

Правительство Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

Индекс УДК 606:577.15-027.22

Рег. № НИОКТР АААА-А20-120081990107-2

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
СПбГУ

С.В. Микушев
«19» *декабря* 2022 г.



ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ CRISPR-CAS9 НУКЛЕАЗ
(заключительный)

Руководитель НИР,
профессор,
доктор биологических наук

K Severinov


К.В. Северинов

подпись, дата 24.11.2022

Санкт-Петербург 2022

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы,
Доктор Биологических наук


(подпись)

Северинов Константин
Викторович
(руководство, планирование
экспериментов)

Исполнители:
Младший научный сотрудник


(подпись)

Ширяева Анна Александровна
(Биоинформатический анализ
данных)

Лаборант-исследователь


(подпись)

Абрамова Марина Викторовна
(Клонирование генетических
конструкций, несущих CRISPR-
CasY системы, проверка
активности в клетках человека)

Лаборант-исследователь


(подпись)

Казалов Максим Алексеевич
(Исследование активности
CRISPR-Cas систем с помощью
экспериментов *in vitro*)

Лаборант-исследователь


(подпись)

Климко Валерий Викторович
(Получение рекомбинатных CasY
белков)

Лаборант-исследователь


(подпись)

Щеглова Наталья Вадимовна
(Создание мутантных версий
CasY)

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	4
СПИСОК РИСУНКОВ	6
СПИСОК ТАБЛИЦ	7
1. ВВЕДЕНИЕ	8
2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	9
2.1. Оптимизация условий выделения рекомбинантной нуклеазы CasY2.	9
2.2. Создание плазмиды, несущей ген CasY1 и последовательности направляющих РНК для экспрессии в клетках человека.	10
2.3. Проверка внутриклеточного синтеза нуклеазы CasY1 в клетках человека.	11
2.4. Проверка нуклеазной активности CasY1 в клетках человека.	13
2.5. Получение каталитически неактивных форм эффектора CasY1.	14
2.6. Проверка наличия нуклеазной активности белков dCasY D827A и dCasY E913A.	16
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	19
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	20

РЕФЕРАТ

Отчет: 19 страниц, 11 рисунков, 2 таблицы, 4 процитированных источника.

Ключевые слова: CRISPR-Cas, CasY, CasY1, нуклеаза, каталитически неактивные мутанты CasY, dCasY D827A и dCasY E913A

В настоящем отчете представлены результаты работ, направленные на характеризацию CRISPR-CasY систем и использование их в биотехнологии.

Для проверки работы нуклеазы CasY1 в клетках человека были созданы генетические конструкции, несущие ген CasY1 нуклеазы для его экспрессии в клетках человека, а также синтеза в них направляющих РНК. Показано, что эффекторный белок CasY1 эффективно синтезируется в клетках НЕК293Т. Несмотря на это, CasY1 оказалась не активна в разрезании геномной ДНК в культуре клеток человека.

Для создания формы CasY1 нуклеазы, специфически узнающей ДНК-мишени, не вносящей двунитивые разрывы в ДНК был произведен анализ аминокислотной последовательности нуклеазы CasY1. В результате были предсказаны мутации в предположительном нуклеазном центре белка для создания каталитически неактивных мутантов CasY1. Далее были заклонированы генетические конструкции кодирующие CasY1 с мутациями в предсказанных положениях. Используя эти плазмиды, были получены рекомбинантные мутантные формы CasY1. Полученные эффекторы были проверены на способность связываться с целевой ДНК, а также на наличие нуклеазной активности. В результате, удалось показать, что белки с мутациями CasY1 D827A и CasY E913A действительно, могут связываться с специфическими сайтами ДНК, но не вносят в них двунитивые разрывы. Такие системы могут быть использованы в будущем для регуляции экспрессии генов в рамках биотехнологических и медицинских задач.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие термины и сокращения с соответствующими определениями:

Cas – CRISPR associated nucleases, CRISPR-ассоциированные нуклеазы

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

NLS - Nuclear Localization Signal

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's Medium

ПААГ – полиакриламидный гель

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК - рибонуклеиновая кислота

bp – base pairs, пары нуклеотидов

kDa - кило Дальтоны

a.a. – amino acids, аминокислоты

п.н. – пары нуклеотидов

HEPES - (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота)

LB - среда Luria-Bertani.

СПИСОК РИСУНКОВ

Рис.1. Хроматограмма гель-фильтрационной очистки нового кодон оптимизированного белка CasY2 стр. 9

Рис.2. Схема плазмиды U6 scoutRNA CMV CasY1 GFP, используемой для проверки активности нуклеазы CasY1 в клетках человека, стр. 10

Рис.3. Электрофореграмма Рестрикция плазмиды U6 scoutRNA CMV CasY1 GFP, стр.10

Рис.4. Проверка эффективности синтеза нуклеазы CasY1 в клетках человека НЕК293Т с помощью Вестерн Блот анализа, стр. 12

Рис.5. Хроматограмма гель-фильтрационной очистки белка dCasY D827A, стр. 14

Рис.6. Хроматограмма гель-фильтрационной очистки белка dCasY E913A, стр. 14

Рис.7. Мономерные фракции белков CasY1, dCasY D827A, dCasY E913A. ПААГ, 10%, денатурирующие условия, окраска Кумасси стр. 15

Рис. 8. Электрофореграмма, демонстрирующая связывание эффекторного комплекса, состоящего из мутантного белка dCasY D827A и направляющей РНК, с ДНК-мишенью, стр. 16

Рис.9. Электрофореграмма, демонстрирующая, связывание эффекторного комплекса, состоящего из мутантного белка dCasY E913A и направляющей РНК, с ДНК-мишенью, стр.17

Рис.10. Электрофореграмма, иллюстрирующая нуклеазную активность белка CasY1 дикого типа (wt, wild type) и мутантных белков dCasY D827A и dCasY E913A при инкубации в различных соотношениях с ДНК мишенью (1:1, 1:3 и 1:10) стр. 18

Рис.11. Денатурирующий гель, иллюстрирующий нуклеазную активность белка CasY1 дикого типа и мутантных белков dCasY D827A и dCasY E913A при инкубации в различных соотношениях с ДНК мишенью (1:1, 1:3 и 1:10). Полиакриламидный гель-электрофорез в денатурирующих условиях, стр. 19

СПИСОК ТАБЛИЦ

Таблица 1. Условия проведения in vitro реакций для характеристики связывающей активности рибонуклеиновых комплексов dCasY D827A / dCasY E913A, стр. 16

Таблица 2. Условия проведения in vitro реакций для характеристики нуклеазной активности рибонуклеиновых комплексов dCasY D827A / dCasY E913A, стр. 17

1. ВВЕДЕНИЕ

CRISPR-Cas системы обеспечивают защиту бактерии и архей от чужеродных генетических элементов таких как вирусы, плазмиды и транспозоны. Особенностью этих защитных систем является способность внесения направленного разрыва в геном генетического мобильного элемента. Защитный ответ, в случае CRISPR – Cas систем II класса, осуществляется за счет нуклеазы-эффектора и направляющей РНК, образующих рибонуклеопротеиновый комплекс, который специфически узнает сайты в чужеродном геноме и разрезает его. Способность направлять CRISPR – Cas системы на конкретные участки генома привели к использованию Cas нуклеаз в качестве инструмента генетического редактирования. (Cong et al., 2013) Характеризация новых систем позволяет найти новые белки нуклеазы, позволяющие создавать средства редактирования геномов и решать различные биоинженерные задачи.

CRISPR- CasY системы принадлежат ко второму классу CRISPR-Cas систем (тип V-D) и были открыты в процессе изучения метагеномных данных CPR (candidate phyla radiation) бактерий (Burstain et al, 2017) Эти бактерии часто некультивируемы и представляют более 15% из всего бактериального разнообразия. CPR бактерии характеризуются малым размером клетки, небольшими геномами и считается, что они обитают в других бактериях, используя для жизни метаболические пути клетки-хозяина. Системы CRISPR-Cas включает гены эффекторных белков Cas Y (~ 1200 аминокислот), белков Cas1, участвующих в пополнении CRISPR-кассеты новыми спейсерами, а также CRISPR-кассету. Последовательности спейсеров представляют необычно короткие участки ДНК длиной 17-19 пар нуклеотидов.

Одной из отличительных особенностей CRISPR-CasY систем является дополнительная скаутная РНК, необходимая для стабилизации рибонуклеопротеинового комплекса (Harrington et al, 2020; результаты наших предыдущих отчетов). Эта молекула отличается от трейсерной РНК, необходимой для формирования рибонуклеинового комплекса в системах CRISPR-Cas9.

В результате исследования метагеномов и биоинформатического поиска (Harrington et al, 2020) было выявлено несколько CasY систем различных бактерий. Большая часть из них остается неохарактеризованной, а также неясно, могут ли эти системы применяться для редактирования геномов.

Цель данной работы – характеризация CRISPR-CasY систем.

В рамках предыдущих этапов проекта был произведен биоинформатический анализ локусов CRISPR-CasY систем, были получен рекомбинантный белок CasY1 из Катанобактерий, определены последовательности направляющих крРНК и скаутных РНК для CRISPR-CasY1 системы, нуклеазная активность CRISPR-CasY1 системы воссоздана *in vitro*. Кроме того, подобраны малоразмерные формы направляющих РНК, обеспечивающие наиболее эффективное разрезание целевых ДНК эффекторным CasY1 белком. Была начата хараткеризация CRISPR-CasY2 системы из Вогелбактерий.

В 2022 году были проведены работы по проверке активности работы CasY1 в клетках HEK293T (линия клеток человека). Несмотря на то, что CasY1 нуклеаза эффективно синтезируется в клетках человека, белок не вносит двунитевые разрывы в геномной ДНК.

Мы использовали программу AlfaFold2 для моделирования структуры CasY1 нуклеазы. Благодаря моделированию и биоинформатическим подходам удалось определить положение активных центров CasY1 белка. В ходе работ 2022 года предсказанные позиции в последовательности CasY1 были мутированы и получены соответствующие мутантные формы CasY1. Результаты *in vitro* экспериментов показали, что полученные мутантные формы CasY1 могут связывать ДНК, но не вносят в нее двунитевые разрывы. Потенциально эти белки могут использоваться для создания системы репрессии генов.

2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Оптимизация условий выделения рекомбинантной нуклеазы CasY2.

В 2021 году мы начали изучение CRISPR-CasY2 системы из Вогелбактерий. Ген эффекторной нуклеазы CasY2 был заклонирован в плазмидный вектор для экспрессии в клетках *E. coli*. Работы по получению рекомбинантного белка CasY2 показали, что он выделяется из клеток-продуцентов в виде мономера, но в малом количестве. В 2022 году проводились работы по оптимизации условий получения белка.

Для повышения синтеза CasY2 в клетках продуцентах была создана новая плазида, где ген CasY2 был кодо-оптимизирован (pET21_CasY2_newCO_MBP). Плазида pET21_CasY2_newCO_MBP была трансформирована компетентные клетки Rosetta *E. coli*. Нарботка биомассы и очистка белка производилась на основе протоколов, разработанных для белка CasY1. А именно 5 мл ночной культуры добавлялось к 500 мл среды LB с добавлением ампициллина и индуцировалось 1мМ IPTG по достижении оптической плотности 0.5 отн ед. После 16 часов индукции клетки центрифугировали на 4000g для получения клеточного осадка, который в дальнейшем растворялся в лизирующем буфере (50 mM Hepes-HCl pH=7.5, 500 mM NaCl, 10% глицерин, 1 mM бета-меркаптоэтанол) с добавлением лизоцима и проходил ультразвуковую соникацию. После центрифугирования в течение 70 мин на скорости 16000g лизисный раствор фильтровался и наносился на колонку HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare) для проведения аффинной хроматографии. После необходимых промывок белок элюировался лизисным буфером с добавлением 300 mM имидазола. Далее собранные фракции концентрировались до 600 мкл с помощью фильтра (с понижением концентрации NaCl). Полученный белок инкубировали с TEV протеазой ночь при температуре 10°C для отрезания MBP тага. Для дальнейшей очистки белок наносили на колонку Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), уравновешенную буфером 50 mM Hepes-HCl pH=7.5, 500 mM NaCl, 1 mM DTT с добавлением 10% глицерина для проведения гельфильтрационной хроматографии. Результаты гель фильтрационной очистки CasY2 приведены на Рисунке 1.

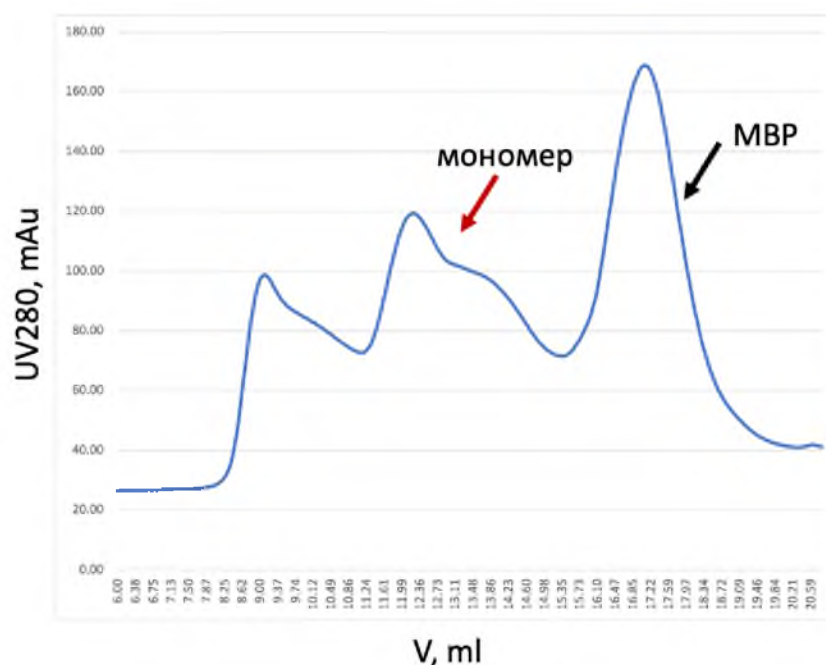


Рис.1. Хроматограмма гель-фильтрационной очистки белка CasY2. Красной стрелкой отмечен предполагаемый пик мономера.

В ходе дальнейших оптимизаций условий выделения не удалось получить большего количества выделяемого CasY2 в мономерной форме. Таким образом, хоть нам и удалось избавиться от агрегатных форм CasY2, получить CasY2 мономер в высокой концентрации оказалось невозможным. Результаты проверки ДНК разрезающей активности *in vitro* не выявили нуклеазной активности CasY2, причиной чего может являться низкая концентрация используемого в реакциях белка. Полученные данные говорят о невозможности производить дальнейшие исследования CasY2 *in vitro*.

2.2. Создание плазмиды, несущей ген CasY1 и последовательности направляющих РНК для экспрессии в клетках человека.

В результате предыдущих этапов работ мы показали, что CasY1 нуклеаза из Катанобактерий активна *in vitro* и поэтому, потенциально может быть использована для модификации генома эукариот. В 2022 году было решено проверить ее активность в клетках человека.

Для экспрессии компонентов системы CRISPR-CasY1 в клетках человека была создана плазмида, несущая ген CasY1 и последовательность, кодирующую направляющую РНК, под регуляцией эукариотических промоторов CMV и U6: *U6 scautRNA CMV CasY1 GFP* (Рис.2).



Рис.2. Схема плазмиды *U6 scautRNA CMV CasY1 GFP*, используемой для проверки активности нуклеазы *CasY1* в клетках человека.

Для экспрессии гена *CasY1* был использован цитомегаловирусный *CMV* промотор. Для повышения эффективности трансляции гена нуклеазы в эукариотах и предотвращения возможности появления бактериальных редких кодонов в кодирующей последовательности, ген *CasY1* был кодон-оптимизирован. На начало и конец гена нуклеазы поместили сигналы ядерной локализации (NLS, Nuclear Localization Signal, MAPKKRKRVGIHGVPAA с N-конца, KRPAATKKAGQAKKKK с C-конца). После NLS сигнала на C-конце гена нуклеазы был помещен HA-таг (Human influenza hemagglutinin tag) в трех повторах (YPYDVPDYA).

Для экспрессии направляющей РНК (*scautRNA*) был использован *U6* промотор с дополнительным *G* нуклеотидом на 3'-конце для повышения эффективности транскрипции. Для возможности дальнейшей вставки различных спейсерных последовательностей на 5'-конец консервативной последовательности *scautRNA*, после *U6* промотора были установлены два рестрикционных сайта *BsmBI*.

Для возможности проверки эффективности трансфекции созданного вектора в клетки человека и оценки эффективности продукции нуклеазы, после гена *CasY1* помещали последовательность, кодирующую зеленый флуоресцентный белок *GFP* через линкерный пептид *P2A*.

Последовательность полученной плазмиды была подтверждена посредством рестрикционного анализа (Рис.3) и секвенированием по Сэнгеру.

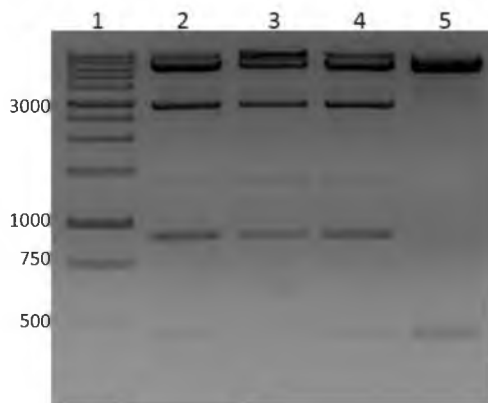


Рис.3. Рестрикция плазмиды *U6 scautRNA CMV CasY1 GFP*.

1 - маркер длин ДНК; 2-4 – рестрикция трёх клонов плазмиды *U6 scautRNA CMV CasY1 GFP* по сайтам *NdeI*, *EcoRI*. Предполагаемые размеры рестрицированных фрагментов: 6,5 kb; 2,9 kb; 906 bp; 449 bp; 111 bp.; 5 - плазмида, использованная в качестве отрицательного контроля.

2.3. Проверка внутриклеточного синтеза нуклеазы *CasY1* в клетках человека.

Плазмида *U6 scautRNA CMV CasY1 GFP* была трансфицирована в клетки человека линии HEK293T с целью проверки внутриклеточного синтеза исследуемой нуклеазы. В

качестве положительного контроля эксперимента одновременно была трансфицирована аналогичная плазида *U6 sgRNA CMV SpCas9 GFP*, несущая компоненты широко изучаемой CRISPR-SpCas9 системы.

Клетки HEK293T культивировали в среде Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) на 37°C с 5% содержанием CO₂. За сутки до трансфекции клетки рассеивали в 24-луночный планшет, трансфекция осуществлялась при помощи реагента Lipofectamin 2000. В каждую лунку добавляли смесь из 100 мкл Opti-MEM I Reduced Serum Media (OMEM), 1,5 мкл Lipofectamin 2000 и 500 нг трансфицируемой плазмиды. На второй день фиксировалось свечение GFP, что свидетельствовало о том, что плазмиды успешно попали в клетки и с них экспрессируются комплексы CasY1-P2A-GFP и SpCas9-P2A-GFP. Через 2,5 дня снимали клеточные лизаты для последующего Вестерн Блот (Western Blot) анализа, который позволил выяснить экспрессируется ли ген CasY1 в эукариотических клетках.

Для того, чтобы разделить белки из клеточного лизата по размерам, был проведен вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Затем пробы были перенесены с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану. Далее нитроцеллюлозная мембрана инкубировалась с первичными антителами, специфичными к HA-тагу, расположенному на С-конце CasY1. Использовались мышинные моноклональные антитела в разведении 1:1000. Далее мембрана инкубировалась со вторичными антителами, способными связываться с первичными антителами, а также с пероксидазой хрена, что позволяет усилить сигнал и визуализировать результаты Вестерн Блота. В качестве вторичных антител использовали анти-мышиный иммуноглобулин G (IgG) в разведении 1:20000. Далее в течение минуты инкубировали мембрану с ECL миксом из набора SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate. Сигнал детектировали с помощью ChemiDoc MP System (Bio-Rad) (Рис.4).

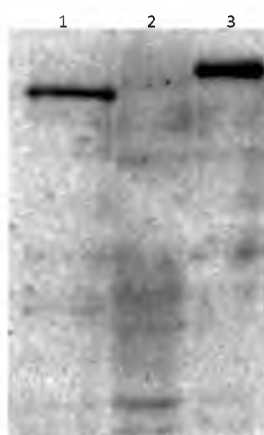


Рис.4. Проверка эффективности синтеза нуклеазы CasY1 в клетках человека HEK293T с помощью Вестерн Блот анализа. Обозначения: 1 – CasY1, 2 – отрицательный контроль, 3 – положительный контроль - SpCas9. Размеры белков: CasY1 – 138 кДа, SpCas9– 165 кДа. Отрицательный контроль: клетки HEK293T, не подвергшиеся трансфекции.

Данные Вестерн Блот (Рис.4) демонстрируют, что нуклеаза CasY1 эффективно синтезируется в клетках человека. Также наблюдается высокий уровень экспрессии

нуклеазы SpCas9, используемой в качестве положительного контроля, что говорит о том, что эксперимент прошел успешно. В отрицательном контроле нет полосы соответствующих размеров. Ген CasY1 экспрессируется с чуть меньшей эффективностью по сравнению с геном SpCas9, однако в количестве достаточном для обеспечения нуклеазной активности.

2.4. Проверка нуклеазной активности CasY1 в клетках человека.

Поскольку CasY1 нуклеаза на достаточном уровне синтезируется в эукариотических клетках, следующим шагом была проверка нуклеазной активности CRISPR-CasY1 системы в клетках человека, то есть проверка того, способен ли эффектор в комплексе с направляющей РНК вносить направленные двухцепочечные разрывы в геноме.

Для этого на основе плазмиды *U6 scoutRNA CMV CasY1 GFP* был создан ряд новых плазмид. В них со стороны 5'-конца последовательности, кодирующей scoutRNA, были интегрированы ДНК последовательности, комплементарные выбранным мишеням в геноме человека (спейсерные последовательности). Три таких мишени были подобраны на участке гена человека *grin2b*. Ранее данные мишени были проверены в экспериментах *in vitro*: они эффективно узнаются и разрезаются нуклеазой CasY1.

Создание плазмид осуществлялось посредством метода Golden Gate cloning. Данный метод основан на последовательной повторяющейся работе эндонуклеазы рестрикции типа IIS, в данном случае рестриктазы *BsmBI*, и лигазы T4 фага. Проверка нуклеотидной последовательности плазмид осуществлялась секвенированием по Сэнгеру.

Полученные плазмиды трансфицировали в клетки HEK293T при помощи реагента Lipofectamin 2000. Через два дня наблюдали свечение GFP, что говорило о том, что гены нуклеаз успешно экспрессируются в клетках. На третий день получены клеточные лизаты и проведение с ними реакции с T7 эндонуклеазой I для проверки нуклеазной активности CasY1.

Принцип T7 эндонуклеазной реакции заключается в том, что предварительно амплифицированные с геномом популяции трансфицированных клеток фрагменты ДНК, содержащие инделы (вставки или делеции нуклеотидов), сначала нагревают до температуры плавления, чтобы между цепочками ДНК разорвались водородные связи, а затем остужают, чтобы они снова отождились друг на друга. В результате чего образуются фрагменты ДНК, у которых на месте индела не совпадает нуклеотидная последовательность, появляются «пузыри». T7 эндонуклеаза способна находить такие участки-«пузыри» и вносить в них двунитевые разрывы. Далее пробы наносят на 1,5% агарозный гель и с помощью электрофореза разделяют фрагменты ДНК.

После проведения T7 реакции, не было обнаружено специфичных фрагментов разрезания ДНК, выделенных из клеток, трансфицированных плазмидами, несущими CRISPR-CasY1 систему. Полученные данные можно интерпретировать с разных позиций: возможно CasY1 нуклеаза не вносит двунитевые разрывы в геноме эукариот, либо вносит, но с

низкой эффективностью, поэтому детектировать их с помощью использованного подхода невозможно.

По результатам данного этапа работ было решено сфокусироваться на исследовании других возможных практических приложений CRISPR-Cas, а именно на создании системы репрессии генов на основе каталитически неактивных мутантов CasY1.

2.5. Получение каталитически неактивных форм эффектора CasY1.

Для получения каталитически неактивных форм эффектора CasY1 был проведен анализ его аминокислотной последовательности для выявления возможных функциональных доменов. Используя данные о каталитически неактивных мутантах для CRISPR-Cas12a (Liu, Jun-Jie et al. (2019)) были предложены замены в аминокислотной последовательности CasY1 в позициях D827 и E913 на аланин для создания “dead” форм (ДНК-связывающие, но не разрезающие версии белка). Гены мутантных форм dCasY D827A и dCasY E913A были клонированы в плазмиды pET21a под регуляцией T7 промотора, на C-конец белков был помещен his tag и MBP tag для дальнейшей аффинной очистки. Полученные плазмиды pET21_dCasY D827A и pET21_dCasY E913A были трансформированы в компетентные клетки Rosetta *E. coli*. 10 мл ночной культуры трансформированных бактерий разводили в 500 мл среды LB с добавлением ампициллина и растили клетки при температуре 37°C до достижения оптической плотности 0.6 отн.ед. Далее индуцировали экспрессию эффектора добавлением IPTG до концентрации 1 mM, после чего клетки инкубировали при температуре 16°C в течение 16 часов. Затем клетки осаждали на скорости 4000g в течение 30 минут и замораживали при температуре -20 C. Клеточный осадок растворяли в 15 мл лизисного буфера (50 mM Hepes-HCl pH=7.5, 500 mM NaCl, 10% глицерин, 1 mM бета-меркаптоэтанол) с добавлением 15 мг лизоцима. Затем клетки проходили ультразвуковую соникацию и центрифугировались в течение часа на скорости 16000g. Супернатант фильтровался (диаметр поры фильтра 0.22 мкм) и наносился на колонку HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare) для проведения аффинной хроматографии. После промывки лизисным буфером с добавлением 20мМ имидазола белок элюировали лизисным буфером с добавлением 300 мМ имидазола. Собранные фракции центрифугировали в концентраторах Amicon Ultra-4 centrifugal unit (Merc Millipore) с порами размером 100 кДа до объема 600 мкл. На данном этапе в пробы добавляли TEV протеазу и инкубировали ночь при температуре 10°C. Полученный образец наносили на гель фильтрационную колонку Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), уравновешенную буфером 50 mM Hepes-HCl pH=7.5, 500 mM NaCl, 1 mM DTT с добавлением 10% глицерина.

Результаты гельфильтрационной очистки рекомбинантных мутантов dCasY D827A и dCasY E913A представлены на рисунках 5 и 6.

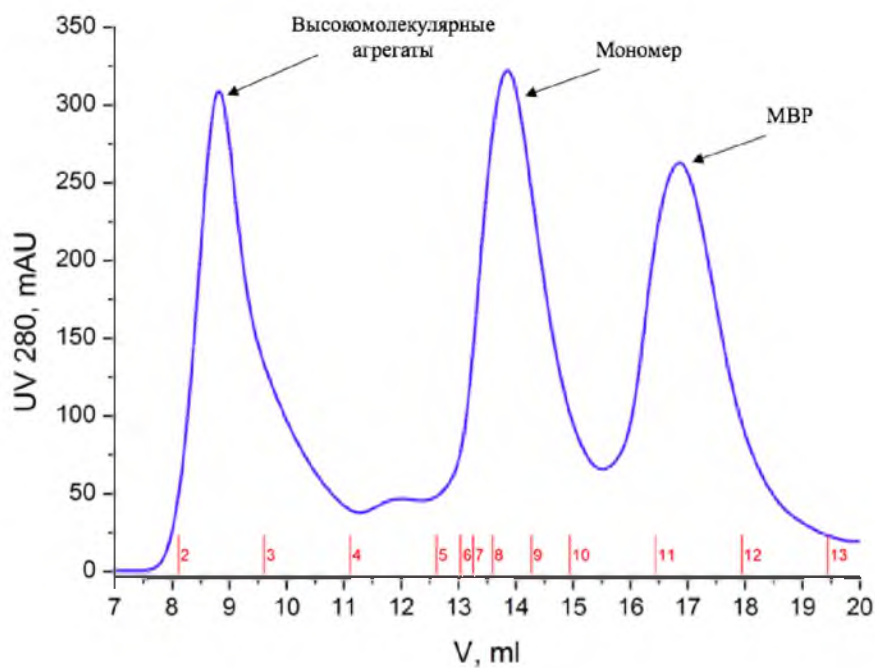


Рис.5. Хроматограмма гель-фильтрационной очистки белка *dCasY D827A*

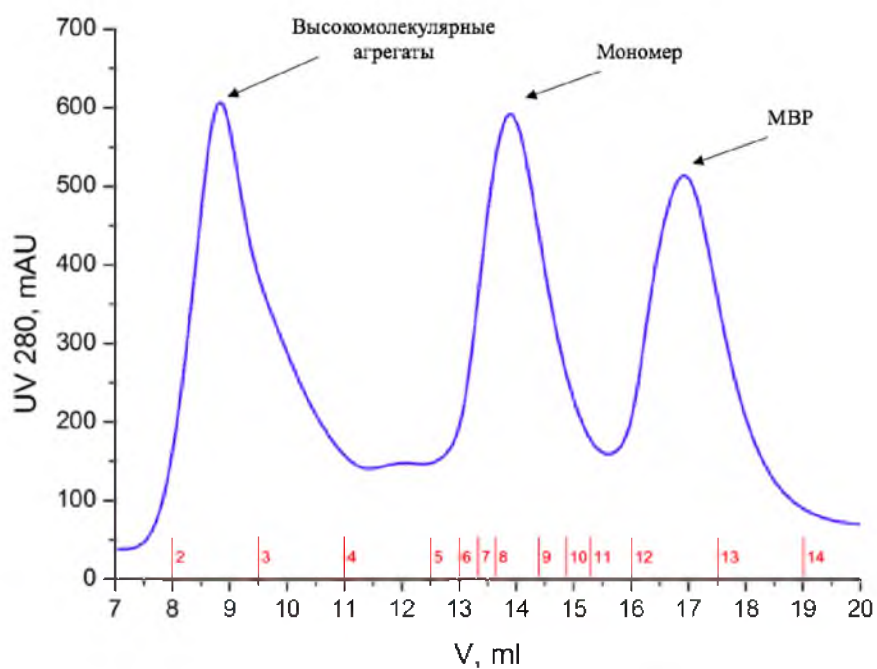


Рис.6. Хроматограмма гель-фильтрационной очистки белка *dCasY E913A*

Оба мутанта удалось выделить в форме мономеров, о чем свидетельствуют характерные пики на 13-15 мл. Концентрации выделенных белков составили: для *dCasY D827A* - 0.5мг/мл, для *dCasY E913A* - 1мг/мл.



Рис.7. Мономерные фракции белков CasY1, dCasY D827A, dCasY E913A. ПААГ, 10%, денатурирующие условия, окраска Кумасси.

Далее необходимо было проверить, могут ли полученные мутантные формы dCasY D827A и dCasY E913A связывать ДНК, и осталась ли у них нуклеазная активность.

2.6. Проверка наличия нуклеазной активности белков dCasY D827A и dCasY E913A.

Далее была проведена проверка способности мутантных форм dCasY D827A и dCasY E913A связываться с ДНК-мишенью посредством направляющей РНК (Рис. 8 и Рис. 9). Для проверки ДНК-связывающих способностей CasY1 в комплексе с направляющими РНК смешивался с ДНК мишенью *in vitro* используя соотношения Белок/РНК:ДНК 1:1, 1:3 и 1:10. (Таблица 1) ДНК мишени длиной 130 п. о. содержала флуоресцентную метку Су3 на 5' конце. Реакция проходила 30 мин при температуре 37С. Далее пробы были нанесены на 5% полиакриламидный гель и разгонялись в геле в электрофорезном аппарате, помещенном в лед. Электрофореграммы (Рис. 8 и Рис. 9) демонстрируют изменение подвижности ДНК в комплексе с рибонуклеиновым комплексом эффектора.

Таблица 1. Условия *in vitro* проверки ДНК-связывающей активности белков dCasY D827A / dCasY E913A .

ДНК мишень с Су3 меткой, 130 п. о.	dCasY D827A / dCasY E913A	РНК (скаутРНК и крРНК 1:1)
20 нМ	20 нМ	20 нМ
20 нМ	60 нМ	600 нМ
20 нМ	200 нМ	2000 нМ

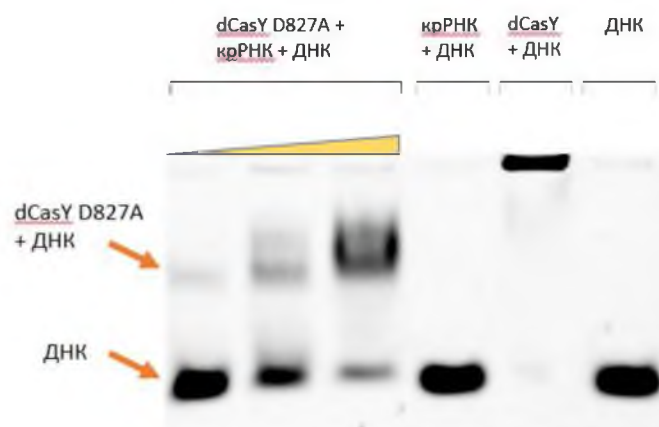


Рис. 8. Электрофореграмма, демонстрирующая связывание эффекторного комплекса, состоящего из мутантного белка dCasY D827A и направляющей РНК, с ДНК-мишенью.

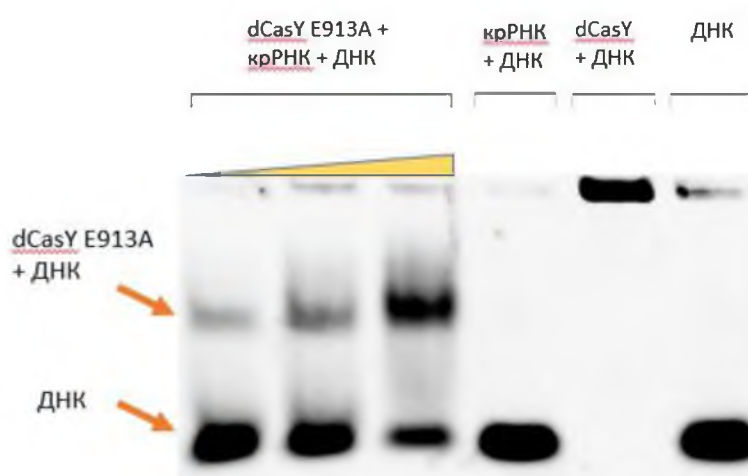


Рис. 9. Электрофореграмма, демонстрирующая связывание эффекторного комплекса, состоящего из мутантного белка dCasY E913A и направляющей РНК, с ДНК-мишенью.

Также была проведена проверка нуклеазной активности мутантных форм CasY1. С этой целью также была поставлена *in vitro* реакция разрезания ДНК с аналогичными соотношениями ДНК мишени к рибонуклеиновому комплексу (1:1, 1:3 и 1:10), пробы инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Далее реакция была разделена на равные части и пробы нанесены в нативный агарозный гель (Рис. 10) а также в ПААГ при денатурирующих условиях (Рис. 11). Денатурирующие условия были выбраны для того, чтобы продемонстрировать отсутствие никирования ДНК (Рис. 11).

Таблица 2. Условия проведения *in vitro* реакций для проверки нуклеазной активности рибонуклеиновых комплексов dCasY D827A / dCasY E913A

ДНК мишень, 820 п. о.	dCasY D827A / dCasY E913A	РНК скаут+кр
20 нМ	20 нМ	20 нМ

20 нМ	60 нМ	600 нМ
20 нМ	200 нМ	2000 нМ

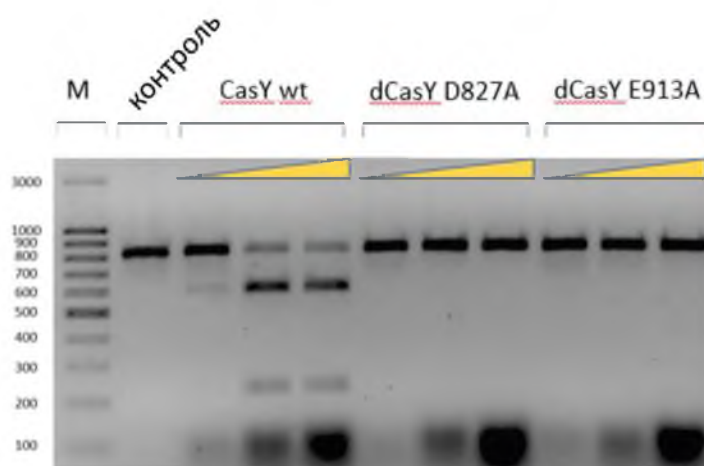


Рис. 10. Электрофореграмма, иллюстрирующая нуклеазную активность белка *CasY1* дикого типа (*wt*, *wild type*) и мутантных белков *dCasY D827A* и *dCasY E913A* при инкубации в различных соотношениях с ДНК мишенью (1:1, 1:3 и 1:10). Агарозный гель-электрофорез в нативных условиях. Желтым цветом обозначена нарастающая концентрация эффекторного комплекса. Ожидаемые размеры ДНК фрагментов, продуктов разрезания: 621 и 210 п. о.

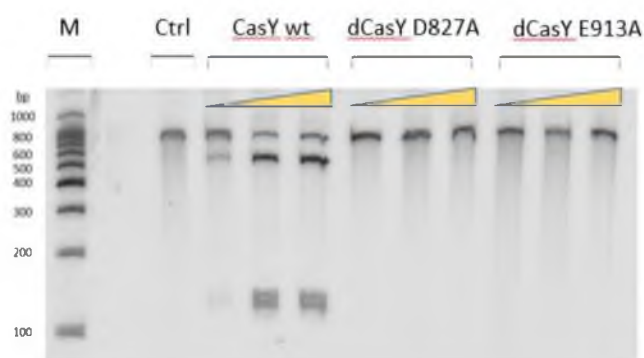


Рис. 11. Денатурирующий гель, демонстрирующий нуклеазную активность белка *CasY1* дикого типа (*wt*, *wild type*, белок без внесения мутаций) и мутантных белков *dCasY D827A* и *dCasY E913A* при инкубации в различных соотношениях с ДНК мишенью (1:1, 1:3 и 1:10). Полиакриламидный гель-электрофорез в денатурирующих условиях.

Электрофореграммы (Рис. 10 и Рис. 11) демонстрируют отсутствие нуклеазной активности мутантных форм *dCasY D827A* и *dCasY E913A*. Эти белки не вносят направленных одноцепочечных и двуцепочечных разрывов ДНК мишени. При этом полученные эффекторные комплексы способны направленно узнавать ДНК мишень и эффективно связываться с ней.

Таким образом системы dCasY D827A и dCasY E913A потенциально могут быть использованы для направленной регуляции транскрипции и репрессии генов.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 2022 году мы проверили возможность использования белка CasY1 для редактирования генома клеток человека HEK293T. Оказалось, что несмотря на то, что CasY1 активно синтезируется в клетках, он не способен вносить двунитевые разрывы в геном эукариотических клеток.

В ходе работ мы смогли создать мутантные версии CasY1 нуклеазы, которые могут специфически узнавать сайты ДНК и эффективно связываться с ними, не внося при этом двунитевые разрывы в ДНК dCasY D827A и dCasY E913A. Такие формы CasY1 могут использоваться для создания системы репрессии генов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. 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. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819–823.
2. Burstein,D., Harrington,L.B., Strutt,S.C., Probst,A.J., Anantharaman,K., Thomas,B.C., Doudna,J.A. and Banfield,J.F. (2017) New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature*, 542, 237–241.
3. 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. (2020) A scoutRNA Is Required for Some Type V CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell*, 79, 416-424.e5.
4. Liu JJ, Orlova N, Oakes BL, et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors [published correction appears in *Nature*. 2019 Apr;568(7752):E8-E10].