

УДК 577

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНА *CCR5* ЧЕЛОВЕКА ПУТЕМ ВЫБОРА ОПТИМАЛЬНЫХ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК НУКЛЕАЗ SpCas9 И AsCas12A

© 2025 г. Р. Р. Минтаев*, Д. В. Глазкова, Ю. А. Таран, Е. В. Богословская, Г. А. Шипулин

Центр стратегического планирования и управления медицинскими и биологическими рисками, Федеральное медико-биологическое агентство, Москва, 119833 Россия

*e-mail: ramil.mintaev@fbb.msu.ru

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

После доработки 30.08.2024 г.

Принята к публикации 30.09.2024 г.

Достижения в области редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas открыли новые возможности для лечения многих заболеваний человека, включая ВИЧ-инфекцию. Нокаут гена *CCR5*, как потенциальный способ лечения ВИЧ-инфекции, изучается уже давно. Проанализированы ранее изученные направляющие (гидовые) РНК нуклеаз SpCas9 и AsCas12a, нацеленные на ген *CCR5*, и отобраны наиболее эффективные из них. С использованием биоинформатических подходов проведен поиск новых гидовых РНК этих же нуклеаз. Сравнили эффективность расщепления целевых сайтов нуклеазами SpCas9, SpCas9-HF1-plus и AsCas12a в комплексе с выбранными гидовыми РНК, а также их нецелевую активность. Показано, что две из протестированных гидовых РНК для SpCas9-HF1-plus и три для AsCas12a обеспечили разрезание гена *CCR5* в 60–72% клеток, при этом их нецелевая активность находилось ниже предела детекции. Таким образом, эти гидовые РНК можно рассматривать в качестве кандидатов для разработки подходов генной терапии ВИЧ-инфекции.

Ключевые слова: генная терапия, ВИЧ, *CCR5*, CRISPR/Cas, Cas9, Cas9-HF1, Cas12a, Cpf1

DOI: 10.31857/S0026898425020055, EDN: GGKOBV

ВВЕДЕНИЕ

ВИЧ-инфекция остается глобальной проблемой здравоохранения. Антитретровирусная терапия позволяет контролировать течение ВИЧ-инфекции, переводя это заболевание в разряд хронических, однако побочные эффекты и высокая стоимость терапии заставляют искать новые подходы, направленные на полное удаление вируса из организма [1]. Известны четыре случая излечения ВИЧ-инфекции (так называемые берлинский, лондонский и дюссельдорфский пациенты и один случай без псевдонима) [2–4], связанные с трансплантацией костного мозга от доноров с делецией дельта 32 в гене *CCR5*. Рецептор *CCR5* с этой делецией не экспрессируется на поверхности клеток, что делает невозможным проникновение в них R5-тропного ВИЧ. Однако этот подход невозможно масштабировать из-за редкой встречаемости гомозигот по гену *CCR5Δ32*, сложности подбора HLA-совместимых доноров и высоких рисков аллогенной трансплантации.

Трансплантация аутологичных клеток с нокаутом гена *CCR5* может стать альтернативным подходом к лечению ВИЧ-инфекции. На сегодняшний день наиболее гибкой системой редактирования генома, позволяющей проводить нокаут целевого гена, является система CRISPR/Cas, которая впервые была использована в 2013 г. [5, 6]. Система CRISPR/Cas использует гидовые РНК (гРНК) для точного разрезания ДНК в заданных участках. гРНК связывается с нуклеазой Cas, образуя рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП-комплекс). Нуклеаза Cas в составе такого комплекса сначала распознает протоспейсерный соседний мотив (РАМ), короткую консервативную последовательность из 3–4 нуклеотидов, затем часть последовательности гРНК (спейсер) комплементарно связывается с целевой последовательностью ДНК (протоспейсер). После этого нуклеаза гидролизует ДНК с образованием двухцепочечного разрыва.

Потенциальная возможность лечения ВИЧ-инфекции путем нокаута гена *CCR5* с использо-

ванием системы CRISPR/Cas привела к активному поиску оптимальной гРНК для нацеливания на ген рецептора *CCR5* [7–33]. Эффективность описанных гРНК варьирует от 0.9% [13] до 80% [21], а эффективность редактирования снижается при переходе от работы с перевиваемыми клеточными линиями к первичным гемопоэтическим стволовым клеткам человека CD34+ [15, 16]. В то же время математическое моделирование показало, что для обеспечения защиты от ВИЧ как минимум 50% иммунных клеток должны иметь биаллельный нокаут гена *CCR5* [34]. Поэтому выбор потенциальных гРНК с высокой эффективностью нокаута гена (значительно выше 50%) во время первичного отбора на иммортализованных клеточных линиях необходимо для успешного редактирования первичных клеточных культур и стволовых клеток человека с использованием системы CRISPR/Cas.

Помимо эффективности разрезания целевого сайта, нецелевая активность (так называемый off-target эффект) является важной характеристикой системы геномного редактирования, определяющей ее безопасность. Нецелевая активность зависит от различных факторов. В частности, как гРНК, так и нуклеаза, которые образуют РНП-комплекс, влияют на нецелевую активность системы CRISPR/Cas. Для минимизации нецелевого расщепления критически важно выбрать гРНК с оптимальным балансом между высокой целевой активностью и низкой нецелевой активностью. Использование вариантов нуклеазы SpCas9 с повышенной специфичностью, например SpCas9-HF1, может стать еще одним способом снижения нецелевой активности [6, 35–39]. К сожалению, повышенная специфичность вариантов SpCas9 часто сопровождается снижением целевой эффективности. Альтернативой SpCas9 могут стать белки ортологи. Например, AsCas12a из *Acidaminococcus* sp. (также известный как AsCpf1) является ортологом SpCas9 и обладает повышенной специфичностью. Большая специфичность AsCas12a обусловлена более сложной последовательностью PAM (TTTV вместо NGG), а также увеличенным размером спейсера (23 вместо 20 нуклеотидов). Согласно опубликованным данным, нуклеазы AsCas12a и SpCas9 имеют сопоставимую эффективность, при этом AsCas12a имеет более низкую нецелевую активность [39, 40].

В своей работе мы задались целью отобрать наиболее эффективные гРНК SpCas9 и AsCas12a, нацеленные на ген *CCR5*, выбрать с помощью биоинформатических ресурсов новые гРНК, а также сравнить между собой их целевую и нецелевую активности. Помимо этого, сравнили целевую и нецелевую активности трех нуклеаз: SpCas9 дикого типа, SpCas9-HF1-plus [38] и AsCas12a [40].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Предсказание гРНК. Нуклеотидные последовательности гРНК, нацеленных на ген *CCR5*, специфичных для SpCas9 и AsCas12a, предсказаны и ранжированы с использованием программного обеспечения СНОРСНОР v3 [41]. Для экспериментальной проверки были выбраны не изученные ранее гРНК с наименьшим рангом и минимальной гомологией с геном *CCR2*.

Конструирование плазмид. Плазида pSpCas9-HF1-plus, кодирующая белок SpCas9-HF1-plus с сигнальной последовательностью ядерной локализации (NLS) на N- и C-концах, получена от Эрвина Уэлкера (плазида Addgene #126768). Для обеспечения единообразия экспериментальных условий все экспрессионные кассеты включали идентичные регуляторные элементы (промотор, сигнал полиаденилирования) и по NLS как на N-, так и на C-конце белка. Плазида pwtSpCas9 получена путем введения точечных мутаций (A497N, A695Q, A926Q) в плазмиду pSpCas9-HF1-plus с помощью перекрывающейся ПЦР. Плазида pAsCas12a создана путем клонирования кодирующей последовательности AsCas12a из плазмиды pTE4396 (получена от Эрвина Уэлкера, плазида Addgene #74041) в вектор pSpCas9-HF1-plus, в котором она заменила последовательность, кодирующую SpCas9-HF1-plus. Таким образом, все конструкции, содержали идентичные регуляторные элементы и одинаковое количество NLS.

Нуклеотидные последовательности, содержащие промотор U6 и последовательности, кодирующие гРНК нуклеаз SpCas9 или AsCas12a, нацеленные на *CCR5*, получали с использованием перекрывающихся олигонуклеотидов, которые соединяли в двухступенчатой ПЦР с полимеразой Q5 (“NEB”, США). Если на 5'-конце гРНК не было остатка G, то его добавляли для повышения активности промотора U6. Продукты амплификации выделяли из агарозного геля с использованием набора для восстановления ДНК ZymoClean Gel DNA Recovery Kit (“Zymo Research”, США). После очистки фрагменты ДНК встраивали в вектор A/T pGem (“Promega”, США) в соответствии с протоколом производителя.

Клеточные линии. Клеточная линия HT1080-CCR5-EGFP, стабильно экспрессирующая трансген *CCR5-EGFP*, получена ранее [42]. Клетки HT1080-CCR5-EGFP культивировали в ростовой среде MEM (“Gibco”, США), дополненной заменимыми аминокислотами MEM (“Gibco”), буфером HEPES (“Gibco”) и 10%-ной сывороткой крупного рогатого скота (FBS, “Gibco”).

Анализ целевой активности нуклеаз. Эффективность разрезания гена *CCR5* оценивали

с использованием клеточной линии HT1080-CCR5-EGFP. За день до трансфекции клетки HT1080-CCR5-EGFP высевали в 96-луночный планшет с плотностью 2×10^4 клеток на лунку. Клетки трансфицировали либо 300 нг плазмиды, кодирующей красный флуоресцентный белок tdTomato (плазмида pCMV-tdTomato Vector, "TAKARA", Япония), либо 300 нг смеси плазмиды, кодирующей нуклеазу, и ампликона, кодирующего гРНК, в соотношении 6 : 1. Трансфекцию проводили с использованием FuGENE HD ("Promega") в соответствии с протоколом производителя. Клетки HT1080-CCR5-EGFP анализировали через 7 дней после трансфекции.

Эффективность нокаута гена определяли с использованием проточного цитометра NovoCyte Quanteon ("Agilent", США) как процент EGFP-отрицательных клеток в образце и нормировали на эффективность трансфекции. Эффективность трансфекции определяли как процент tdTomato-положительных клеток в образце на третий день после трансфекции в том же эксперименте.

Анализ off-target эффектов. Потенциальные нецелевые сайты каждой пары нуклеаза/гРНК предсказывали с использованием программного обеспечения СНОРСНОР v3 [41]. Для каждого нецелевого сайта были выбраны праймеры, позволяющие получить ампликоны длиной 180 п.н., перекрывающие предсказанные потенциальные off-target сайты (праймеры представлены в табл. S1, дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи и на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2025/2/supp_Mintaev_rus.zip). Геномную ДНК из трансфицированных и контрольных клеток HT1080-CCR5-EGFP (4×10^4 клеток на образец) выделяли с использованием набора реагентов AmpliTest RIBO-prep (Центр стратегического планирования, ФМБА России) и использовали в качестве матрицы для получения ампликонов. Полученные ампликоны смешивали в эквимольных соотношениях, очищали на магнитных шариках AMPure XP ("Beckman Coulter", США) и использовали для получения библиотек ДНК с помощью адаптеров ("Illumina", США). Сгенерированные библиотеки ДНК секвенировали с использованием парных чтений длиной 150 п.н. на приборе MiSeq ("Illumina"). Полученные последовательности ДНК обрезали с использованием программного обеспечения Trimmomatic 0.39 и сопоставляли с последовательностями нецелевых сайтов с помощью программы Bowtie2. Частоту мутаций (выявление вариантов) в off-target сайтах анализировали с использованием скриптов, написанных на языках Python и R [43].

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием языка программирования R. Результаты определения эффективности разрезания гена CCR5 представлены как среднее значение и 95% доверительный интервал для значений, полученных в трех независимых экспериментах, каждый из которых включал четыре технических повтора. Статистические различия между экспериментальными группами оценивали с использованием теста Тьюки. Соответствие нормальному распределению проверяли с помощью теста Шапиро–Уилка.

Данные по нецелевой активности пар нуклеаза/гРНК представлены как среднее значение двух независимых экспериментов. Статистическую значимость данных по нецелевой активности проверяли с использованием точного теста Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ ранее изученных гРНК и нуклеаз SpCas9 и AsCas12a, нацеленных на ген CCR5 человека

На ресурсе PubMed был проведен поиск статей, сообщающих о нокауте гена CCR5 человека с использованием систем CRISPR/Cas с нуклеазами SpCas9 или AsCas12a. В 26 публикациях охарактеризована 41 гРНК нуклеазы SpCas9 с PAM 5'-NGG-3' и 9 гРНК AsCas12a с PAM 5'-TTTN-3' (табл. S2, S3, см. электронное приложение). Эффективность нокаута гена CCR5 варьировала от 0.9% [13] до 80% [21].

В нескольких случаях эффективность разрезания с помощью одной и той же гРНК, вычисленная в разных исследованиях, существенно различалась (например, 2.9% [13] против 24% [18]). Некоторые авторы дополнительно оценивали off-target эффекты гРНК (эти результаты представлены в табл. S2 и S3).

гРНК были ранжированы по средней эффективности (табл. S2 для SpCas9, табл. S3 для AsCas12a). Для SpCas9 мы выбрали гРНК 1, 2 и 5 из ранжированного списка: L96, L268, L272m (табл. 1). гРНК 115(–) и 273(–), занявшие места 3 и 4, из дальнейшего исследования исключили, поскольку гРНК 115(–) комплементарна L96, а гРНК L273(–) смещена на один нуклеотид относительно L272(–) и эффективность обеих была ниже, чем у их аналогов. Кроме того, мы выбрали гРНК L466(+), так как она показала эффективность нокаута 70% в наших предыдущих экспериментах (данные не опубликованы). Для AsCas12a выбрали три гРНК (cL166m,

Таблица 1. Характеристики гРНК, полученных ранее

CRISPR/Cas-система	гРНК	Позиция	Направление	Спейсер, 5' → 3'	Целевая активность, %	Нецелевые сайты*
SpCas9	L96	96	+	cctgcctccgctctactcac	68 [31]	23
	L268	268	+	gctgccgccagtgaggactt	74 [10]	8
	L272m	272	-	gcagcatagtgagcccagaa	80 [21]	19
	L466	466	+	gctgtgtttgcgtctctccc	36 [18], 70**	19
AsCas12a	cL166m	166	-	tcaggatgaggatgaccagcatg	55 [32]	1
	cL290	290	+	gaaatacaatgtgtcaactcttg	43 [33]	1
	cL652m	652	-	ggattcccagtagcagatgacc	42 [32]	1

*В соответствии с СНОРСНОР v3.

**Эта гРНК протестирована ранее в нашей лаборатории (данные не опубликованы).

cL290, cL652m), ранее показавшие наивысшую эффективность [32, 33].

Выбор гРНК SpCas9 и AsCas12a, нацеленных на ген CCR5 человека, с использованием биоинформатических подходов

Нами также проведен поиск новых гРНК с помощью программного обеспечения СНОРСНОР v3 [41]. В пределах открытой рамки считывания гена *CCR5* человека найдены 124 сайта SpCas9 с РАМ 5'-NGG-3' и 50 сайтов AsCas12a с РАМ 5'-TTTN-3'. Программное обеспечение СНОРСНОР v3 учитывает несколько факторов ранжирования данных, включая общий GC-состав, самокомплементарность последовательности и эффективность гРНК, с использованием модели, описанной Doench J.G. и соавт. [44].

Кроме того, используя описанную в [45] модель, СНОРСНОР v3 подсчитывает количество нецелевых сайтов, что также влияет на

ранжирование гРНК. Были исключены уже изученные гРНК, самокомплементарные гРНК, гРНК, имеющие дополнительный сайт разрезания в геноме, и гРНК с тремя или более А/Т среди первых пяти нуклеотидов, соседствующих с РАМ. Последний критерий основан на том, что согласно [46], высокий GC-состав первых пяти нуклеотидов значительно увеличивает эффективность разрезания. В результате отобрали четыре новых гРНК для SpCas9 (P260, P363, P552m, P1011) и три для AsCas12a (cP60m, cP500, cP548) (табл. 2).

Эффективность нокаута гена CCR5 с помощью нуклеаз SpCas9, SpCas9-HF1-plus и AsCas12a с выбранными гРНК

Эффективность нокаута гена *CCR5* изучали на клеточной линии HT1080-CCR5-EGFP, экспрессирующей ген *CCR5* человека, слитый с геном *EGFP (CCR5-EGFP)* [44]. Разрезание последовательности *CCR5* и последующий но-

Таблица 2. Характеристики гРНК нуклеаз SpCas9 и AsCas12a, предсказанные с помощью программы СНОРСНОР v3

Система CRISPR/Cas	гРНК	Позиция	Направление	Последовательность, 5' → 3'	Эффективность*	Нецелевые сайты**
SpCas9	P260	260	+	ctcactatgctgccgccag	62	12
	P363	363	+	cctgacaatcgataggtacc	48	3
	P552m	552	-	gtatggaaaatgagagctgc	53	20
	P1011	1011	+	agtttaccccgatccactg	75	2
AsCas12a	cP60m	60	-	gcagggtccgatgataataat	83	0
	cP500	500	+	ccagatctcaaaaagaaggtctt	60	0
	cP548	548	+	catacagtcagtatcaattctgg	77	0

*В соответствии с СНОРСНОР v3.

**Число нецелевых сайтов в соответствии с СНОРСНОР v3.

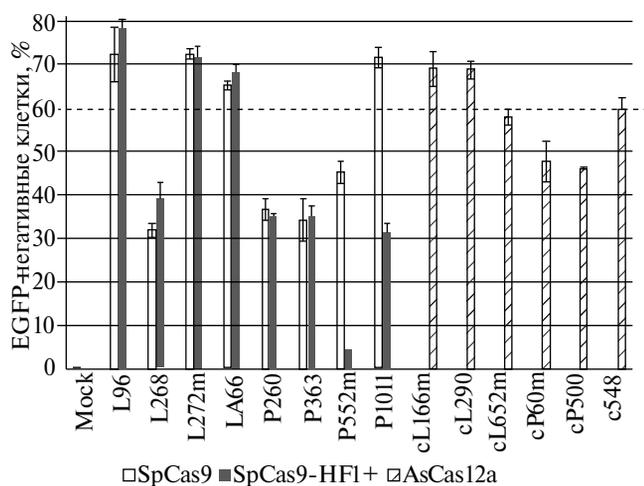


Рис. 1. Эффективность гРНК. Приведены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах и стандартные отклонения. Пунктирная линия показывает пороговое значение, использованное для выбора гРНК, нецелевую активность которых определяли в последующих экспериментах.

каут *CCR5-EGFP* можно легко обнаружить по отсутствию флуоресцентного сигнала в клетке. Клетки HT1080-CCR5-EGFP трансфицировали одновременно плазидами, кодирующими различные варианты нуклеаз, и ампликонами, кодирующими соответствующие гРНК. Через неделю после трансфекции определяли долю EGFP-отрицательных клеток с использованием проточной цитометрии. Результаты суммированы на рис. 1.

Эффективность протестированных гРНК SpCas9 варьировала от 31.9 до 72.5%, SpCas9-HF1-plus – от 4.4 до 78.5% и AsCas12a – от 46.4 до 69.1%. Три из четырех ранее изученных гРНК SpCas9 показали высокую активность: L96 (72.4%), L272m (72.5%) и L466 (65.3%). Эффективность только одной из предсказанных гРНК – P1011 – превышала 50% (71.67%). Эффективность мутантного варианта SpCas9-HF1-plus с тремя гРНК – L268 (39.08%), P552m (4.38%), P1011 (31.32%) была значительно ниже, чем у нуклеазы дикого типа (p -value < 0.05). Использование других гРНК не выявило значительных различий между SpCas9 и SpCas9-HF1-plus.

Все три ранее описанные гРНК и одна предсказанная гРНК AsCas12a показали высокую эффективность (cL166m – 69.12%, cL290 – 68.87%, cL652m – 57.96%, cP548 – 60.1%). Две другие предсказанные гРНК AsCas12a были значительно менее активными (47.73% у cP60m и 48.38% у cP500).

Off-target эффект

Четыре гРНК нуклеазы SpCas9 (L96, L272m, L466, P1011) и три AsCas12a (cL166m, cL290, cP548), эффективность которых превышала 60%, отобрали для дальнейшего анализа нецелевой активности.

Нецелевые сайты каждой гРНК предсказывали с использованием программного обеспечения СНОРСНОР v3 [43]. Количество предсказанных сайтов гРНК SpCas9 составило: 23 (L96), 19 (L272m), 19 (L466) и 2 (P1011). Предсказаны по одному сайту гРНК cL166m и cL290 AsCas12a и ни одного для cP548 (табл. 1, табл. 2). Предсказанные нецелевые сайты представлены в табл. S4 (см. электронное приложение).

Чтобы измерить off-target эффекты в предсказанных сайтах, клетки HT1080-CCR5-EGFP обрабатывали одной из пар нуклеаза/гРНК, как и в предыдущем эксперименте. Геномную ДНК выделяли из клеток и анализировали методом глубокого секвенирования. В качестве контроля использовали необработанные клетки. Результаты анализа частоты мутаций в сайтах нуклеаз SpCas9 и SpCas9-HF1-plus показаны на рис. 2.

Нами обнаружена нецелевая активность нуклеазы SpCas9 (p -value < 0.001) в двух предсказанных участках гРНК L96, в двух участках гРНК L466 и в одном участке гРНК L272. В то же время, нуклеаза SpCas9-HF1-plus показала нецелевую активность только с одной гРНК – L96 – и только в сайте №13, причем частота мутаций в этом сайте была значительно ниже, чем при воздействии SpCas9 дикого типа. При использовании нуклеаз SpCas9 или SpCas9-HF1-plus с гРНК P1011 мы не обнаружили активности ни в одном из предсказанных нецелевых участков, количество мутаций в клетках, обработанных нуклеазой, не отличалось существенно от количества мутаций в необработанных клетках.

Off-target эффект отсутствовал также при использовании нуклеазы AsCas12a с гРНК cL166m или cL290. Следует отметить, что off-target эффект нуклеазы AsCas12a с гРНК cP548 не анализировали, поскольку не были предсказаны нецелевые сайты этой гРНК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из возможных методов генной терапии ВИЧ-инфекции является нокаут гена, кодирующего рецептор CCR5, который необходим для проникновения R5-тропного вируса в клетку. Нами были отобраны несколько гРНК для нокаута гена *CCR5* с помощью системы CRISPR/Cas. С этой целью использовали два подхода: анализировали известные гРНК и про-

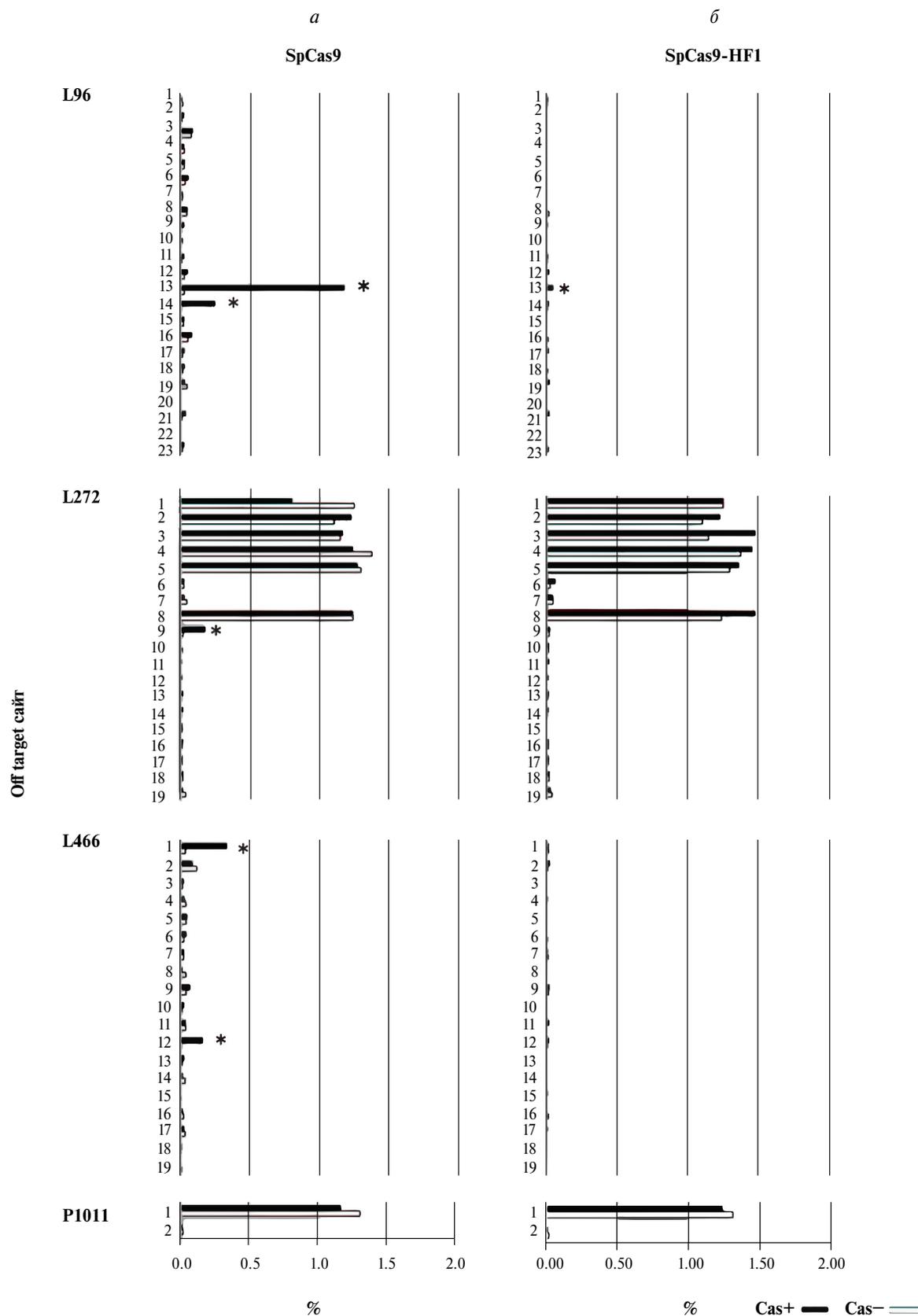


Рис. 2. Частота мутаций в 63 прогнозируемых нецелевых участках SpCas9 (а) и SpCas9-HF1-plus (б). Данные получены в двух независимых экспериментах. **p*-value < 0.001 по точному критерию Фишера по сравнению с контролем.

водили поиск новых гРНК с помощью биоинформатических методов. В базе данных PubMed мы нашли 26 статей, описывающих около 50 различных гРНК. Большинство из этих гРНК охарактеризовали в первые несколько лет после появления инструментов CRISPR/Cas. В этот период для определения эффективности разрезания чаще всего использовали тест T7E1, имеющий невысокую точность. Гораздо реже применяли секвенирование по Сэнгеру отдельных клонов, определение фракции CCR5-негативных клеток с использованием меченых антител или анализ нокаута химерного гена *CCR5-EGFP*, который легко детектировать на проточном цитометре. Очевидно, что использование разных методов для оценки эффективности системы CRISPR/Cas затрудняет сравнение результатов, полученных разными авторами. Вероятно, именно поэтому мы обнаружили большую вариабельность в эффективности одной и той же гРНК в разных исследованиях.

Мы определяли эффективность семи ранее изученных гРНК, четырех для SpCas9 и трех для AsCas12a. Оказалось, что активность гРНК L466 и L268 SpCas9 в наших экспериментах, значительно отличается от активности, выявленной ранее [10, 18]. В наших экспериментах эффективность гРНК L466 составила 65%, что значительно больше 36%, о которых сообщили Mandal и соавт. [18]. Напротив, мы наблюдали более низкую эффективность L268 гРНК (~ 32%), по сравнению с эффективностью той же гРНК, описанной Cradick и соавт. [10].

Результаты оценки эффективности остальных пяти гРНК (L96, L272m, cL166m, cL290, cL652m) были сопоставимыми [21, 31–33]. Существующие незначительные различия можно объяснить различиями в способах доставки инструментов редактирования в клетки и обнаружения нокаута, а также разными промоторами, использованными для экспрессии нуклеазы, количеством и типами сигналов NLS в составе нуклеазы [47].

Нами протестированы также семь новых гРНК, найденных с помощью программного обеспечения SНОРСНОР v3 и отфильтрованных по заранее определенным критериям. Две из этих семи гРНК показали активность 50% или выше, а эффективность одной из них составила 71.67%. Тем не менее стоит отметить, что мы не наблюдали корреляции между активностью уже охарактеризованных гРНК (табл. S2) [7–33] и ранжированием тех же гРНК с помощью программного обеспечения SНОРСНОР v3. Из выходных данных SНОРСНОР v3 (табл. S5) видно, что при ранжировании гРНК программа отдает приоритет количеству потенциальных off-target сайтов, а не эффективности разрезания.

По этой логике, гРНК, которые имеют в геноме второй сайт разрезания, полностью идентичный целевому, должны находиться в конце списка или быть исключены из него. Несмотря на это, программа располагает такие гРНК достаточно высоко в списке. Например, первые три такие гРНК находятся на 15, 24 и 28 местах среди всех 122 гРНК в списке, выданном SНОРСНОР v3 (табл. S5). В целом, очевидные несоответствия в алгоритме ранжирования указывают на необходимость оптимизации программы.

Учитывая описанные особенности SНОРСНОР v3, было интересно сравнить этот метод с другой программой выбора гРНК. Для сравнения мы выбрали программу CRISPOR [48], которая использует те же прогностические модели, что и SНОРСНОР v3. Действительно, показатели специфичности и эффективности оказались схожими (табл. S6). Однако в отличие от SНОРСНОР v3, программа CRISPOR оценивала специфичность гРНК, направленных на последовательности, которые повторяются в геноме, ниже порогового значения. С другой стороны, веб-версия CRISPOR не предоставляет возможности установить максимальное количество несоответствий между гРНК и сайтами, которые не являются мишенями, что ограничивает поиск четырьмя несоответствиями.

Мы оценили нецелевую активность семи гРНК, которые обеспечивали эффективность нокаута более 60%: L96, L272m, L466, P1011 с SpCas9; cL166m, cL290, cP548 с AsCas12. С этой целью мы определили частоту мутаций в потенциальных off-target сайтах, предсказанных SНОРСНОР v3 и отличающихся от целевых последовательностей 1–3 нуклеотидами. Как и ожидалось, нуклеаза AsCas12a имела гораздо меньше предсказанных нецелевых сайтов, чем SpCas9, поскольку AsCas12a имеет более длинные PAM и спейсеры [39, 40]. Для гРНК AsCas12a cP548 нецелевые сайты не были предсказаны, поэтому анализ не проводили. Анализ методом глубокого секвенирования единственного предсказанного сайта для гРНК cL166m и cL290 не выявил различий в частоте мутаций в клетках, обработанных нуклеазой, и в контрольных клетках.

Мы не обнаружили какой-либо нецелевой активности SpCas9 дикого типа с гРНК P1011 в двух предсказанных участках. После редактирования нуклеазой SpCas9 с L96, L272m и L466 гРНК off-target эффекты выявили в двух из 23 предсказанных сайтов L96, в одном из 19 сайтов L272m и в двух из 19 – L466 гРНК (p -value < 0.001).

Что касается L96 гРНК, то Cho и соавт. [31] сообщали о возникновении мутаций с частотой

1.4% в участке гена *CCR2*, который соответствует локусу № 14 в наших данных, что несколько отличается от частоты 0.3%, полученной в наших экспериментах. Эти расхождения могли возникнуть из-за использования разных клеточных культур и методов доставки. Участок № 13, в котором в наших экспериментах обнаружен самый высокий процент мутаций (1.2%), Cho и соавт. не исследовали [31].

Использование нуклеазы SpCas9-HF1, обладающей большей специфичностью, позволило снизить до неопределяемого уровня все off-target эффекты гРНК L272m, L466 и off-target эффект гРНК L96 в локусе 14. При использовании SpCas9-HF1 с гРНК L96 мутации в сайте 13 по-прежнему детектировались, но их частота снизилась с 1.2 до 0.1%.

Таким образом, нами показано, что использование нуклеаз с большей специфичностью позволяет расширить набор безопасных гРНК, направленных на расщепление гена *CCR5*. С другой стороны, тщательный подбор и анализ гРНК позволяет избежать off-target активности и безопасно использовать SpCas9 дикого типа, преимуществом которой является более высокая эффективность.

Результаты проведенных исследований показали, что в разработке генотерапевтических препаратов против ВИЧ, основанных на нокауте гена *CCR5*, могут использоваться нуклеаза SpCas9-HF1 с гРНК L272m, L466, а также нуклеаза AsCas12a с гРНК cL166m, cL290 или cP548, которые имеют самую высокую эффективность и недетектируемую нецелевую активность.

Работа выполнена без внешнего финансирования.

Настоящая статья выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cornu T.I., Mussolino C., Müller M.C., Wehr C., Kern W.V., Cathomen T. (2021) HIV gene therapy: an update. *Hum. Gene Ther.* **32**, 52–65.
- Allers K., Hütter G., Hofmann J., Loddenkemper C., Rieger K., Thiel E., Schneider T. (2011) Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation. *Blood.* **117**(10), 2791–2799.
- Hütter G., Nowak D., Mossner M., Ganepola S., Müssig A., Allers K., Schneider T., Hofmann J., Kücherer C., Blau O., Blau I.W., Hofmann W.K., Thiel E. (2009) Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* **360**(7), 692–698.
- Peterhoff D. (2023) New case of HIV cure: joined forces of haploidentical stem cells and HLA-mismatched cord blood. *Signal Transduct. Target. Ther.* **8**(1), 241.
- Doudna J.A., Charpentier E. (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR/Cas9. *Science.* **346**, 1258096.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* **339**, 819–823.
- Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.S. (2013) Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* **31**, 230–232.
- Kang H., Minder P., Park M.A., Mesquitta W.T., Torbett B.E., Slukvin I.I. (2015) CCR5 disruption in induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 provides selective resistance of immune cells to CCR5-tropic HIV-1 virus. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **4**, e268.
- Nerys-Junior A., Braga-Dias L.P., Pezzuto P., Cotta-de-Almeida V., Tanuri A. (2018) Comparison of the editing patterns and editing efficiencies of TALEN and CRISPR/Cas9 when targeting the human *CCR5* gene. *Genet. Mol. Biol.* **41**, 167–179.
- Cradick T.J., Fine E.J., Antico C.J., Bao G. (2013) CRISPR/Cas9 systems targeting β-globin and *CCR5* genes have substantial off-target activity. *Nucl. Acids Res.* **41**, 9584–9592.
- Fine E.J., Appleton C.M., White D.E., Brown M.T., Deshmukh H., Kemp M.L., Bao G. (2015) Trans-spliced Cas9 allows cleavage of *HBB* and *CCR5* genes in human cells using compact expression cassettes. *Sci. Rep.* **5**, 10777.
- Dabrowska M., Czubak K., Juzwa W., Krzyzosiak W.J., Olejniczak M., Kozłowski P. (2018) qEva-CRISPR: a method for quantitative evaluation of CRISPR/Cas-mediated genome editing in target and off-target sites. *Nucl. Acids Res.* **46**, e101.
- Yu S., Yao Y., Xiao H., Li J., Liu Q., Yang Y., Adah D., Lu J., Zhao S., Qin L., Chen X. (2018) Simultaneous knockout of *CXCR4* and *CCR5* genes in CD4+ T cells via CRISPR/Cas9 confers resistance to both X4- and R5-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection. *Hum. Gene Ther.* **29**, 51–67.
- Liu X., Wang M., Qin Y., Shi X., Cong P., Chen Y., He Z. (2018) Targeted integration in human cells through single crossover mediated by ZFN or CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol.* **18**, 66.
- Xu L., Yang H., Gao Y., Chen Z., Xie L., Liu Y., Liu Y., Wang X., Li H., Lai W., He Y., Yao A., Ma L., Shao Y., Zhang B., Wang C., Chen H., Deng H. (2017) CRISPR/Cas9-mediated CCR5 ablation in human hematopoietic stem/progenitor cells confers HIV-1 resistance in vivo. *Mol. Ther.* **25**, 1782–1789.
- Xu L., Wang J., Liu Y., Xie L., Su B., Mou D., Wang L., Liu T., Wang X., Zhang B., Zhao L., Hu L., Ning H.,

- Zhang Y., Deng K., Liu L., Lu X., Zhang T., Xu J., Li C., Wu H., Deng H., Chen H. (2019) CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **381**(12), 1240–1247.
17. Li C., Guan X., Du T., Jin W., Wu B., Liu Y., Wang P., Hu B., Griffin G.E., Shattock R.J., Hu Q. (2015) Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of *CCR5* using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. *J. Gen. Virol.* **96**, 2381–2393.
 18. Mandal P.K., Ferreira L.M., Collins R., Meissner T.B., Boutwell C.L., Friesen M., Vrbanac V., Garrison B.S., Stortchevoi A., Bryder D., Musunuru K., Brand H., Tager A.M., Allen T.M., Talkowski M.E., Rossi D.J., Cowan C.A. (2014) Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell.* **15**, 643–652.
 19. Ehrke-Schulz E., Schiwon M., Leitner T., Dávid S., Bergmann T., Liu J., Ehrhardt A. (2017) CRISPR/Cas9 delivery with one single adenoviral vector devoid of all viral genes. *Sci. Rep.* **7**, 17113.
 20. Hosseini Rouzbahani N., Kaviani S., Vasei M., Soleimani M., Azadmanesh K., Nicknam M.H. (2019) Generation of CCR5-ablated human induced pluripotent stem cells as a therapeutic approach for immune-mediated diseases. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* **18**, 310–319.
 21. 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., Lee C.M., Park S.H., Wiebking V., Bak R.O., Gomez-Ospina N., Pavel-Dinu M., Sun W., Bao G., Porteus M.H., Behlke M.A. (2018) A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat. Med.* **24**, 1216–1224.
 22. Gomez-Ospina N., Scharenberg S.G., Mostrel N., Bak R.O., Mantri S., Quadros R.M., Gurumurthy C.B., Lee C., Bao G., Suarez C.J., Khan S., Sawamoto K., Tomatsu S., Raj N., Attardi L.D., Aurelian L., Porteus M.H. (2019) Human genome-edited hematopoietic stem cells phenotypically correct mucopolysaccharidosis type I. *Nat. Commun.* **10**, 4045.
 23. Scharenberg S.G., Poletto E., Lucot K.L., Colella P., Sheikali A., Montine T.J., Porteus M.H., Gomez-Ospina N. (2020) Engineering monocyte/macrophage-specific glucocerebrosidase expression in human hematopoietic stem cells using genome editing. *Nat. Commun.* **11**, 3327.
 24. Liu Z., Chen S., Jin X., Wang Q., Yang K., Li C., Xiao Q., Hou P., Liu S., Wu S., Hou W., Xiong Y., Kong C., Zhao X., Wu L., Li C., Sun G., Guo D. (2017) Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR/Cas9 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Cell Biosci.* **7**, 47.
 25. Ye L., Wang J., Beyer A.I., Teque F., Cradick T.J., Qi Z., Chang J.C., Bao G., Muench M.O., Yu J., Levy J.A., Kan Y.W. (2014) Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 9591–9596.
 26. Li X., Bai Y., Cheng X., Kalds P.G.T., Sun B., Wu Y., Lv H., Xu K., Zhang Z. (2018) Efficient SSA-mediated precise genome editing using CRISPR/Cas9. *FEBS J.* **285**, 3362–3375.
 27. Kang X., He W., Huang Y., Yu Q., Chen Y., Gao X., Sun X., Fan Y. (2016) Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J. Assist. Reprod. Genet.* **33**, 581–588.
 28. Qi C., Li D., Jiang X., Jia X., Lu L., Wang Y., Sun J., Shao Y., Wei M. (2018) Inducing CCR5 Δ 32/ Δ 32 homozygotes in the human jurkat CD4+ cell line and primary CD4+ cells by CRISPR/Cas9 genome-editing technology. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **12**, 267–274.
 29. Wang W., Ye C., Liu J., Zhang D., Kimata J.T., Zhou P. (2014) CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. *PLoS One.* **9**, e115987.
 30. Scott T., Urak R., Soemardy C., Morris K.V. (2019) Improved Cas9 activity by specific modifications of the tracrRNA. *Sci. Rep.* **9**, 16104.
 31. Cho S.W., Kim S., Kim Y., Kweon J., Kim H.S., Bae S., Kim J.S. (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* **24**, 132–141.
 32. Gao Z., Herrera-Carrillo E., Berkhout B. (2018) Improvement of the CRISPR-Cpf1 system with ribozyme-processed crRNA. *RNA Biol.* **15**, 1458–1467.
 33. Liu Z., Liang J., Chen S., Wang K., Liu X., Liu B., Xia Y., Guo M., Zhang X., Sun G., Tian G. (2020) Genome editing of CCR5 by AsCas12a renders CD4+ T cells resistance to HIV-1 infection. *Cell Biosci.* **10**, 85.
 34. Ratti V., Nanda S., Eszterhas S.K., Howell A.L., Wallace D.I. (2020) A mathematical model of HIV dynamics treated with a population of gene-edited haematopoietic progenitor cells exhibiting threshold phenomenon. *Math. Med. Biol.* **37**, 212–242.
 35. Casini A., Olivieri M., Petris G., Montagna C., Reginato G., Maule G., Lorenzin F., Prandi D., Romanel A., Demichelis F., Inga A., Cereseto A. (2018) A highly specific SpCas9 variant is identified by *in vivo* screening in yeast. *Nat. Biotechnol.* **36**, 265–271.
 36. Lee J.K., Jeong E., Lee J., Jung M., Shin E., Kim Y.H., Lee K., Jung I., Kim D., Kim S., Kim J.S. (2018) Directed evolution of CRISPR/Cas9 to increase its specificity. *Nat. Commun.* **9**, 3048.
 37. Tycko J., Myer V.E., Hsu P.D. (2016) Methods for optimizing CRISPR/Cas9 genome editing specificity. *Mol. Cell.* **63**, 355–370.
 38. Kulcsár P.I., Tóth A., Tóth E., Nyeste A., Ligeti Z., Welker Z., Welker E. (2020) Blackjack mutations improve the on-target activities of increased fidelity variants of SpCas9 with 5'G-extended sgRNAs. *Nat. Commun.* **11**, 1223.
 39. Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., Joung J.K. (2016) High-fi-

- delity CRISPR/Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. **529**, 490–495.
40. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR/Cas system. *Cell*. **163**, 759–771.
 41. Labun K., Montague T.G., Krause M., Torres Cleuren Y.N., Tjeldnes H., Valen E. (2019) CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucl. Acids Res.* **47**, W171–W174.
 42. Глазкова Д.В., Ветчинова А.С., Богословская Е.В., Жогина Ю.А., Маркелов М.Л., Шипулин Г.А. (2013) Подавление экспрессии гена CCR5-рецептора человека с помощью искусственных микроРНК. *Молекуляр. биология*. **47**, 475–485.
 43. GitHub/lioj/bioinformatics/offTargetPipeline at master. Доступен онлайн: <https://github.com/lioj/bioinformatics/tree/master/offTargetPipeline> (Проверено 07.05.2024).
 44. Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H.W., Listgarten J., Root D.E. (2016) Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR/Cas9. *Nat. Biotechnol.* **34**, 184–191.
 45. 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., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* **31**, 827–832.
 46. Labuhn M., Adams F.F., Ng M., Knoess S., Schambach A., Charpentier E.M., Schwarzer A., Mateo J.L., Klusmann J.H., Heckl D. (2018) Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR/Cas9 applications. *Nucl. Acids Res.* **46**, 1375–1385.
 47. Suzuki K., Tsunekawa Y., Hernandez-Benitez R., Wu J., Zhu J., Kim E.J., Hatanaka F., Yamamoto M., Araoka T., Li Z., Kurita M., Hishida T., Li M., Aizawa E., Guo S., Chen S., Goebel A., Soligalla R.D., Qu J., Jiang T., Fu X., Jafari M., Esteban C.R., Berggren W.T., Lajara J., Nuñez-Delicado E., Guillen P., Campistol J.M., Matsuzaki F., Liu G.H., Magistretti P., Zhang K., Callaway E.M., Zhang K., Belmonte J.C.I. (2016) *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*. **540**, 144–149.
 48. Concordet J.P., Haeussler M. (2018) CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucl. Acids Res.* **46**(W1), W242–W245.

Improving the Efficiency and Safety of Human *CCR5* Gene Editing by Selection of Optimal Guide RNAs for SpCAS9 and CAS12A

© 2025 R. R. Mintaev*, D. V. Glazkova, J. A. Taran, E. V. Bogoslovskaya, G.A. Shipulin

*Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks,
Federal Medical-Biological Agency, Moscow, 119833 Russia*

**e-mail: ramil.mintaev@fbb.msu.ru*

Advances in CRISPR/Cas-mediated genome editing have opened up treatment alternatives for many human diseases, including HIV infection. Knockout of the *CCR5* gene as a potential way to treat HIV infection has long been studied. Here we analyzed guide RNAs for SpCas9 and AsCas12a nucleases targeting *CCR5* gene which had been previously studied and selected the most effective among them. We also designed novel guide RNAs for the same nucleases using bioinformatics resources. We compared the efficiency of target site cleavage for all selected gRNAs using three nucleases: wt SpCas9, SpCas9-HF1-plus, and AsCas12a, as well as their off-target activities. We demonstrated that among the tested guide RNAs two for SpCas9-HF1-plus and three for AsCas12a exhibited high cleavage activity, cutting *CCR5* gene in 60–72% of cells, and had off-target activities below the limit of detection. Thus, these guide RNAs may be candidates for future development of gene therapies against HIV infection.

Keywords: gene therapy, HIV, CCR5, CRISPR/Cas, Cas9, Cas9-HF1, Cas12a, Cpf1