

ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ И СТРУКТУРЫ ПЛЕЧ ГОМОЛОГИИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНТЕГРАЦИИ ДЛИННОГО ТРАНСГЕНА В ОБЛАСТЬ РАЗРЫВА, СОЗДАВАЕМОГО НУКЛЕАЗАМИ SpCas9 ИЛИ AsCpf1

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

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью
Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119121 Россия

*e-mail: taran.julia01@gmail.com

Поступила в редакцию 01.08.2024 г.

После доработки 07.10.2024 г.

Принята к публикации 07.10.2024 г.

Одним из многообещающих новых подходов к лечению ВИЧ-инфекции является CRISPR/Cas-опосредованный нокаут гена рецептора CCR5 с последующей интеграцией антиВИЧ-гена в область разрыва. Нокауту гена CCR5 посвящено множество работ, однако эффективность последующей таргетной интеграции протяженных фрагментов остается недостаточно изученной. Чтобы оценить эффективность этого подхода, мы изучили встраивание кассеты, экспрессирующей ген EGFP, в локус CCR5 с использованием двух разных нуклеаз (SpCas9 и AsCpf1) и различных вариантов донорной ДНК, доставляемой в составе рекомбинантных аденоассоциированных вирусных векторов (gAAV). Для каждой из нуклеаз были сконструированы пять вариантов донорной ДНК, отличающихся длиной плеч гомологии (от 150 до 1000 п.н.) или их структурой. Эффективность интеграции трансгена с плечами гомологии 150 п.н. оказалась самой низкой при использовании обеих нуклеаз и достоверно отличалась от конструкций с более длинными плечами гомологии. Также показано, что наличие в донорной ДНК сайтов разрезания нуклеазы, фланкирующих кассету с плечами гомологии, не влияет на эффективность интеграции трансгена при AAV-доставке. Максимальная эффективность встраивания ($59 \pm 6\%$) достигнута при использовании нуклеазы AsCpf1 и экспрессионной кассеты с плечами гомологии длиной 600 п.н.

Ключевые слова: ВИЧ, CRISPR/Cas, CCR5, гомологичная рекомбинация

DOI: 10.31857/S0026898425020079, **EDN:** GGBDOW

ВВЕДЕНИЕ

С начала эпидемии, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), от заболеваний, ассоциированных с этой инфекцией, в мире умерли более 40 миллионов человек (<https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>). ВИЧ-инфекцию не удается полностью излечить, несмотря на применение высокоактивной антиретровирусной терапии, которая продлевает жизнь пациентов и улучшает ее качество. Современные исследования в области генной терапии открывают новые перспективы в лечении ВИЧ-инфекции. Одной из таких стратегий является внутриклеточная иммунизация – набор подходов к защите клеток от вируса путем интеграции в геном защитных (терапевтических) генов. Наиболее хорошо изучена доставка антиВИЧ-генов с помощью лентивирусных векторов [1–3]. Однако основным недостатком

лентивирусных векторов является их интеграция в случайную область генома [4], что в некоторых случаях может изменить профиль экспрессии генов и привести к озлокачествлению клеток [5].

Прицельно встроить трансген позволяет CRISPR/Cas-опосредованная интеграция гена в место разрыва. Наиболее привлекательным для встраивания антиВИЧ-гена в случае ВИЧ-инфекции является локус гена CCR5. Это обусловлено тем, что, с одной стороны, локус гена CCR5 относится к так называемым “безопасным” областям генома, встраивание трансгена в которые не влияет на экспрессию окружающих генов и не вызывает злокачественной трансформации редактируемых клеток [6]. Известно, что у части европейцев (около 0.1%), гомозиготных по варианту гена

CCR5Δ32, отсутствует функциональный рецептор *CCR5* [7], и носительство данного варианта гена не связано с какими-либо патологиями. С другой стороны, рецептор *CCR5* является корецептором *CCR5*-тропных штаммов ВИЧ, поэтому нокаут гена *CCR5*, вызванный интеграцией в него трансгена, будет предотвращать заражение клеток такими штаммами и обеспечивать дополнительную защиту.

Адаптированная для редактирования генома система CRISPR/Cas работает посредством образования РНП-комплекса, состоящего из нуклеазы и направляющей РНК (гРНК), который связывается с геномной ДНК, комплементарной последовательности гРНК, и вносит в нее двухцепочечный разрыв. После образования двухцепочечного разрыва запускаются клеточные процессы репарации ДНК. Репарация путем гомологичной рекомбинации (Homology Dependent Recombination, HDR), как наиболее точный механизм репарации, может использоваться для интеграции длинных трансгенов в сайт разрезания нуклеазы. Для этого необходимо обеспечить присутствие в клетке донорной ДНК, причем трансген в донорной ДНК должен быть окружен последовательностями, гомологичными последовательностям, фланкирующим разрыв (так называемыми плечами гомологии).

С начала применения системы CRISPR/Cas для генного редактирования было предложено большое число гРНК, направляющих РНП-комплекс на locus *CCR5*, что позволило достичь высокоэффективного разрезания гена *CCR5* как на первичных, так и на перевиваемых клетках [8, 9]. Однако высокоэффективная интеграция длинного трансгена в область разрыва до сих пор остается серьезной проблемой.

Для эффективной интеграции трансгена в место разрыва важно правильно подобрать длину и структуру плеч гомологии. Общей рекомендацией, основанной на изучении малых оцДНК-доноров, является выбор плеч, длина которых составляет 50–100% от длины вставки [10]. При этом показано, что увеличение длины плеч гомологии для длинных трансгенов до 100% от длины вставки может усилить HDR, а увеличение более 100% не влияет на эффективность интеграции или снижает ее [11]. На эффективность интеграции может влиять и тип используемой нуклеазы. Так, в отличие от классической нуклеазы SpCas9, нуклеаза AsCpf1 из *Acidaminococcus* sp. разрезает ДНК, формируя липкие концы, что может усиливать эффективность гомологичной рекомбинации [12].

До сих пор работы по оптимизации дизайна трансгена проводились с использовани-

ем ДНК-плазмид либо линейных фрагментов ДНК [13, 14]. Однако наиболее эффективным инструментом для доставки донорной ДНК на сегодняшний день считаются рекомбинантные аденоассоциированные векторы (гAAV) [15]. В настоящей работе изучена эффективность целевой интеграции длинного трансгена при использовании двух нуклеаз (SpCas9 и AsCpf1) и AAV-доставки трансгена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмиды. Плазида pET-21a_3xNLS_SpCas9_protein_expression, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок SpCas9, получена от Scot Wolfe (Addgene plasmid #114365), плазида pTE4396, содержащая последовательность, кодирующую белок AsCpf1, получена от Ervin Welker (Addgene plasmid #74041). В работе также использованы плазмиды pAAV-RCDJ и pHelper из набора AAV-DJ Packaging System (“Cell Biolabs Inc.”, США), плазида pAAV-GFP Control Vector (Кат. №. AAV-400, “Cell Biolabs Inc.”), плазида pLVX-Puro (Кат. № 632164, “Clontech Lab. Inc.”, США).

Клонирование. Сконструированы 10 векторных плазмид для сборки частиц гAAV, содержащих инвертированные концевые повторы (ITR) AAV, ген флуоресцентного белка EGFP (enhanced green fluorescent protein) под управлением промотора pPGK (murine phosphoglycerate kinase promoter), сигнал терминации транскрипции SV40 PA (Simian virus 40 PolyA terminator) и плечи гомологии. Между EGFP и SV40 PA для усиления экспрессии гена был встроены элемент WPRE (Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element). Каждая из 10 плазмид отличалась длиной плеч гомологии и наличием или отсутствием сайтов разрезания нуклеазы, фланкирующих плечи гомологии.

Плазмиды получали с помощью клонирования GoldenGate. Фрагменты вставок и вектора, необходимые для реакций рестрикции и лигирования, получали с помощью ПЦР, включая в состав праймеров последовательность сайта рестрикции BsaI. Векторный фрагмент с ITR AAV2 на концах получали с помощью амплификации с плазмиды pAAV-GFP Control Vector (Кат. №. AAV-400, “Cell Biolabs Inc.”, США). Фрагмент ДНК, содержащий последовательность промотора PGK, и фрагмент ДНК, содержащий последовательность WPRE, получали, амплифицируя участки плазмиды pLVX-Puro. Фрагмент, содержащий ген *EGFP*, и фрагмент, содержащий сигнал полиаденилирования SV40, получали с помощью амплификации соответствующих участков плазмиды pEGFP-C3 (“Clontech”,

США). Фрагменты, содержащие плечи гомологии, получали, амплифицируя участок геномной ДНК клеточной линии HT1080 (Коллекция культур клеток позвоночных Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Мутации в последовательности РАМ нуклеазы AsCpf1 получали путем введения замены в соответствующий праймер для амплификации правого плеча гомологии. Амплифицированные фрагменты ДНК выделяли с помощью набора DNA Clean & Concentrator-5 (#4004, “Zymo Research”, США). В реакции рестрикции и лигирования смешивали векторный фрагмент и шесть фрагментов, образующих вставку, в молярном соотношении 1 : 3, где 3 – это сумма всех фрагментов. После трансформации бактериальных клеток проводили отбор клонов по размеру вставки.

Плазмиду pET-21a_3xNLS_AsCpf1 получали, встраивая последовательность, кодирующую белок AsCpf1, и вырезанную из плазмиды pTE4396, в плазмиду pET-21a_3xNLS_SpCas9_protein_expression вместо SpCas9 по сайтам рестрикции Sall/AgeI.

Плазмидную ДНК нарабатывали в клетках *E. coli* и выделяли с помощью Plasmid Mini Kit или Plasmid Maxi Kit (оба “QIAGEN”, США) в стерильных условиях. Корректность сборки конструкций подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

Культуры клеток. Клеточная линия HT1080-CCR5-EGFP со стабильной экспрессией гена *CCR5*, слитого в одну рамку считывания с геном *EGFP*, получена ранее [16]. Клетки HT1080-CCR5-EGFP и HT1080 (Коллекция культур клеток позвоночных Института цитологии РАН) культивировали в ростовой среде MEM (“Gibco”, США), дополненной незаменимыми аминокислотами MEM (“Gibco”), буфером NEPEs (“Gibco”) и 10%-ной фетальной сывороткой крупного рогатого скота (FBS, “Gibco”) (полная ростовая среда MEM) при 37°C и 5% CO₂.

Получение и очистка гAAV. Частицы гAAV получали путем совместной трансфекции трех плазмид (pAAV-Helper, pAAV-RC-DJ (AAV-DJ Packaging System, “Cell Biolabs”, США) и векторной плазмиды) в соотношении 1:1:1 [17]. Клетки HEK293FT высевали в культуральные флаконы площадью 175 см² (“BIOLOGIX”, Китай), культивировали в течение суток до плотности 80%, затем трансфицировали смесью плазмид, суммарно в количестве 21 мкг, с помощью трансфекционного реагента PEI-MAX (“Polysciences”, США). Через 24 ч проводили замену среды на Optimem (“Gibco”). Спустя 48 ч клетки лизировали, используя четыре цикла замораживания/

оттаивания. Клеточные лизаты инкубировали с нуклеазой Benzonase (“Novagen”, “Merck”, США) и осветляли центрифугированием. Частицы гAAV осаждали из лизатов с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ8000, “PanReac AppliChem”, Испания) и очищали методом разделения фаз с помощью реагентов ПЭГ/хлороформ и ПЭГ/(NH₄)₂SO₄ [18]. Замену буфера на PBS с добавлением 0.001% Pluronic-F68 (“Gibco”) и концентрирование гAAV проводили на центрифужных фильтрах Amicon Ultra-15, 100 кДа (“Millipore”, “Sigma-Aldrich”, США).

Измерение инфекционного титра AAV-векторов. Клетки HT1080 рассевали с плотностью 1×10^5 клеток на лунку в 24-луночные планшеты в ростовой среде MEM (“Gibco”) с 10% сывороткой (“Gibco”) и спустя 3 ч трансдуцировали суспензиями гAAV-частиц, полученными в результате серии разведений гAAV в PBS. На следующий день ростовую среду заменяли на свежую. Титр вирусов определяли через 48 ч после трансдукции по процентному содержанию флуоресцирующих EGFP+ клеток в популяции, используя проточный цитометр Novo-Cyte Quanteon (“Agilent Technologies”, США). Для определения инфекционного титра использовали образцы, в которых процент EGFP-положительных клеток составлял от 2 до 35%. Титр (число инфекционных частиц/мл) рассчитывали по формуле: $(A \times 10^5 \times D)/V$, где A – доля EGFP+ клеток, 10^5 – общее число клеток в лунке, D – коэффициент разведения исходного образца вектора, V – объем суспензии вектора, добавленный в лунку. Значения титра, полученные при использовании разных разведений вируса, усредняли. В результатах приводили средние значения титра гAAV со стандартными отклонениями.

Получение гРНК. Нарработку гРНК L96 (спейсер 5'-cctgcctccgctctactcac-3') для SpCas9 проводили с помощью набора EnGen sgRNA Synthesis Kit (“NEB”, США) и олигонуклеотида, содержащего последовательность гРНК (синтезирован в компании “Genterra”, Россия), согласно инструкции производителя. Синтезированную гРНК очищали с помощью набора Monarch RNA Cleanup Kit (“NEB”) согласно инструкции производителя. Синтез гРНК cL652 (спейсер 5'-ggattcccgagtagcagatgacc-3') для AsCpf1 заказывали в компании “Genterra”.

Нарботка и очистка белков. Плазмиды pET-21a_3xNLS_SpCas9 и pET-21a_3xNLS_AsCpf1, содержащие последовательности, кодирующие нуклеазы SpCas9 и AsCpf1, в векторе для бактериальной экспрессии, трансформировали в клетки *E. coli*, штамм Rosetta (DE3). Бактерии наращивали при 30°C в питательной среде LB с ампициллином, хлорамфениколом, 0.5% саха-

розы, 0.5% глицерина, $1 \times \text{NPS}$, 1 mM MgCl_2 до оптической плотности 1.3 и добавляли изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (“Thermo Fisher Scientific”) до конечной концентрации 0.1 mM. Затем наращивали бактериальную биомассу в течение ночи при температуре 18°C . Клетки собирали и лизировали на ультразвуковом дезинтеграторе (“Qsonica”, США) в ледяной бане (22 кГц). Лизат осветляли центрифугированием, затем добавляли 5%-ный раствор полиэтиленимина для осаждения ДНК. Первичную очистку белков проводили методом аффинной хроматографии на Ni-активированной хелатирующей сефарозе (“GE Healthcare”, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Финальную очистку проводили с помощью ионно-обменной хроматографии на колонке с сорбентом SP-сефароза (“Техносорбент”, Россия). Белки элюировали 50 mM Na-фосфатным буфером pH 7.0, содержащим 0.01% Тритона X-100, 2 mM ДТТ и 0.6 mM NaCl, концентрацию белка в полученной фракции измеряли на спектрофотометре NanoPhotometer NP80 (“Implen”) при длине волны 280 нм.

Электропорация РНП и трансдукция AAV. Для получения РНП-комплексов нуклеазы SpCas9 и AsCpf1 смешивали с соответствующими гРНК в молярном соотношении 1 : 2 в буфере R из набора Neon™ Transfection System 10 μL Kit (“Invitrogen”, США). Через 20 мин проводили электропорацию 1×10^5 клеток линий HT1080 или HT1080-CCR5-EGFP РНП-комплексами. Электропорацию проводили по протоколу Electroporation of EnGen® Spy SpCas9 NLS RNP (ribonucleoprotein) into adherent cells using the Neon® Electroporation System с помощью Neon Transfection System (“Invitrogen”) согласно инструкции производителя, используя следующие условия: 1400 В, 20 мс, 1 пульс. После электропорации клетки рассеивали в 24-луночные планшеты, содержащие 0.5 мл полной ростовой среды MEM (“Gibco”).

В экспериментах по целевой интеграции трансгена после электропорации проводили трансдукцию клеток HT1080 частицами gAAV. Через 15 мин в лунки 24-луночного планшета, содержащие подвергнутые электропорации и контрольные клетки, вносили частицы gAAV из расчета 100 инфекционных частиц на клетку.

Проточная цитофлуориметрия. Клетки собирали с помощью трипсина, промывали в фосфатно-солевом буфере и с помощью проточного цитофлуориметра NovoCyte Quanteon (“Agilent Technologies”) определяли содержание (%) EGFP+ клеток. Результаты измерений обрабатывали с помощью программного обеспечения NovoExpress 1.4.1 (“Agilent Technologies”).

Стратегия гейтирования: на первом этапе анализа выделяли популяцию одиночных клеток на диаграмме FSC-A/FSC-H, исключая дедбрис. Затем выделяли популяцию жизнеспособных клеток по параметрам прямого и бокового светорассеяния (на диаграмме SSC-H/FSC-H). В популяции жизнеспособных клеток определяли процент EGFP-положительных (EGFP+) или отрицательных (EGFP-) клеток, используя гистограмму распределения клеток по интенсивности свечения на канале FITC-A.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием Microsoft EXCEL (Microsoft) и GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США). Данные представляли как среднее арифметическое величин, полученных не менее чем в трех независимых экспериментах, и стандартное отклонение. Соответствие нормальному распределению проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Расчеты средних значений и стандартных отклонений, а также создание графических рисунков проводили в Graphpad Prism 9 и PowerPoint (Microsoft). Статистическую значимость различий оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), после которого проводили тест Тьюки для парных межгрупповых сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эффективность нокаута гена CCR5

Для таргетной интеграции антиВИЧ-гена в первую очередь необходимо добиться высокоэффективного разрезания целевого сайта нуклеазой и образования двухцепочечного разрыва в локусе CCR5, что в большой степени зависит от спейсера гРНК. Ранее мы изучали эффективность нокаута гена CCR5 с использованием SpCas9 и восьми разных гРНК для этой нуклеазы, а также AsCpf1 и шести соответствующих ей гРНК [19]. Для каждой нуклеазы были выбраны по одному спейсеру гРНК с высокой эффективностью нокаута: L96 (cctgcctccgctctactcac) для нуклеазы SpCas9 и cL652 (ggattcccagtagcagatgacc) для AsCpf1.

Эффективность нокаута гена CCR5 оценивали на клеточной линии HT1080-CCR5-EGFP, содержащей встроенный химерный ген CCR5 человека, сшитый с репортерным геном EGFP (CCR5-EGFP) [16]. Нуклеазы с гРНК, направленными против CCR5, приводят к нокауту как эндогенного CCR5, так и экзогенного химерного гена CCR5-EGFP, что легко определить по исчезновению флуоресценции в клетках HT1080-CCR5-EGFP. Таким образом, об

эффективности нокаута можно судить по доле EGFP-отрицательных (EGFP-) клеток, образующихся после воздействия нуклеазой.

Клетки HT1080-CCR5-EGFP электропорировали РНП-комплексами AsCpf1/cL652 и SpCas9/L96. Через 7 дней после электропорации эффективность нокаута оценивали по проценту EGFP-клеток в клеточной культуре (рис. 1а). Эффективность нокаута гена *CCR5-EGFP* составила 76.6% для нуклеазы AsCpf1

и 87.8% для нуклеазы SpCas9 (рис. 1б). Достоверных различий в эффективности разрезания двумя системами не выявлено.

Конструирование донорной ДНК

Одной из задач работы было изучение влияния длины плеч гомологии, фланкирующих трансген, на эффективность интеграции донорной ДНК в область разрыва. Были получе-

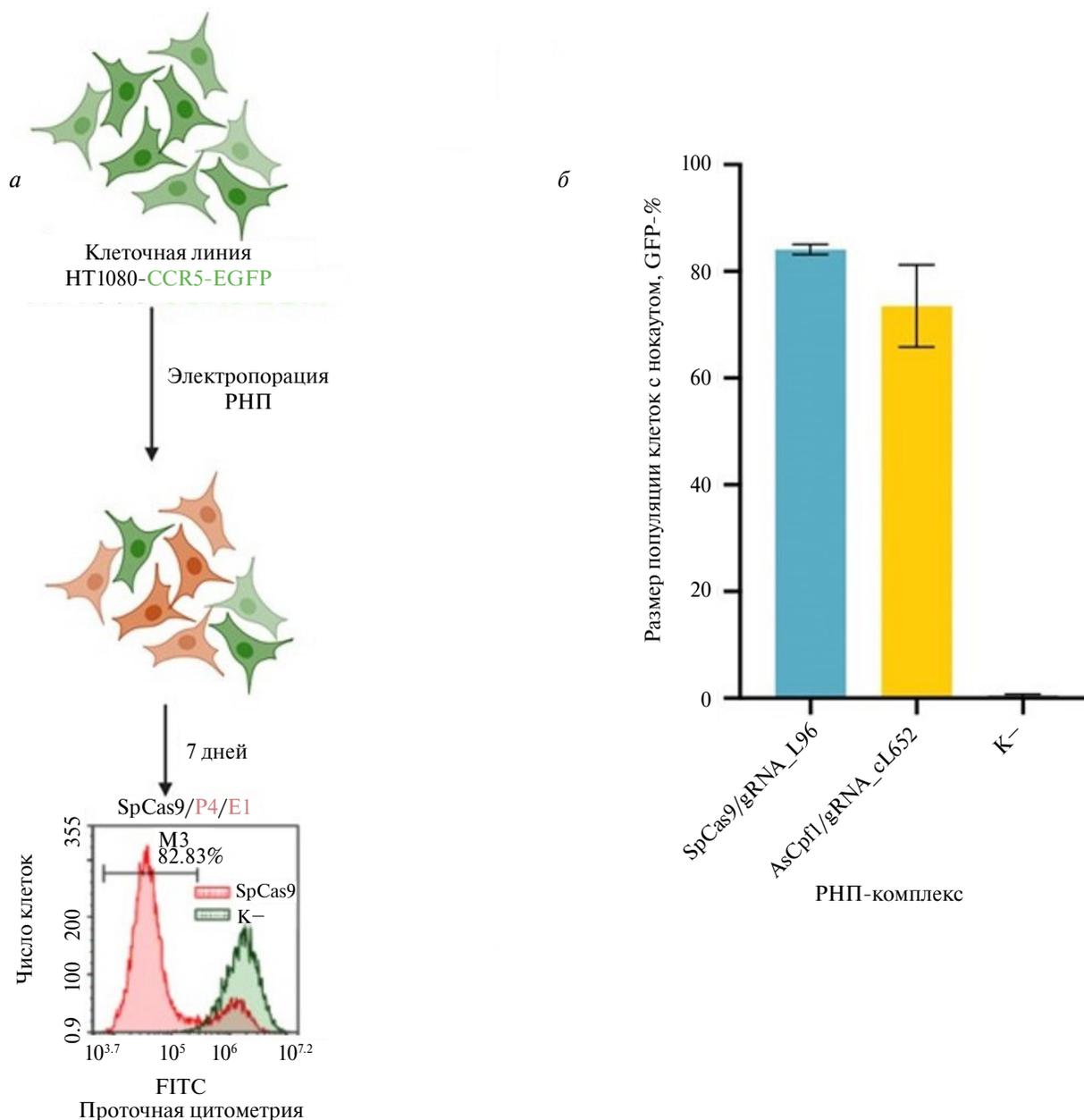


Рис. 1. Нокаут гена *CCR5-EGFP* в клеточной линии HT1080-CCR5-EGFP. *а* – Схема эксперимента по оценке эффективности нокаута РНП-комплексами SpCas9/L96 или AsCpf1/cL652. *б* – Эффективность нокаута гена *CCR5-EGFP* РНП-комплексами SpCas9/L96 или AsCpf1/cL652 (по четыре повтора для каждого РНП-комплекса). Показаны средние значения и стандартные отклонения. В качестве отрицательного контроля (K-) использовали клетки, не подвергнутые электропорации.

ны восемь конструкций: четыре для гРНК L96 (SpCas9) (плечи 150, 600, 800, 1000 п.н.) и четыре для гРНК L652 (AsCpf1) (плечи 150, 600, 800, 1000 п.н.) (конструкции CRISPR_HA150–CRISPR_HA1000, рис. 2а). В качестве трансгена использовали ген *EGFP*. В донорную ДНК вошли также регуляторные элементы (промотор PGK, терминатор транскрипции SV40-polyA, элемент WPRE), общая длина интегрируемой последовательности составила 2126 п.н. (рис. 2б). По краям плеч гомологии расположены сайты разрезания соответствующими нуклеазами (сайты CRISPR), наличие которых должно приводить к отрезанию участков донорной ДНК, не участвующих в гомологичной рекомбинации, что может увеличивать эффективность HDR [14]. Чтобы оценить вклад этих сайтов CRISPR в эффективность интеграции трансгена, получили дополнительные

конструкции, не содержащие сайты CRISPR (HA1000), с плечами гомологии длиной 1000 п.н для SpCas9 и AsCpf1 (рис. 2а).

Особенность нуклеазы AsCpf1 состоит в том, что она вносит разрыв на расстоянии 18 нуклеотидов от последовательности PAM (Protospacer Adjacent Motif, примыкающий к протоспейсеру мотив). Поэтому последовательность, которая может расщепляться нуклеазой AsCpf1 (PAM+большая часть протоспейсера), присутствует не только в геномной, но и в донорной ДНК, а именно в правом плече гомологии, в области, прилегающей к трансгену (рис. 2в). Чтобы предотвратить разрезание донорной ДНК, в последовательности PAM в правом плече гомологии вносили однобуквенную замену (t на a), меняя TTTA на ATTA во всех конструкциях для AsCpf1.

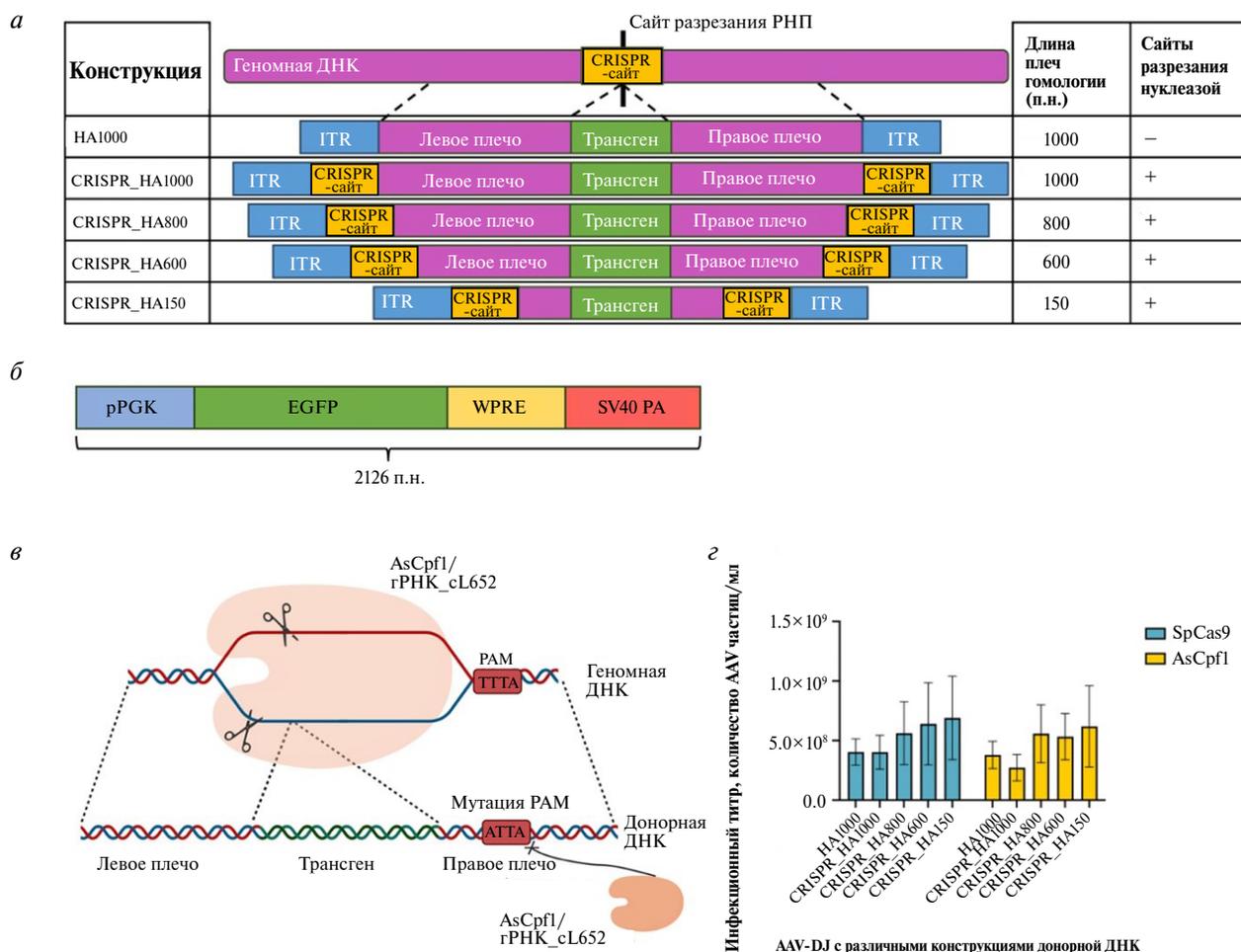


Рис. 2. Характеристики AAV-векторов, кодирующих донорную ДНК. *а* – Схема гAAV-векторов. CRISPR-сайт – сайт разрезания РНП, ITR – инвертированные концевые повторы, интегрируемой в целевую область. *EGFP* – ген зеленого флуоресцентного белка, pPGK – промотор, WPRE – посттранскрипционный регуляторный элемент, SV40 PA – сигнал терминации транскрипции. *б* – Структура последовательности, интегрируемой в целевую область. *EGFP* – ген зеленого флуоресцентного белка, pPGK – промотор, WPRE – посттранскрипционный регуляторный элемент, SV40 PA – сигнал терминации транскрипции. *в* – Схема разрезания геномной ДНК нуклеазой AsCpf1 и встраивания донорной ДНК с мутацией PAM. *г* – Инфекционный титр гAAV-векторов. Представлены средние значения концентраций гAAV и стандартные отклонения.

Замена разрушала РАМ и предотвращала разрезание донорной ДНК.

Используя полученные конструкции, наработали 10 гAAV, несущих трансген *EGFP* с соответствующими плечами гомологии, и измерили их инфекционный титр. (рис. 2з). Титр гAAV находился в диапазоне от 3×10^8 до 7×10^8 инфекционных гAAV-частиц/мл. Мы не обнаружили статистически значимых отличий в величине титра между различными конструкциями, однако при уменьшении длины вектора (за счет меньшей длины плеч гомологии) наблюдалась тенденция к увеличению титра. Так, титр гAAV с плечами 150 п.н. оказался в 1.5–2 раза выше, чем титр гAAV с плечами длиной 1000 п.н.

Эффективность интеграции трансгена при использовании различных плеч гомологии

Эффективность интеграции трансгена *EGFP* сравнивали с помощью следующего эксперимента: клетки HT1080 электропорировали РНП-комплексом SpCas9/L96 или AsCpf1/cL652, спустя 15 мин трансдуцировали различными гAAV (при MOI равном 100), содержащими трансген *EGFP* и плечи гомологии к областям, фланкирующим соответствующий сайт разрезания (рис. 3а).

Для контроля эффективности трансдукции гAAV с разными плечами добавляли к клеткам без предварительной электропорации

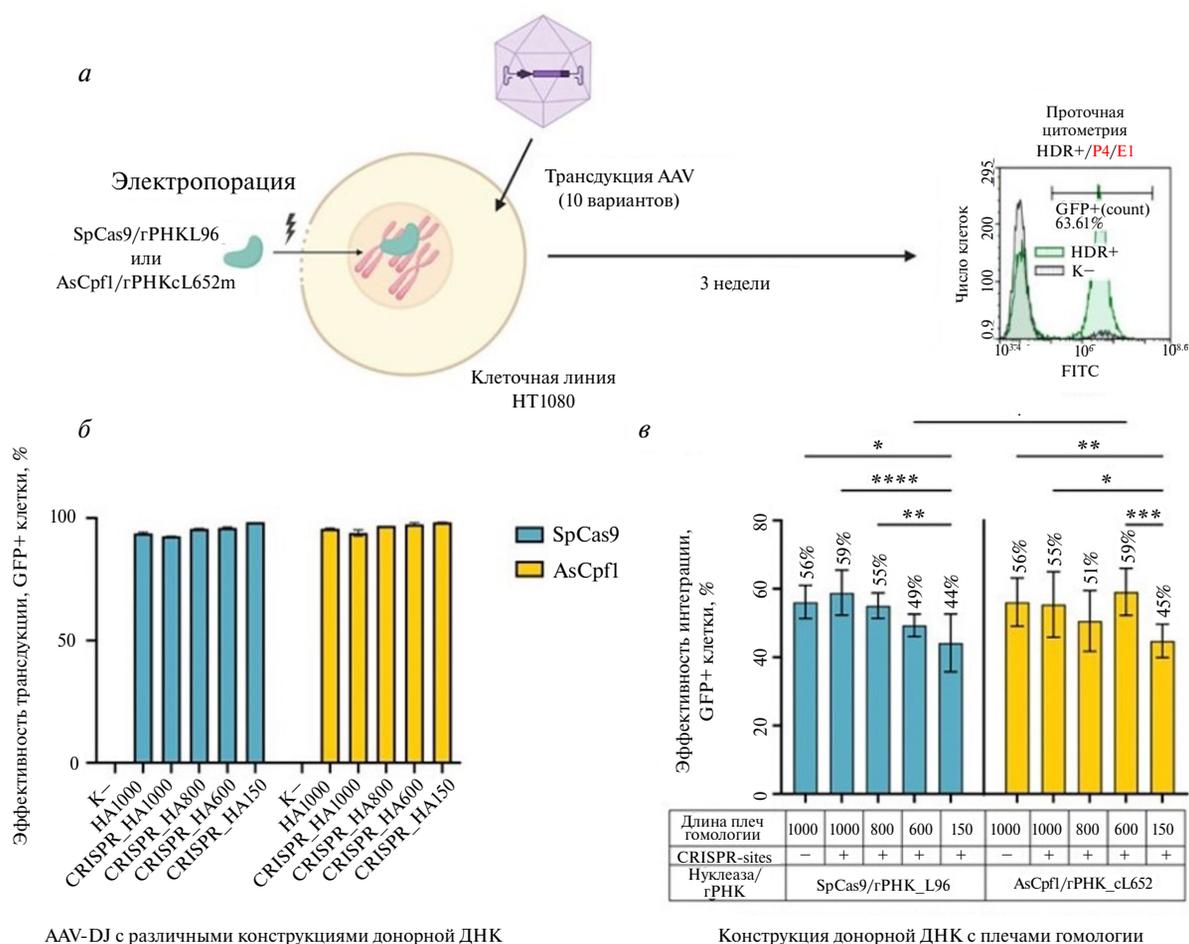


Рис. 3. Оценка эффективности интеграции трансгена *EGFP*. *а* – Эффективность интеграции при электропорации клеток HT1080 РНП-комплексами SpCas9/L96 или AsCpf1/cL652 с последующей трансдукцией одним из 10 гAAV. *б* – Эффективность трансдукции, вычисляемая по доле популяции EGFP+ клеток через 48 ч после трансдукции гAAV без предварительной электропорации. Показаны средние арифметические значения и стандартное отклонение. “К–” – нетрансдуцированные клетки HT1080. *в* – Частота интеграции трансгена *EGFP* после электропорации клеток РНП SpCas9/L96 или AsCpf1/cL652 и трансдукции гAAV с донорной ДНК. Характеристики донорной ДНК приведены в таблице под диаграммой: в строке Длина плеч гомологии указан размер одного плеча гомологии, наличие сайтов CRISPR обозначено знаком “+”. Приведены средние значения и стандартные отклонения. Статистическую значимость различий оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), после которого проводили тест Тьюки для парных сравнений между группами. Значимость различий между группами: **p*-value 0.01 < 0.05, ***p*-value 0.001 < 0.01, ****p*-value 0.0001 < 0.001, *****p*-value < 0.0001.

РНП-комплексом и измеряли долю (%) EGFP+ клеток через 48 ч. Эффективность трансдукции всеми gAAV оказалась одинаковой и составила более 98% (рис. 3б).

Эффективность встраивания донорной ДНК оценивали по доле популяции EGFP-положительных клеток спустя 3 недели после электропорации клеток HT1080 и трансдукции AAV. Такой интервал требовался для элиминации из клеточной культуры клеток, неинтегрированных gAAV. Об элиминации неинтегрированного вектора свидетельствовал тот факт, что через 3 недели процент EGFP+ клеток в контрольных образцах (клетки, трансдуцированные gAAV, без обработки нуклеазой) опускался до 3% и переставал снижаться (данные не представлены). Эффективность интеграции трансгена *EGFP* в экспериментальных образцах вычисляли, снижая содержание EGFP+ клеток на 3%. Результаты трех независимых экспериментов по изучению эффективности встраивания трансгена представлены на рис. 3в.

Присутствие сайтов разрезания нуклеаз в конструкции с плечами 1000 п.н. не влияло на эффективность встраивания матрицы при использовании SpCas9 (56 ± 4 против $58 \pm 6\%$) и AsCpf1 (56 ± 7 против $55 \pm 9\%$).

В присутствии сайтов CRISPR наблюдалась тенденция к снижению эффективности встраивания при уменьшении длины плеч гомологии для SpCas9: при уменьшении длины плеч гомологии с 1000 до 150 п.н. эффективность интеграции постепенно падает с 59 до 44%. Эффективность встраивания конструкций с короткими плечами (150 п.н.) оказалась самой низкой как для SpCas9 ($44 \pm 8\%$), так и для AsCpf1 ($44 \pm 4\%$) и значимо отличалась от конструкций с плечами 1000 и 800 п.н. в случае SpCas9 или конструкций 1000 и 600 п.н. для AsCpf1. Отличия в эффективности HDR при использовании плеч гомологии с длинами 1000, 800 и 600 п.н. оказались статистически незначимыми в случае как РНП AsCpf1/cL652, так и РНП SpCas9/cL652. Наибольшим процент интеграции был при использовании РНП AsCpf1/cL652 и донорной ДНК с плечами гомологии длиной 600 п.н. ($59 \pm 6\%$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Возможность осуществлять безопасный нокаут гена *CCR5* с помощью таргетного разрезания геномной ДНК нуклеазами системы CRISPR/Cas и интеграции в разрыв терапевтического гена, кодирующего противовирусный фактор, открывает новые перспективы в терапии ВИЧ-инфекции. Наиболее эффективным методом доставки длинного трансгена для последующего встраивания в место разрыва путем

гомологичной рекомбинации считается доставка с помощью gAAV-векторов [20]. Однако до сих пор нет данных об оптимальной длине и структуре плеч гомологии, которые должны входить в состав такого вектора. Кроме того, в большей части работ, посвященных целевой интеграции трансгена, использовали нуклеазу SpCas9, которая формирует тупые концы при образовании двухцепочечного разрыва в ДНК [21]. Однако известны и другие нуклеазы, в частности AsCpf1, более специфичная, чем SpCas9 и формирующая выступающие липкие концы длиной 4–5 нуклеотидов, что может увеличивать эффективность гомологичной рекомбинации [22].

В настоящем исследовании мы сравнили эффективность нокаута и интеграции трансгена при использовании двух нуклеаз. Для нуклеазы SpCas9 была выбрана гРНК L96, для AsCpf1 – гРНК cL652, поскольку ранее нами была показана высокая эффективность нокаута *CCR5* с использованием этих нуклеаз: 72 и 58% соответственно [19]. В настоящем исследовании эффективность нокаута гена *CCR5* в клетках HT1080-CCR5-GFP, получаемая при электропорации РНП-комплексов, оказалась выше: 87% при использовании SpCas9 и 76% – AsCpf1. Повышение эффективности нокаута с участием обеих нуклеаз, скорее всего, связано с использованием для их доставки электропорации клеток РНП-комплексами вместо трансфекции плазмидами, кодирующими нуклеазу и гРНК, поскольку остальные условия (клеточная линия и способ детекции) не отличались.

В нашей работе изучены gAAV-конструкции с плечами длиной от 150 до 1000 п.н. Была выбрана минимальная длина 150 п.н., поскольку использование плечей менее 150 п.н. приводит к значительному увеличению процента встраиваний по пути негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ) [11]. Максимальный размер 1000 п.н. определялся ограниченной емкостью gAAV-вектора, длина трансгена с более длинными плечами превышала вместимость gAAV.

Эффективность интеграции конструкций с плечами гомологии 150 п.н. и в случае SpCas9, и в случае AsCpf1 оказалась ниже, чем конструкций с более длинными плечами. Нами не обнаружены значимые отличия в эффективности интеграции конструкций с плечами 600, 800, 1000 п.н., хотя в случае SpCas9 наблюдалась тенденция к увеличению эффективности интеграции при увеличении длины плеч гомологии. Единственное упоминание о сравнении эффективности gAAV с двумя вариантами плечей (400 и 1000 п.н.) для целевого встраивания длинного трансгена нам удалось найти в работе Hung и соавт. [23]. В этой работе эффективность ин-

теграции изученных конструкций не отличалась. Наши данные можно также сравнить с результатами исследований, где в качестве донорной ДНК использовали плазмидные ДНК. В целом, в таких работах получены схожие результаты. Так, увеличение эффективности наблюдали при повышении длины плеч до 400 п.н., далее частота встраивания не увеличивалась [24]. Эффективность интеграции увеличивалась также при повышении длины плеч от 350 до 600 п.н. и оставалась на одном уровне при плечах от 600 до 1450 п.н. [27]. В обеих этих работах встраивали короткие последовательности ДНК (до 100 п.н.). Показано также, что при встраивании длинного трансгена длина плеч, при достижении которой эффективность выходит на плато, зависит от локуса встраивания и наличия в донорной ДНК сайтов нуклеазы SpCas9 [11]. В то же время, тестирование конструкций с плечами от 100 до 400 п.н. не выявило различий в эффективности встраивания кассеты длиной 1400 п.н. [26].

Показано также, что наличие в донорной ДНК сайтов для CRISPR/Cas-нуклеаз, позволяющих вырезать трансген с плечами гомологии, увеличивает эффективность интеграции при доставке матрицы в виде плазмиды или линейной дцДНК [11, 14]. Так, добавление сайтов CRISPR в плазмиды с донорной ДНК увеличивало эффективность интеграции в 2–5 или в 2–36 раз [11, 27] соответственно.

Однако в отличие от этих данных, в нашей работе наличие сайтов CRISPR/Cas в донорной ДНК не влияло на эффективность SpCas9- и AsCpf1-опосредованной интеграции трансгена. Скорее всего, это связано с использованием нами AAV в качестве носителя донорной ДНК и одновременном проведении электропорации и трансдукции. Дело в том, что наибольшая активность нуклеазы наблюдается через 0–12 ч после электропорации РНП-комплекса [28], но в это время геном гAAV еще представлен оцДНК и не может подвергаться расщеплению нуклеазами. Репликация генома гAAV, т.е. образование дцДНК, начинается через 12 ч после трансдукции [29]. К этому времени активность нуклеазы значительно снижается [28]. Таким образом, основной вклад в интеграцию трансгена вносит, по-видимому, гомологичная рекомбинация с использованием одноцепочечной матрицы, входящей в состав гAAV-вектора.

Нами впервые изучена эффективность интеграции при использовании нуклеазы AsCpf1 и гAAV-вектора, доставляющего донорную ДНК с разными по длине и структуре плечами гомологии. Несмотря на то, что эффективность разрезания нуклеазой AsCpf1 была несколько ниже, чем нуклеазой SpCas9 (76 против 87%), эффективность интеграции при использо-

вании AsCpf1 оказалась не меньше, а в ряде случаев выше, чем у SpCas9. В частности, наибольшая эффективность интеграции трансгена при использовании AsCpf1 наблюдалась в случае плеч гомологии длиной 600 п.н., что выше, чем при использовании SpCas9 с плечами гомологии той же длины (рис. 3в). Это может быть связано с тем, что AsCpf1 в ходе разреза геномной ДНК оставляет липкие концы с перекрытием 4–5 п.н. [30]. Наличие липких концов может препятствовать репарации по механизму NHEJ, который требует тупых концов для их сшивания, и таким образом формирует благоприятные условия для HDR. Также расположение места разрыва вдали от РАМ позволяет нуклеазе повторно генерировать разрыв в ДНК даже после некорректного сшивания концов с помощью NHEJ до тех пор, пока не произойдет интеграция донорной ДНК, в которой отсутствует сайт разрезания. Благодаря этому вероятность интеграции увеличивается [12, 31].

Таким образом, нами показано, что эффективность таргетной интеграции длинного трансгена с помощью РНП с SpCas9 и гAAV непрерывно возрастает при увеличении длины плеч гомологии со 150 до 1000 п.н. В случае AsCpf1 и того же способа доставки (электропорация РНП и трансдукция гAAV) максимальный процент клеток с трансгеном наблюдается при длине плеч 600 п.н, дальнейшее их увеличение не влияет на эффективность интеграции. Поэтому использование AsCpf1 позволяет снизить требование к длине плеч гомологии и увеличить длину доставляемого трансгена без снижения эффективности встраивания.

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета института. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mautino M.R. (2002) Lentiviral vectors for gene therapy of HIV-1 infection. *Curr. Gene Ther.* **2**, 23–43.
2. Orlova O.V., Glazkova D.V., Mintaev R.R., Tsyganova G.M., Urusov F.A., Shipulin G.A., Bogoslovskaya E.V. (2023) Comparative evaluation of the activity of various lentiviral vectors containing three anti-HIV genes. *Microorganisms.* **11**, 1053.

3. Chang L.-J., Liu X., He J. (2005) Lentiviral siRNAs targeting multiple highly conserved RNA sequences of human immunodeficiency virus type 1. *Gene Ther.* **12**, 1133–1144.
4. Milone M.C., O'Doherty U. (2018) Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*. **32**, 1529–1541.
5. Naeem M., Majeed S., Hoque M.Z., Ahmad I. (2020) Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-mediated genome editing. *Cells*. **9**, 1608.
6. Papapetrou E.P., Schambach A. (2016) Gene insertion into genomic safe harbors for human gene therapy. *Mol. Ther.* **24**, 678–684.
7. Lucotte G. (2002) Frequencies of 32 base pair deletion of the (Delta 32) allele of the CCR5 HIV-1 co-receptor gene in Caucasians: a comparative analysis. *Infect. Genet. Evol.* **1**, 201–205.
8. Karuppusamy K.V., Demosthenes J.P., Venkatesan V., Christopher A.C., Babu P., Azhagiri M.K., Jacob A., Ramalingam V.V., Rangaraj S., Murugesan M.K., Marepally S.K., Varghese G.M., Srivastava A., Kannangai R., Thangavel S. (2022) The CCR5 gene edited CD34+CD90+ hematopoietic stem cell population serves as an optimal graft source for HIV gene therapy. *Front. Immunol.* **13**, 792684.
9. 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.
10. Liu M., Rehman S., Tang X., Gu K., Fan Q., Chen D., Ma W. (2019) Methodologies for improving HDR efficiency. *Front. Genet.* **9**, 691. doi: 10.3389/fgene.2018.00691
11. Zhang J.-P., Li X.L., Li G.H., Chen W., Arakaki C., Botimer G.D., Baylink D., Zhang L., Wen W., Fu Y.W., Xu J., Chun N., Yuan W., Cheng T., Zhang X.B. (2017) Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biol.* **18**, 35.
12. Tóth E., Weinhardt N., Bencsura P., Huszár K., Kulcsár P.I., Tálás A., Fodor E., Welker E. (2016) Cpf1 nucleases demonstrate robust activity to induce DNA modification by exploiting homology directed repair pathways in mammalian cells. *Biol. Direct.* **11**, 46.
13. Irion U., Krauss J., Nüsslein-Volhard C. (2014) Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. *Development (Cambridge, England)*. **141**, 4827–4830.
14. Yao X., Zhang M., Wang X., Ying W., Hu X., Dai P., Meng F., Shi L., Sun Y., Yao N., Zhong W., Li Y., Wu K., Li W., Chen Z.J., Yang H. (2018) Tild-CRISPR allows for efficient and precise gene knockin in mouse and human cells. *Dev. Cell.* **45**, 526–536.e5.
15. Bak R.O., Porteus M.H. (2017) CRISPR-mediated integration of large gene cassettes using AAV donor vectors. *Cell Rep.* **20**, 750–756.
16. 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**(3), 475–485.
17. Kimura T., Ferran B., Tsukahara Y., Shang Q., Desai S., Fedoce A., Pimentel D.R., Luptak I., Adachi T., Ido Y., Matsui R., Bachschmid M.M. (2019) Production of adeno-associated virus vectors for *in vitro* and *in vivo* applications. *Sci. Rep.* **9**, 13601.
18. Guo P., El-Gohary Y., Prasad K., Shiota C., Xiao X., Wiersch J., Paredes J., Tulachan S., Gittes G.K. (2012) Rapid and simplified purification of recombinant adeno-associated virus. *J. Virol. Methods.* **183**, 139–146.
19. Минтаев Р.Р., Глазкова Д.В., Таран Ю.А., Богословская Е.В., Шипулин Г.А. (2025) Повышение эффективности и безопасности редактирования гена CCR5 человека путем подбора оптимальных направляющих РНК Cas9 и Cas12a. *Молекуляр. биология.* **59**(2), XX-XX.
20. Gutierrez-Guerrero A., Abrey Recalde M.J., Mangeot P.E., Costa C., Bernadin O., Périán S., Fusil F., Froment G., Martinez-Turtos A., Krug A., Martin F., Benabdellah K., Ricci E.P., Giovannozzi S., Gijbsers R., Ayuso E., Cosset F.L., Verhoeven E. (2021) Baboon envelope pseudotyped “Nanoblades” carrying Cas9/gRNA complexes allow efficient genome editing in human T, B, and CD34+ cells and knock-in of AAV6-encoded donor DNA in CD34+ cells. *Front. Genome Editing.* **3**, 604371.
21. Safari F., Zare K., Negahdaripour M., Barekati-Mowahed M., Ghasemi Y. (2019) CRISPR Cpf1 proteins: structure, function and implications for genome editing. *Cell Biosci.* **9**, 36.
22. Maslennikova A., Mazurov D. (2022) Application of CRISPR/Cas genomic editing tools for HIV therapy: toward precise modifications and multilevel protection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 880030. doi.org: 10.3389/fcimb.2022.880030.
23. Hung K.L., Meitlis I., Hale M., Chen C.Y., Singh S., Jackson S.W., Miao C.H., Khan I.F., Rawlings D.J., James R.G. (2018) Engineering protein-secreting plasma cells by homology-directed repair in primary human B cells. *J. Am. Soc. Gene Ther.* **26**, 456–467.
24. Hendel A., Kildebeck E.J., Fine E.J., Clark J., Punjya N., Sebastiano V., Bao G., Porteus M.H. (2014) Quantifying genome editing outcomes at endogenous loci using SMRT sequencing. *Cell Rep.* **7**, 293–305.
25. Chu V.T., Weber T., Wefers B., Wurst W., Sander S., Rajewsky K., Kühn R. (2015) Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **33**, 543–548.
26. Odé Z., Condori J., Peterson N., Zhou S., Krenciute G. (2020) CRISPR-mediated non-viral site-specific gene integration and expression in T cells: protocol and application for T-cell therapy. *Cancers.* **12**, 1704.

27. Shin S.W., Lee J.S. (2020) Optimized CRISPR/Cas9 strategy for homology-directed multiple targeted integration of transgenes in CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **117**, 1895–1903.
28. Kim S., Kim D., Cho S.W., Kim J., Kim J. S. (2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* **24**, 1012–1019.
29. Asaad W., Volos P., Maksimov D., Khavina E., Deviatkin A., Mityaeva O., Volchkov P. (2023) AAV genome modification for efficient AAV production. *Heliyon.* **9**, e15071.
30. 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.
31. Ding R., Chao C.-C., Gao Q. (2022) High-efficiency of genetic modification using CRISPR/Cpf1 system for engineered CAR-T cell therapy. *Methods Cell Biol.* **167**, 1–14.

Influence of Homology Arm Length and Structure on the Efficiency of Long Transgene Integration into a Cleavage Site Induced by SpCas9 or AsCpf1

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

Centre for Strategic Planning, of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, 119121 Russia
**e-mail: taran.julia01@gmail.com*

One of the promising new approaches to HIV infection treatment is the CRISPR/Cas-mediated knockout of the CCR5 receptor gene followed by the integration of an anti-HIV gene into the break site. Numerous studies have focused on the knockout of the CCR5 gene; however, the efficiency of subsequent targeted integration of long fragments remains poorly studied. To evaluate the efficiency of this approach, we used HT1080 cells and investigated the integration of a cassette expressing the EGFP gene into the CCR5 locus using two different nucleases (SpCas9 and AsCpf1) and various donor DNA constructs delivered by recombinant adeno-associated viral vectors (rAAV). For each nuclease, we designed five variants of donor DNA differing in the length (ranging from 150 to 1000 bp) or structure of the homology arms. The efficiency of transgene integration with 150 bp homology arms was the lowest for both nucleases and significantly differed from constructs with longer homology arms. Furthermore, it was shown that the presence of nuclease cleavage sites in the donor DNA flanking the cassette with homology arms did not affect the efficiency of transgene integration during AAV delivery. We demonstrated that the AsCpf1 nuclease provided higher efficiency of EGFP transgene integration than SpCas9, despite lower efficiency of CCR5 knockout. The maximum percentage of cells with integrated transgene was achieved using the AsCpf1 nuclease and an expression cassette with 600 bp homology arms, reaching $59 \pm 6\%$.

Keywords: HIV, CRISPR/Cas, CCR5, homologous recombination