Jacobi A.M., Collingwood M.A., Bode N.M., McNeill M.S., Yan S., Camarena J., et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells // *Nat. Med.* – 2018. – V. 24. – N 8. – P. 1216–1224.
44. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity // *Science* – 2016. – V. 351. – N 6268. – P. 84–88.
45. Esvelt K.M., Mali P., Braff J.L., Moosburner M., Yaung S.J., Church G.M. Orthogonal Cas9 Proteins for RNA-Guided Gene Regulation and Editing // *Nat. Methods*. – 2013. – V. 10. – N 11. – P. 1116.
46. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // *Science*. – 2007. – V. 315. – N 5819. – P. 1709–1712.
47. 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., et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 // *Nature*. – 2015. – V. 520. – N 7546. – P. 186–191.
48. Kim H., Kim S.T., Ryu J., Kang B.C., Kim J.S., Kim S.G. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing // *Nat. Commun.* – 2017. – V. 8. – P. 14406.
49. Yamada M., Watanabe Y., Gootenberg J.S., Hirano H., Ran F.A., Nakane T., Ishitani R., Zhang F., Nishimasu H., Nureki O. Crystal Structure of the Minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* Reveals the Molecular Diversity in the CRISPR-Cas9 Systems //

- Mol. Cell. – 2017. – V. 65. – N 6. – P. 1109-1121.e3.
50. Acharya S., Ansari A.H., Kumar Das P., Hirano S., Aich M., Rauthan R., Mahato S., Maddileti S., Sarkar S., Kumar M., et al. PAM-flexible Engineered FnCas9 variants for robust and ultra-precise genome editing and diagnostics // Nat. Commun. – 2024. – V. 15. – N 1. – P. 1–23.
 51. Kumar M., Gulati S., Ansari A.H., Phutela R., Acharya S., Azhar M., Murthy J., Kathpalia P., Kanakan A., Maurya R., et al. FnCas9-based CRISPR diagnostic for rapid and accurate detection of major SARS-CoV-2 variants on a paper strip // Elife. – 2021. – V. 10. – P. e67130.
 52. 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., et al. EVved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity // Nature. – 2018. – V. 556. – N 7699. – P. 57–63.
 53. Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., Joung J.K. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects // Nature. – 2016. – V. 529. – N 7587. – P. 490–495.
 54. Chen J.S., Dagdas Y.S., Kleinstiver B.P., Welch M.M., Sousa A.A., Harrington L.B., Sternberg S.H., Joung J.K., Yildiz A., Doudna J.A. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy // Nature. – 2017. – V. 550. – N 7676. – P. 407–410.
 55. Casini A., Olivieri M., Petris G., Montagna C., Reginato G., Maule G., Lorenzin F., Prandi D., Romanel A., Demichelis F., et al. A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast // Nat. Biotechnol. – 2018. – V. 36. – N 3. – P. 265–271.
 56. Lee J.K., Jeong E., Lee J., Jung M., Shin E., Kim Y. hoon, Lee K., Jung I., Kim D., Kim S., et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity // Nat. Commun. – 2018. – V. 9. – N 1. – P. 1–10.
 57. Kim D., Bae S., Park J., Kim E., Kim S., Yu H.R., Hwang J., Kim J.-I., Kim J.-S. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells // Nat. Methods. – 2015. – V. 12. – N 3. – P. 237–243.
 58. Kulcsár P.I., Tálás A., Tóth E., Nyeste A., Ligeti Z., Welker Z., Welker E. Blackjack mutations improve the on-target activities of increased fidelity variants of SpCas9 with 5'G-extended sgRNAs // Nat. Commun. – 2020. – V. 11. – N 1. – P. 1–14.

59. Kim N., Kim H.K., Lee S., Seo J.H., Choi J.W., Park J., Min S., Yoon S., Cho S.R., Kim H.H. Prediction of the sequence-specific cleavage activity of Cas9 variants // *Nat. Biotechnol.* – 2020. – V. 38. – N 11. – P. 1328–1336.
60. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity // *Cell.* – 2013. – V. 154. – N 6. – P. 1380–1389.
61. Wang Q., Liu J., Janssen J.M., Le Bouteiller M., Frock R.L., Gonçalves M.A.F. V. Precise and broad scope genome editing based on high-specificity Cas9 nickases // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – V. 49. – N 2. – P. 1173–1198.
62. Kleinstiver B.P., Tsai S.Q., Prew M.S., Nguyen N.T., Welch M.M., Lopez J.M., McCaw Z.R., Aryee M.J., Joung J.K. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells // *Nat. Biotechnol.* – 2016. – V. 34. – N 8. – P. 869–874.
63. Kocak D.D., Josepha E.A., Bhandarkar V., Adkar S.S., Kwon J.B., Gersbach C.A. Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures // *Nat. Biotechnol.* – 2019. – V. 37. – N 6. – P. 657–666.
64. Kleinstiver B.P., Sousa A.A., Walton R.T., Tak Y.E., Hsu J.Y., Clement K., Welch M.M., Horng J.E., Malagon-Lopez J., Scarfò I., et al. Engineered CRISPR–Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing // *Nat. Biotechnol.* – 2019. – V. 37. – N 3. – P. 276–282.
65. Zhu D., Wang J., Yang D., Xi J., Li J. High-Throughput Profiling of Cas12a Orthologues and Engineered Variants for Enhanced Genome Editing Activity // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – N 24. – P. 13301.
66. Liu R.M., Liang L.L., Freed E., Chang H., Oh E., Liu Z.Y., Garst A., Eckert C.A., Gill R.T. Synthetic chimeric nucleases function for efficient genome editing // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10. – N 1. – P. 5524.
67. Zhou J., Chen P., Wang H., Liu H., Li Y., Zhang Y., Wu Y., Paek C., Sun Z., Lei J., et al. Cas12a variants designed for lower genome-wide off-target effect through stringent PAM recognition // *Mol. Ther.* – 2022. – V. 30. – N 1. – P. 244–255.
68. Zhao F., Zhang T., Sun X., Zhang X., Chen L., Wang H., Li J., Fan P., Lai L., Sui T., et al. A strategy for Cas13 miniaturization based on the structure and AlphaFold // *Nat.*

- Commun. – 2023. – V. 14. – N 1. – P. 1–13.
69. Tong H., Huang J., Xiao Q., He B., Dong X., Liu Y., Yang X., Han D., Wang Z., Wang X., et al. High-fidelity Cas13 variants for targeted RNA degradation with minimal collateral effects // *Nat. Biotechnol.* – 2022. – V. 41. – N 1. – P. 108–119.
 70. Choung S., Kim Y.J., Kim S., Park H.O., Choi Y.C. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – V. 342. – N 3. – P. 919–927.
 71. Fisher T.L., Terhorst T., Cao X., Wagner R.W. Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – V. 21. – N 16. – P. 3857–3865.
 72. Allerson C.R., Sioufi N., Jarres R., Prakash T.P., Naik N., Berdeja A., Wanders L., Griffey R.H., Swayze E.E., Bhat B. Fully 2'-modified oligonucleotide duplexes with improved in vitro potency and stability compared to unmodified small interfering RNA // *J. Med. Chem.* – 2005. – V. 48. – N 4. – P. 901–904.
 73. Robbins M., Judge A., Liang L., McClintock K., Yaworski E., MacLachlan I. 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists // *Mol. Ther.* – 2007. – V. 15. – N 9. – P. 1663–1669.
 74. Zhang Y., Wang Q., Wang J., Tang X. Chemical Modification and Transformation Strategies of Guide RNAs in CRISPR-Cas9 Gene Editing Systems // *ChemPlusChem.* – 2021. – V. 86. – N 4. – P. 587–600.
 75. Filippova J., Matveeva A., Zhuravlev E., Stepanov G. Guide RNA modification as a way to improve CRISPR/Cas9-based genome-editing systems // *Biochimie.* – 2019. – V. 167. – P. 49–60.
 76. Hendel A., Bak R.O., Clark J.T., Kennedy A.B., Ryan D.E., Roy S., Steinfeld I., Lunstad B.D., Kaiser R.J., Wilkens A.B., et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells // *Nat. Biotechnol.* – 2015. – V. 33. – N 9. – P. 985–989.
 77. Mir A., Alterman J.F., Hassler M.R., Debacker A.J., Hudgens E., Echeverria D., Brodsky M.H., Khvorova A., Watts J.K., Sontheimer E.J. Heavily and fully modified RNAs guide efficient SpyCas9-mediated genome editing // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – N 1. – P.

- 2641.
78. Yin H., Song C.Q., Suresh S., Wu Q., Walsh S., Rhym L.H., Mintzer E., Bolukbasi M.F., Zhu L.J., Kauffman K., et al. structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – V. 35. – N 12. – P. 1179–1187.
 79. Rahdar M., McMahon M.A., Prakash T.P., Swayze E.E., Bennett C.F., Cleveland D.W. Synthetic CRISPR RNA-Cas9-guided genome editing in human cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2015. – V. 112. – N 51. – P. E7110.
 80. O'Reilly D., Kartje Z.J., Ageely E.A., Malek-Adamian E., Habibian M., Schofield A., Barkau C.L., Rohilla K.J., Derossett L.B., Weigle A.T., et al. Extensive CRISPR RNA modification reveals chemical compatibility and structure-activity relationships for Cas9 biochemical activity // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47. – N 2. – P. 546–558.
 81. Cromwell C.R., Sung K., Park J., Krysler A.R., Jovel J., Kim S.K., Hubbard B.P. Incorporation of bridged nucleic acids into CRISPR RNAs improves Cas9 endonuclease specificity // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – N 1. – P. 1–11.
 82. Ryan D.E., Taussig D., Steinfeld I., Phadnis S.M., Lunstad B.D., Singh M., Vuong X., Okochi K.D., McCaffrey R., Olesiak M., et al. Improving CRISPR-Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – N 2. – P. 792–803.
 83. Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs // *Nat. Biotechnol.* – 2014. – V. 32. – N 3. – P. 279–284.
 84. Dagdas Y.S., Chen J.S., Sternberg S.H., Doudna J.A., Yildiz A. A conformational checkpoint between DNA binding and cleavage by CRISPR-Cas9 // *Sci. Adv.* – 2017. – V. 3. – N 8. – P. eaao0027.
 85. Kim D., Kim S., Kim S., Park J., Kim J.S. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq // *Genome Res.* – 2016. – V. 26. – N 3. – P. 406–415.
 86. Cho S.W., Kim S., Kim Y., Kweon J., Kim H.S., Bae S., Kim J.S. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases // *Genome Res.*

- 2014. – V. 24. – N 1. – P. 132.
87. He K., Chou E.T., Begay S., Anderson E.M., van Brabant Smith A. Conjugation and Evaluation of Triazole-Linked Single Guide RNA for CRISPR-Cas9 Gene Editing // *ChemBioChem*. – 2016. – V. 17. – N 19. – P. 1809–1812.
 88. Mu W., Zhang Y., Xue X., Liu L., Wei X., Wang H. 5' capped and 3' polyA-tailed sgRNAs enhance the efficiency of CRISPR-Cas9 system // *Protein Cell*. – 2019. – V. 10. – N 3. – P. 223–228.
 89. Burge S., Parkinson G.N., Hazel P., Todd A.K., Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – V. 34. – N 19. – P. 5402–5415.
 90. Nahar S., Sehgal P., Azhar M., Rai M., Singh A., Sivasubbu S., Chakraborty D., Maiti S. A G-quadruplex motif at the 3' end of sgRNAs improves CRISPR–Cas9 based genome editing efficiency // *Chem. Commun.* – 2018. – V. 54. – N 19. – P. 2377–2380.
 91. Palumbo C.M., Gutierrez-Bujari J.M., O'Geen H., Segal D.J., Beal P.A. Versatile 3' Functionalization of CRISPR Single Guide RNA // *ChemBioChem*. – 2020. – V. 21. – N 11. – P. 1633–1640.
 92. Basila M., Kelley M.L., Smith A.V.B. Minimal 2'-O-methyl phosphorothioate linkage modification pattern of synthetic guide RNAs for increased stability and efficient CRISPR-Cas9 gene editing avoiding cellular toxicity // *PLoS One*. – 2017. – V. 12. – N 11. – P. e0188593.
 93. Yin H., Song C.Q., Suresh S., Kwan S.Y., Wu Q., Walsh S., Ding J., Bogorad R.L., Zhu L.J., Wolfe S.A., et al. Partial DNA-guided Cas9 enables genome editing with reduced off-target activity // *Nat. Chem. Biol.* – 2018. – V. 14. – N 3. – P. 311.
 94. Rueda F.O., Bista M., Newton M.D., Goeppert A.U., Cuomo M.E., Gordon E., Kröner F., Read J.A., Wrigley J.D., Rueda D., et al. Mapping the sugar dependency for rational generation of a DNA-RNA hybrid-guided Cas9 endonuclease // *Nat. Commun.* – 2017. – V. 8. – N 1. – P. 1610.
 95. Kartje Z.J., Barkau C.L., Rohilla K.J., Ageely E.A., Gagnon K.T. Chimeric Guides Probe and Enhance Cas9 Biochemical Activity // *Biochemistry*. – 2018. – V. 57. – N 21. – P. 3027–3031.

96. Karvelis T., Gasiunas G., Miksys A., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus* // *RNA Biol.* – 2013. – V. 10. – N 5. – P. 841–851.
97. Scott T., Soemardy C., Morris K. V. Development of a Facile Approach for Generating Chemically Modified CRISPR/Cas9 RNA // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* – 2020. – V. 19. – P. 1176–1185.
98. Krysler A.R., Cromwell C.R., Tu T., Jovel J., Hubbard B.P. Guide RNAs containing universal bases enable Cas9/Cas12a recognition of polymorphic sequences // *Nat. Commun.* – 2022. – V. 13. – N 1. – P. 1–13.
99. Hoy A., Zheng Y.Y., Sheng J., Royzen M. Bio-orthogonal chemistry-based conjugation strategy facilitates investigation of impacts of s2U, s4U, m1A and m6A guide RNA modifications on CRISPR activity. // *Cris. J.* – 2022. – V. 5. – N 6. – P. 787–798.
100. Yang H., Ereemeeva E., Abramov M., Jacquemyn M., Groaz E., Daelemans D., Herdewijn P. CRISPR-Cas9 recognition of enzymatically synthesized base-modified nucleic acids // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – V. 51. – N 4. – P. 1501–1511.
101. Ageely E.A., Chilamkurthy R., Jana S., Abdullahu L., O'Reilly D., Jensik P.J., Damha M.J., Gagnon K.T. Gene editing with CRISPR-Cas12a guides possessing ribose-modified pseudoknot handles // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – N 1. – P. 1–15.
102. Yamano T., Nishimasu H., Zetsche B., Hirano H., Slaymaker I.M., Li Y., Fedorova I., Nakane T., Makarova K.S., Koonin E. V., et al. Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA // *Cell.* – 2016. – V. 165. – N 4. – P. 949–962.
103. Li B., Zhao W., Luo X., Zhang X., Li C., Zeng C., Dong Y. Engineering CRISPR-Cpf1 crRNAs and mRNAs to maximize genome editing efficiency // *Nat. Biomed. Eng.* – 2017. – V. 1. – N 5. – P. 0066.
104. Kim H., Lee W.J., Oh Y., Kang S.H., Hur J.K., Lee H., Song W.J., Lim K.S., Park Y.H., Song B.S., et al. Enhancement of target specificity of CRISPR-Cas12a by using a chimeric DNA-RNA guide // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – V. 48. – N 15. – P. 8601–8616.
105. Kim H., Lee W., Kim C.H., Oh Y., Gwon L.W., Lee H., Song W., Hur J.K., Lim K.-S., Jeong K.J., et al. Highly specific chimeric DNA-RNA-guided genome editing with

- enhanced CRISPR-Cas12a system // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* – 2022. – V. 28. – P. 353–362.
106. McMahon M.A., Prakash T.P., Cleveland D.W., Bennett C.F., Rahdar M. Chemically Modified Cpf1-CRISPR RNAs Mediate Efficient Genome Editing in Mammalian Cells // *Mol. Ther.* – 2018. – V. 26. – N 5. – P. 1228–1240.
 107. Bin Moon S., Lee J.M., Kang J.G., Lee N.E., Ha D.I., Kim D.Y., Kim S.H., Yoo K., Kim D., Ko J.H., et al. Highly efficient genome editing by CRISPR-Cpf1 using CRISPR RNA with a uridinylate-rich 3'-overhang // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – N 1. – P. 3651.
 108. Park H.M., Liu H., Wu J., Chong A., Mackley V., Fellmann C., Rao A., Jiang F., Chu H., Murthy N., et al. Extension of the crRNA enhances Cpf1 gene editing in vitro and in vivo // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – N 1. – P. 3313.
 109. Jedrzejczyk D., Dahl Poulsen Artisan Bio Marina Mohr L., Djodji Damas N., Barghetti Artisan Bio Roland Baumgartner Artisan Bio Brian Tate Weinert A., Warnecke Artisan Bio Ryan Gill T. CRISPR-Cas12a Nucleases Function With Structurally Engineered crRNAs: SynThetic trAcrRNA. // *Sci Rep.* – 2022. – V. 12. – N 1. – P. 12193.
 110. Méndez-Mancilla A., Wessels H.-H., Legut M., Kadina A., Mabuchi M., Walker J., Robb G.B., Holden K., Sanjana N.E. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas13 knockdown in human cells // *Cell Chem. Biol.* – 2022. – V. 29. – N 2. – P. 321–327.e4.
 111. Komissarov A., Sergeeva M., Zhuravlev E., Medvedev S., Malakhova A., Andreeva E., Shurygina A.P., Gorshkov A., Timofeeva M., Balakhonova E., et al. CRISPR-Cas9 mediated knockout of AnxA6 gene enhances influenza A virus replication in low-permissive HEK293FT cell line // *Gene.* – 2022. – V. 809. – P. 146024.
 112. Pavlova A.S., Yakovleva K.I., Epanchitseva A. V., Kupryushkin M.S., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D. V., Ryabchikova E.I., Dovydenko I.S. An Influence of Modification with Phosphoryl Guanidine Combined with a 2'-O-Methyl or 2'-Fluoro Group on the Small-Interfering-RNA Effect // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – N 18. – P. 9784.
 113. Stepanov G., Zhuravlev E., Shender V., Nushtaeva A., Balakhonova E., Mozhaeva E., Kasakin M., Koval V., Lomzov A., Pavlyukov M., et al. Nucleotide Modifications Decrease Innate Immune Response Induced by Synthetic Analogs of snRNAs and snoRNAs // *Genes* – 2018. – V. 9. – N 11. – P. 531.

114. Mokuda S., Watanabe H., Kohno H., Ishitoku M., Araki K., Hirata S., Sugiyama E. N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA enhances exogenous protein expression and suppresses immunogenicity in primary human fibroblast-like synoviocytes // *Cytotechnology*. – 2022. – V. 74. – N 4. – P. 503.
115. Cornely R., Rentero C., Enrich C., Grewal T., Gaus K. Annexin A6 is an organizer of membrane microdomains to regulate receptor localization and signalling // *IUBMB Life*. – 2011. – V. 63 – N 11. – P. 1009–1017.
116. Harrington L.B., Ma E., Chen J.S., Witte I.P., Gertz D., Paez-Espino D., Al-Shayeb B., Kyrpides N.C., Burstein D., Banfield J.F., et al. A scoutRNA Is Required for Some Type V CRISPR-Cas Systems // *Mol. Cell*. – 2020. – V. 79. – N 3. – P. 416-424.e5.
117. Liu L., Chen P., Wang M., Li X., Wang J., Yin M., Wang Y. C2c1-sgRNA Complex Structure Reveals RNA-Guided DNA Cleavage Mechanism // *Mol. Cell*. – 2017. – V. 65. – N 2. – P. 310–322.
118. Scott T., Urak R., Soemardy C., Morris K. V. Improved Cas9 activity by specific modifications of the tracrRNA // *Sci. Rep*. – 2019. – V. 9. – N 1. – P. 16104.
119. Tran B.T., Go S., Kim K.-R., Chung H.S., Ahn D.-R., Tran B.T., Go S., Kim K.-R., Chung H.S., Ahn D.-R. The positional and numerical effect of N6-methyladenosine in tracrRNA on the DNA cleavage activity of Cas9 // *RSCAd. Royal Society of Chemistry*, 2024. V. 14. – N 29. P. 20529–20535.
120. Dutta N., Deb I., Sarzynska J., Lahiri A. Predicting nearest neighbor free energies of modified RNA with LIE: results for pseudouridine and N1-methylpseudouridine within RNA duplexes. // *Phys Chem Chem Phys*. – 2024. – V. 26. – N 2. – P. 992–999.
121. Raper A.T., Stephenson A.A., Suo Z. Functional Insights Revealed by the Kinetic Mechanism of CRISPR/Cas9 // *J. Am. Chem. Soc*. – 2018. – V. 140. – N 8. – P. 2971–2984.
122. Davis D.R. Stabilization of RNA stacking by pseudouridine // *Nucleic Acids Res*. – 1995. – V. 23. – N 24. – P. 5020–5026.
123. Newby M.I., Greenbaum N.L. Investigation of Overhauser effects between pseudouridine and water protons in RNA helices // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. – 2002. – V. 99. – N 20. – P. 12697–12702.

124. Durbin A.F., Wang C., Marcotrigiano J., Gehrke L. RNAs containing modified nucleotides fail to trigger RIG-I conformational changes for innate immune signaling // *MBio*. – 2016. – V. 7. – N 5. – P. e00833-16.
125. Mitchell B.P., Hsu R. V., Medrano M.A., Zewde N.T., Narkhede Y.B., Palermo G. Spontaneous Embedding of DNA Mismatches Within the RNA:DNA Hybrid of CRISPR-Cas9 // *Front. Mol. Biosci*. – 2020. – V. 7. – P. 39.
126. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells // *Nat. Biotechnol*. – 2013. – V. 31. – N 9. – P. 822–826.
127. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases // *Nat. Biotechnol*. – 2013. – V. 31. – N 9. – P. 827–832.
128. Xu X., Duan D., Chen S.J. CRISPR-Cas9 cleavage efficiency correlates strongly with targetsgRNA folding stability: From physical mechanism to off-target assessment // *Sci. Rep*. – 2017. – V. 7. – N 1. – P. 143.
129. Bisaria N., Jarmoskaite I., Herschlag D. Lessons from Enzyme Kinetics Reveal Specificity Principles for RNA-guided nucleases in RNA Interference and CRISPR-based Genome Editing // *Cell Syst*. – 2017. – V. 4 – N 1. – P. 21.
130. Sioud M., Furset G., Cekaite L. Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate immune activation by 2'-modified RNAs // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2007. – V. 361. – N 1. – P. 122–126.
131. Andries O., Mc Cafferty S., De Smedt S.C., Weiss R., Sanders N.N., Kitada T. N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice // *J. Control. Release*. – 2015. – V. 217. – P. 337–344.
132. Roost C., Lynch S.R., Batista P.J., Qu K., Chang H.Y., Kool E.T. Structure and Thermodynamics of N6-Methyladenosine in RNA: A Spring-Loaded Base Modification // *J. Am. Chem. Soc*. – 2015. – V. 137. – N 5. – P. 2107.
133. Kierzek E., Kierzek R. The thermodynamic stability of RNA duplexes and hairpins containing N6-alkyladenosines and 2-methylthio-N6-alkyladenosines // *Nucleic Acids*

- Res. – 2003. – V. 31. – N 15. – P. 4472.
134. Vaidyanathan P.P., Alsadhan I., Merriman D.K., Al-Hashimi H.M., Herschlag D. Pseudouridine and N6-methyladenosine modifications weaken PUF protein/RNA interactions // RNA. – 2017. – V. 23. – N 5. – P. 611–618.
 135. Fleming A.M., Burrows C.J. Nanopore sequencing for N1-methylpseudouridine in RNA reveals sequence-dependent discrimination of the modified nucleotide triphosphate during transcription // Nucleic Acids Res. – 2023. – V. 51. – N 4. – P. 1914–1926.
 136. Kupryushkin M.S., Pyshnyi D. V., Stetsenko D.A. Phosphoryl Guanidines: A New Type of Nucleic Acid Analogues // Acta Naturae. – 2014. – V. 6. – N 4. – P. 116.
 137. Stetsenko D., Kupryushkin M., Pyshnyi D. Modified oligonucleotides and methods for their synthesis // WO2016028187. – 2016.
 138. Kupryushkin M.S., Filatov A. V., Mironova N.L., Patutina O.A., Chernikov I. V., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Pyshnyi D. V., Stetsenko D.A., Altman S., et al. Antisense oligonucleotide gapmers containing phosphoryl guanidine groups reverse MDR1-mediated multiple drug resistance of tumor cells // Mol. Ther. - Nucleic Acids. – 2022. – V. 27. – P. 211–226.
 139. Lomzov A.A., Kupryushkin M.S., Dyudeeva E.S., Pyshnyi D. V. A Comparative Study of the Hybridization of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides with DNA and RNA // Russ. J. Bioorganic Chem. – 2021. – V. 47. – N 2. – P. 461–468.
 140. Kuznetsov N.A., Kupryushkin M.S., Abramova T. V., Kuznetsova A.A., Miroshnikova A.D., Stetsenko D.A., Pyshnyi D. V., Fedorova O.S. New oligonucleotide derivatives as unreactive substrate analogues and potential inhibitors of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 // Mol. Biosyst. – 2015. – V. 12. – N 1. – P. 67–75.
 141. Lebedeva N.A., Anarbaev R.O., Kupryushkin M.S., Rechkunova N.I., Pyshnyi D. V., Stetsenko D.A., Lavrik O.I. Design of a New Fluorescent Oligonucleotide-Based Assay for a Highly Specific Real-Time Detection of Apurinic/Apyrimidinic Site Cleavage by Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 // Bioconjug. Chem. – 2015. – V. 26. – N 10. – P. 2046–2053.
 142. Levina A., Repkova M., Kupryushkin M., Seryapina A., Shevelev O., Pyshnyi D., Zarytova V., Markel A. In vivo hypotensive effect of aminosilanol-based nanocomposites

- bearing antisense oligonucleotides // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2022. – V. 75. – P. 103612.
143. Kandasamy P., McClorey G., Shimizu M., Kothari N., Alam R., Iwamoto N., Kumarasamy J., Bommineni G.R., Bezigian A., Chivatakarn O., et al. Control of backbone chemistry and chirality boost oligonucleotide splice switching activity // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – V. 50. – N 10. – P. 5443–5466.
 144. Kandasamy P., Liu Y., Aduda V., Akare S., Alam R., Andreucci A., Boulay D., Bowman K., Byrne M., Cannon M., et al. Impact of guanidine-containing backbone linkages on stereopure antisense oligonucleotides in the CNS // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – V. 50. – N 10. – P. 5401–5423.
 145. Monian P., Shivalila C., Lu G., Shimizu M., Boulay D., Bussow K., Byrne M., Bezigian A., Chatterjee A., Chew D., et al. Endogenous ADAR-mediated RNA editing in non-human primates using stereopure chemically modified oligonucleotides // *Nat. Biotechnol.* – 2022. – V. 40. – N 7. – P. 1093–1102.
 146. Jacobi A.M., Rettig G.R., Turk R., Collingwood M.A., Zeiner S.A., Quadros R.M., Harms D.W., Bonthuis P.J., Gregg C., Ohtsuka M., et al. Simplified CRISPR tools for efficient genome editing and streamlined protocols for their delivery into mammalian cells and mouse zygotes // *Methods.* – 2017. – V. 121–122. – P. 16.
 147. Donohoue P.D., Pacesa M., Lau E., Vidal B., Irby M.J., Nyer D.B., Rotstein T., Banh L., Toh M.S., Gibson J., et al. Conformational control of Cas9 by CRISPR hybrid RNA-DNA guides mitigates off-target activity in T cells // *Mol. Cell.* – 2021. – V. 81. – N 17. – P. 3637-3649.e5.
 148. Bravo J.P.K., Liu M.-S., Hibshman G.N., Dangerfield T.L., Jung K., McCool R.S., Johnson K.A., Taylor D.W. Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR–Cas9 // *Nature* – 2022. – V. 603 – P. 343–347.
 149. Klein M., Eslami-Mossallam B., Arroyo D.G., Depken M. Hybridization Kinetics Explains CRISPR-Cas Off-Targeting Rules // *Cell Rep.* – 2018. – V. 22. – N 6. – P. 1413–1423.

Карты плазмид, использованных в работе

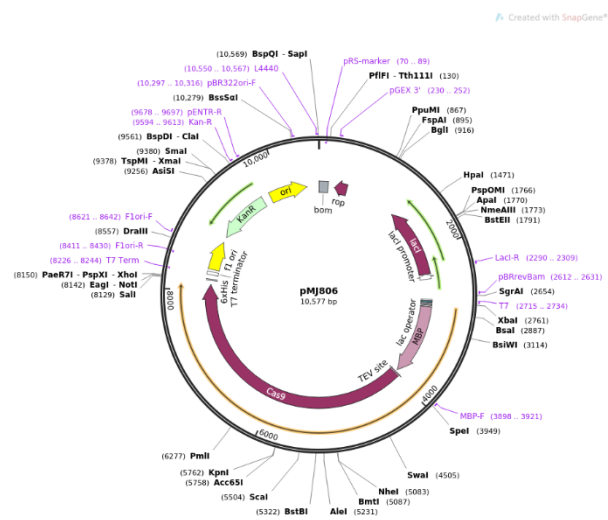


Рисунок А1. Карта плазмиды pMJ806.

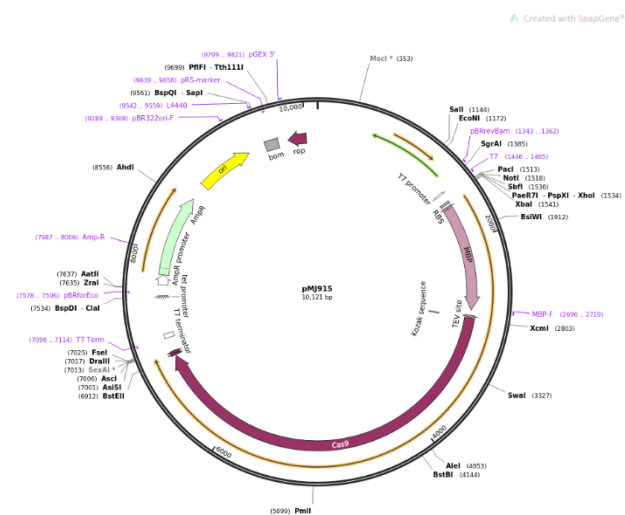


Рисунок А2. Карта плазмиды рМJ915.



Рисунок А3. Карта плазмиды РХ458.

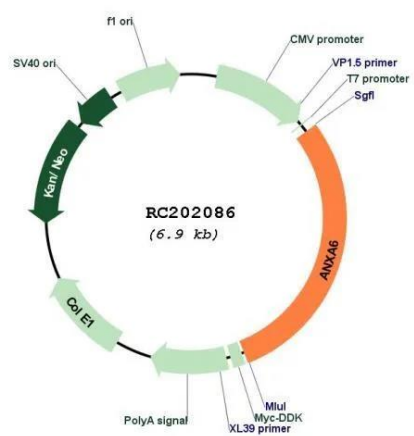


Рисунок А4. Карта плазмиды рАНХА6.

Приложение Б

Список протоспейсеров ДНК-субстратов с мисматчами для определения специфичности системы CRISPR/Cas9. Мисматчи в ДНК-дуплеках подчеркнуты.

Название: S- одиночный мисматч, D-двойной мисматч	Последовательность 5'–3', Протоспейсер № 1, спейсерная область
WT	GAATGTCGAGCATGTCCAAC
S1	<u>C</u> AATGTCGAGCATGTCCAAC
S2	G <u>T</u> ATGTCGAGCATGTCCAAC
S3	GA <u>T</u> TGTCGAGCATGTCCAAC
S4	GAA <u>A</u> GTCGAGCATGTCCAAC
S5	GAAT <u>C</u> TCGAGCATGTCCAAC
S6	GAATG <u>A</u> CGAGCATGTCCAAC
S7	GAATGT <u>G</u> GAGCATGTCCAAC
S8	GAATGTCC <u>A</u> GCATGTCCAAC
S9	GAATGTCTG <u>T</u> GCATGTCCAAC
S10	GAATGTCTGAC <u>C</u> ATGTCCAAC
D9,10	GAATGTCTG <u>TCC</u> ATGTCCAAC
D11,12	GAATGTCTGAGG <u>TT</u> GTCCAAC
D13,14	GAATGTCTGAGCA <u>ACT</u> CCAAC
D15,16	GAATGTCTGAGCATG <u>AGC</u> AAC
D17,18	GAATGTCTGAGCATGTCTG <u>TAC</u>
D19,20	GAATGTCTGAGCATGTCCAT <u>G</u>

Приложение В

Последовательность протяженного линейного ДНК-дуплекса длиной 531 н.

5'- TTGTGTCTTCGTCAGTCCCGAGTCCCTTCATGGCTTTCCGCAGCGCTTTGGCATC
TGGCTCAGGGTTGAAGTCATTGGCTGGGCGCACAGTTCCCTTCAGCTCTACTCGGGCCACT
GCACTAAGTTCCCACATCTGATAGGCCACCTGCGCTGCCTCCGGGAAGAACTGGCCAGCA
GCATCATCATCTCCCCCAGACAGCTTCAGCAGAGTCTTCTTGTACTCGCCAGAGGTGTCAT
TCTTGATCATGCTGTAGAGGGACTTCTCATACTTGGTCCGGAAGATCTCCCGAATGTCGAG
CATGTCCAACCTCACTACGGGAGACCATGATGCGGATCAGGGTGTTGTCCCGAGTCCCCAG
GCCCTTCATAGCCTTGAAGAGCCTTTCAGCAAAATATTCCGGGGTGCTCCGGATACACTTC
ACTACGGCCAGCATTAGCTTCTCAAAGTCCCCAGACAGCTCCCCTCGGATGCTGGCTTCA
ATCGGCTTCCCTGTGGTCTTCAGATACTCATCGAACACCAACCGAAGATGC – 3'- целевая
цепь

5'-
GCATCTTCGGTTGGTGTTCGATGAGTATCTGAAGACCACAGGGAAGCCGATTGAAGCCAG
CATCCGAGGGGAGCTGTCTGGGGACTTTGAGAAGCTAATGCTGGCCGTAGTGAAGTGTAT
CCGGAGCACCCCGGAATATTTTGCTGAAAGGCTCTTCAAGGCTATGAAGGGCCTGGGGAC
TCGGGACAACACCCTGATCCGCATCATGGTCTCCCGTAGTGAGTTGGACATGCTCGACAT
TCGGGAGATCTTCCGGACCAAGTATGAGAAGTCCCTCTACAGCATGATCAAGAATGACAC
CTCTGGCGAGTACAAGAAGACTCTGCTGAAGCTGTCTGGGGGAGATGATGATGCTGCTGG
CCAGTTCTTCCCGGAGGCAGCGCAGGTGGCCTATCAGATGTGGGAACTTAGTGCAGTGGC
CCGAGTAGAGCTGAAGGGAAGTGTGCGCCAGCCAATGACTTCAACCCTGACGCAGATGC
CAAAGCGCTGCGGAAAGCCATGAAGGGACTCGGGACTGACGAAGACACAA-3'- нецелевая
цепь

Приложение Г

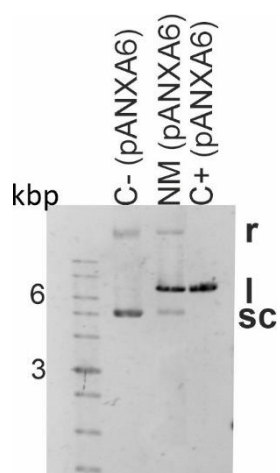


Рисунок Г1. Положительный контроль плазмиды pANXA6 при анализе эффективности расщепления *in vitro*. C- – обозначена плазида pANXA6 без добавления белка Cas9 (отрицательный контроль), NM – расщепление плазмиды комплексом белка Cas9 с немодифицированной направляющей РНК, C+ – положительный контроль, полученный в результате расщепления плазмиды ферментом рестрикции MluI.

Приложение Д

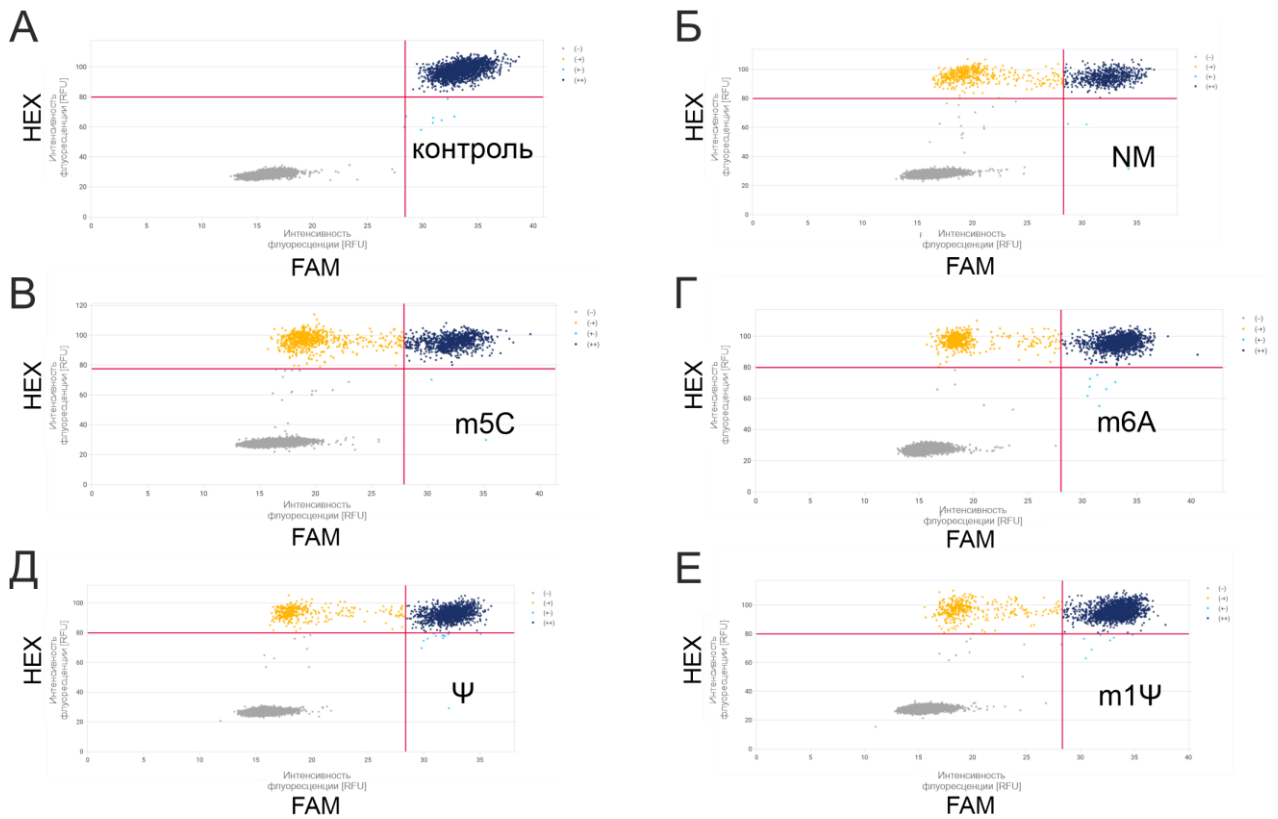


Рисунок Д1. Двумерные графики результатов цифровой ПЦР для модифицированных sgРНК. Результаты представлены для контрольных клеток HEK293Т/17 (А), для немодифицированной контрольной РНК NM (Б) и для sgРНК, содержащих остатки: m5C (В) и 50% m6A (Г), 50% Ψ (Д) и 50% m1Ψ (Е). По оси Y отложена интенсивность флуоресценции для канала HEX (контрольный зонд), а по оси X - интенсивность флуоресценции для канала FAM (зонд, специфичный для сайта мутации).

Приложение Е

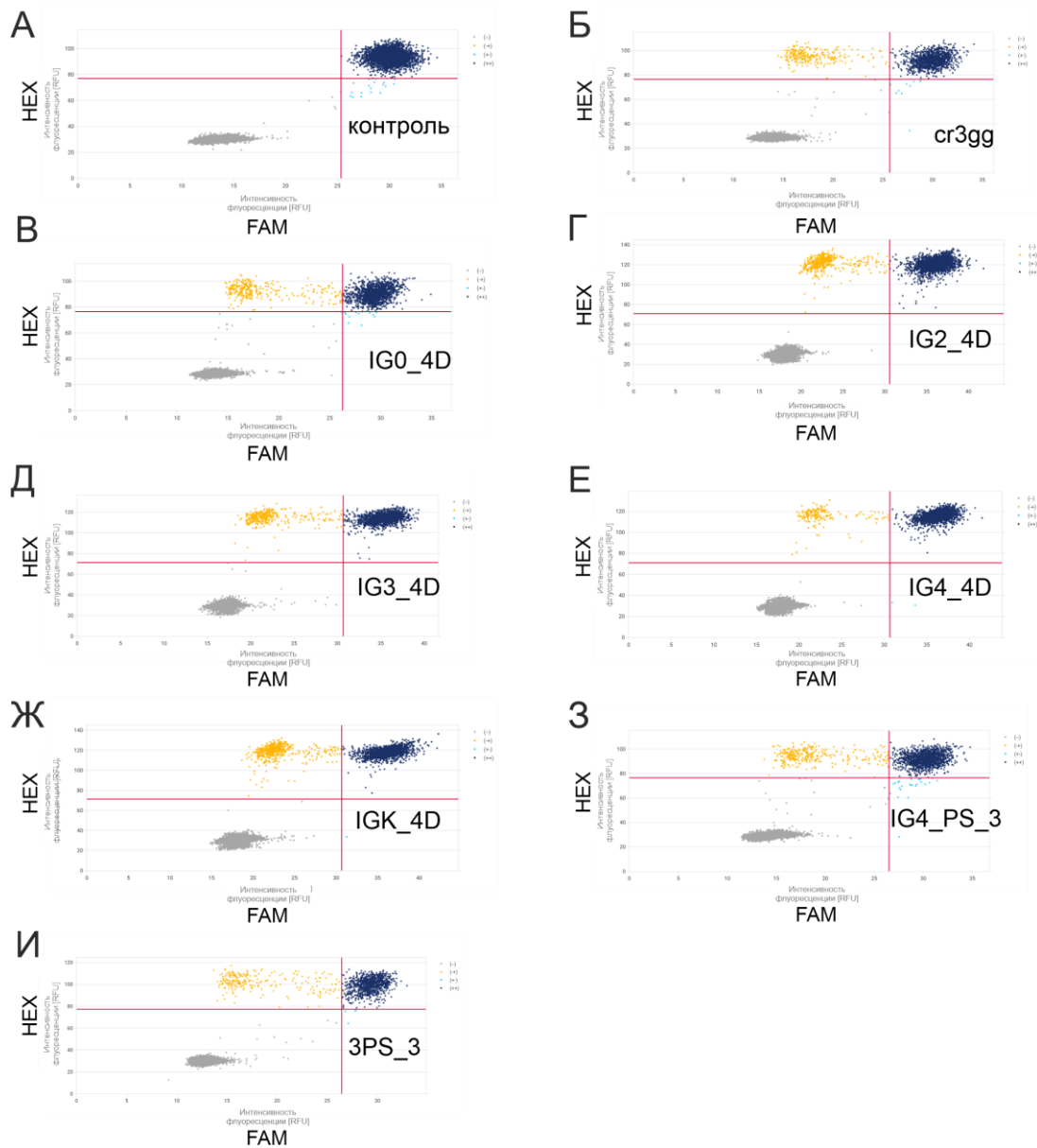


Рисунок Е1. Двумерные графики результатов цифровой ПЦР для модифицированных sgРНК. Результаты представлены для контрольных клеток НЕК293Т/17 (А), для немодифицированной контрольной РНК cr3gg (Б) и немодифицированной химерной РНК IG0_4D (В) и для sgРНК, содержащих: либо одну ФГ-группу в положении 2 (IG2_4D, Г), 3 (IG3_4D, Д) и 4 (IG4_4D, Е), либо две ФГ-группы (IGK_4D, Ж) а также либо одну PS группу (IG4_PS_3, З) либо три PS модификации (3PS_3, И). По оси Y отложена интенсивность флуоресценции для канала HEX (контрольный зонд), а по оси X - интенсивность флуоресценции для канала FAM (зонд, специфичный для сайта мутации).