

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)

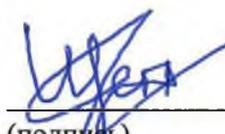
Казалов Максим Алексеевич  
(Исследование активности  
CRISPR-Cas систем с помощью  
экспериментов *in vitro*)

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
<b>2.1. Оптимизация условий выделения рекомбинантной нуклеазы CasY2.</b>	9
<b>2.2. Создание плазмиды, несущей ген CasY1 и последовательности направляющих РНК для экспрессии в клетках человека.</b>	10
<b>2.3. Проверка внутриклеточного синтеза нуклеазы CasY1 в клетках человека.</b>	11
<b>2.4. Проверка нуклеазной активности CasY1 в клетках человека.</b>	13
<b>2.5. Получение каталитически неактивных форм эффектора CasY1.</b>	14
<b>2.6. Проверка наличия нуклеазной активности белков dCasY D827A и dCasY E913A.</b>	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-пиперазинэтансульфоная 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 HEK293T 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.

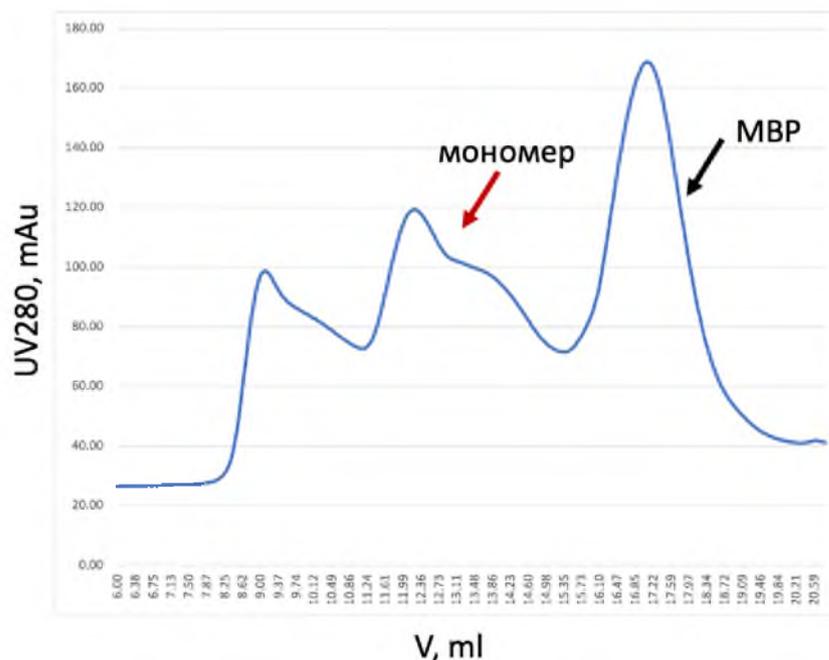


Рис.1. Хроматограмма гель-фильтрационной очистки белка CasY2. Красной стрелкой отмечен предполагаемый пик мономера.

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).

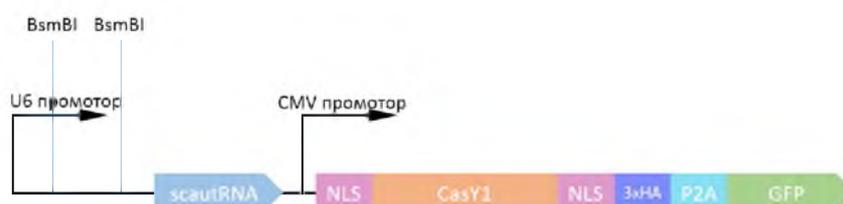


Рис.2. Схема плазмиды *U6 scautRNA CMV CasY1 GFP*, используемой для проверки активности нуклеазы *CasY1* в клетках человека.

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.

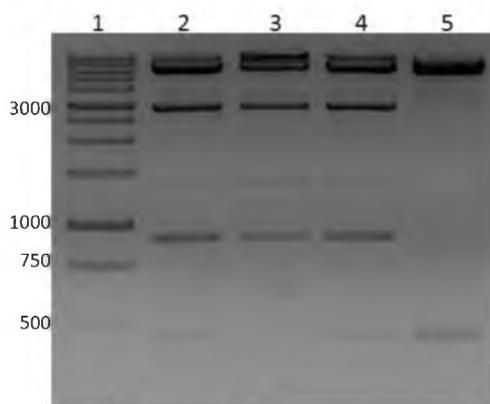


Рис.3. Рестрикция плазмиды *U6 scautRNA CMV CasY1 GFP*.

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 - плаزمида, 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 плазмида *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 CO<sub>2</sub>. 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-мышинный 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).

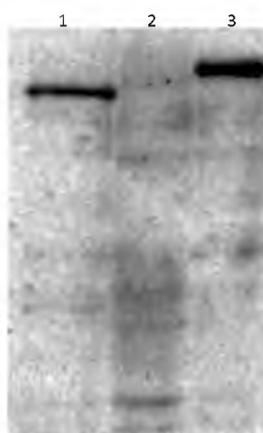


Рис.4. Проверка эффективности синтеза нуклеазы CasY1 в клетках человека HEK293T с помощью Вестерн Блот анализа. Обозначения: 1 – CasY1, 2 – отрицательный контроль, 3 – положительный контроль - SpCas9. Размеры белков: CasY1 – 138 кДа, SpCas9– 165 кДа. Отрицательный контроль: клетки HEK293T, не подвергшиеся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

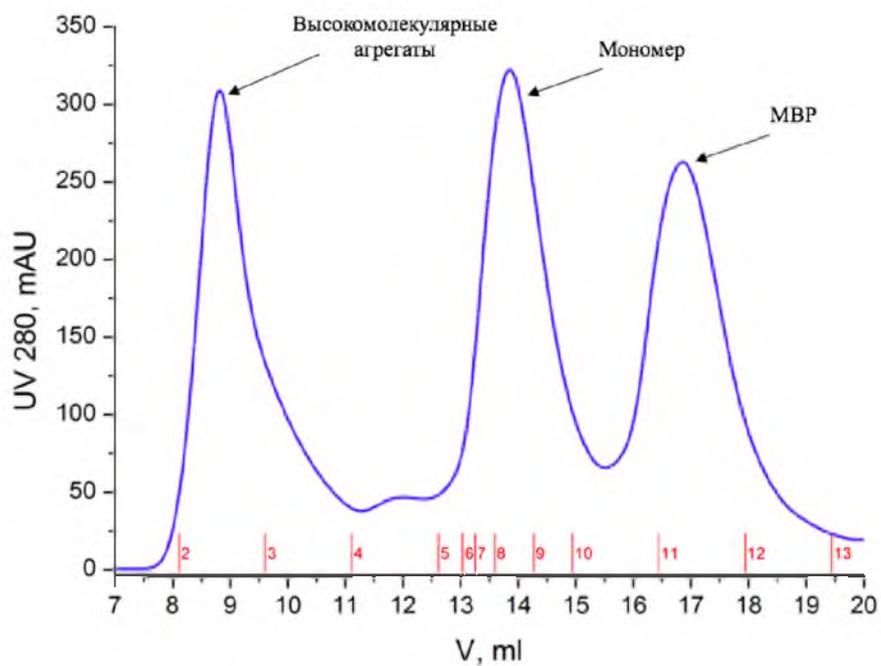


Рис.5. Хроматограмма гель-фильтрационной очистки белка dCasY D827A

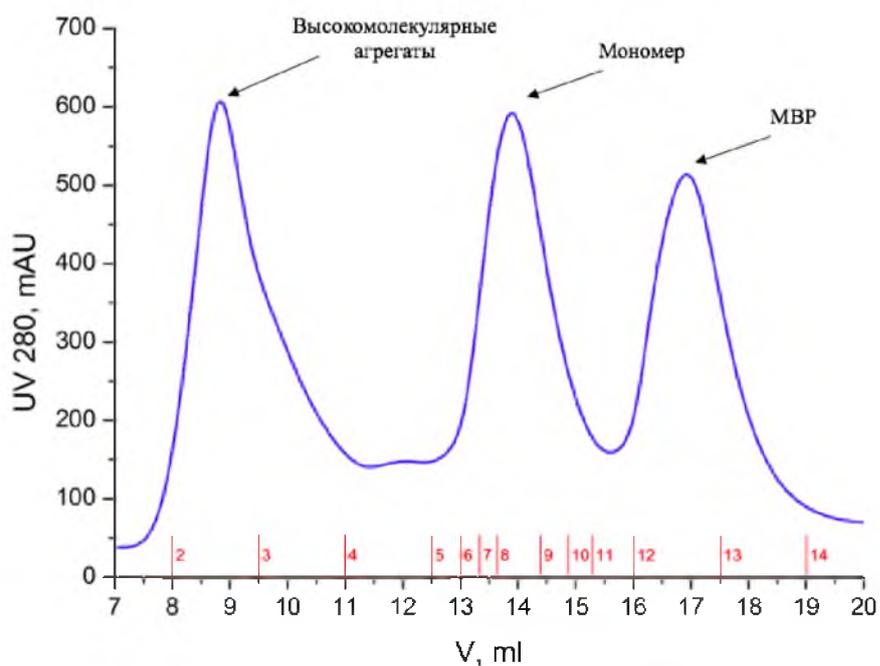


Рис.6. Хроматограмма гель-фильтрационной очистки белка dCasY E913A

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.

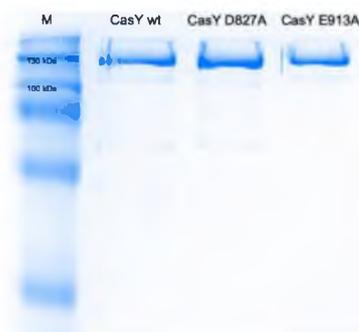


Рис.7. Мономерные фракции белков CasY1, dCasY D827A, dCasY E913A. ПААГ, 10%, денатурирующие условия, окраска Кумасси.

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

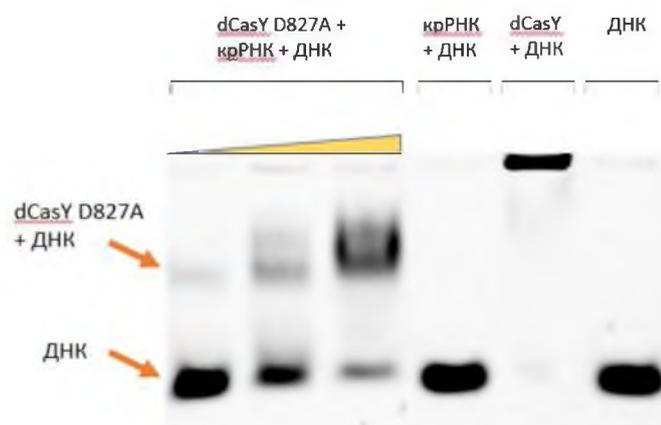


Рис. 8. Электрофореграмма, демонстрирующая связывание эффекторного комплекса, состоящего из мутантного белка dCasY D827A и направляющей РНК, с ДНК-мишенью.

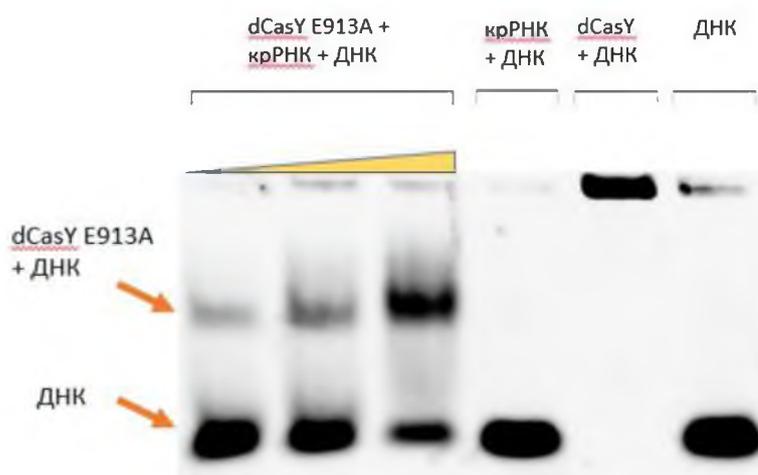


Рис. 9. Электрофореграмма, демонстрирующая связывание эффекторного комплекса, состоящего из мутантного белка dCasY E913A и направляющей РНК, с ДНК-мишенью.

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

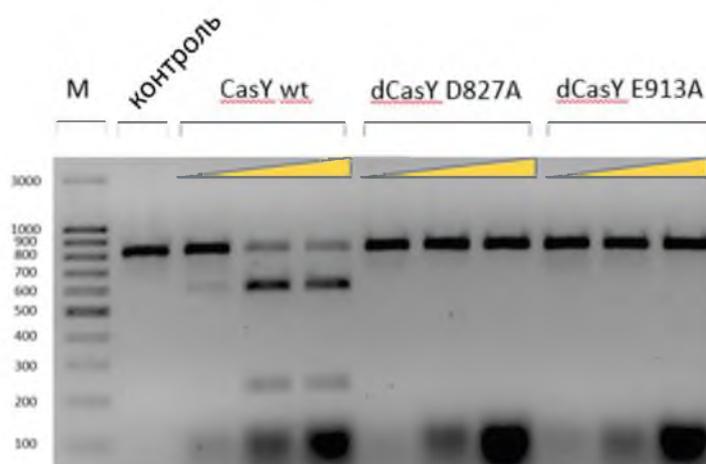


Рис. 10. Электрофореграмма, иллюстрирующая нуклеазную активность белка *CasY1* дикого типа (*wt*, *wild type*) и мутантных белков *dCasY D827A* и *dCasY E913A* при инкубации в различных соотношениях с ДНК мишенью (1:1, 1:3 и 1:10). Агарозный гель-электрофорез в нативных условиях. Желтым цветом обозначена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

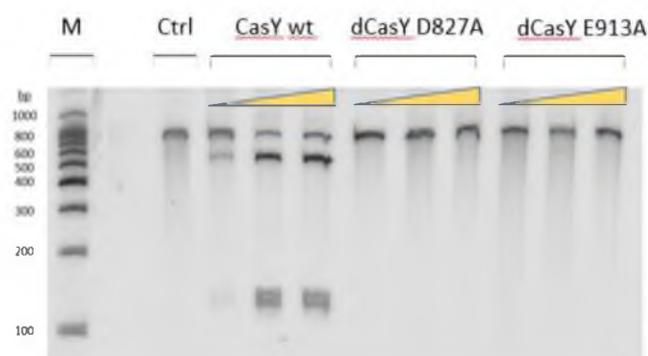


Рис. 11. Денатурирующий гель, демонстрирующий нуклеазную активность белка *CasY1* дикого типа (*wt*, *wild type*, белок без внесения мутаций) и мутантных белков *dCasY D827A* и *dCasY E913A* при инкубации в различных соотношениях с ДНК мишенью (1:1, 1:3 и 1:10). Полиакриламидный гель-электрофорез в денатурирующих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