

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ НОКИНА МТ-С34-КОДИРУЮЩЕЙ КОНСТРУКЦИИ В ЛОКУС *CXCR4* С ПОМОЩЬЮ МОДИФИКАЦИИ ДОНОРНОЙ ДНК САЙТАМИ-МИШЕНЯМИ Cas9

© 2024 г. М. В. Шепелев^a, Д. С. Комков^{a, b}, Д. С. Голубев^a, С. Е. Боровикова^c,
Д. В. Мазуров^{a, d}, Н. А. Круглова^{a, *}

^aЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^bDepartment of Physiology and Cell Biology, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev,
Beer-Sheva, 8410501 Israel

^cИнститут биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^dDivision of Infectious Diseases and International Medicine, Department of Medicine, University of Minnesota,
Minneapolis, 55455 USA

*e-mail: natalya.a.kruglova@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.11.2023 г.

После доработки 04.12.2023 г.

Принята к публикации 04.12.2023 г.

Для успешного применения в клинической практике технологии редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas9 необходимо добиться высокой эффективности нокина, то есть встраивания генетической конструкции в заданное место генома клетки-мишени. Один из подходов к повышению эффективности нокина заключается в модификации донорной ДНК путем введения в нее тех же мишеней для Cas9 (Cas9 targeting sequence, CTS), которые используются для внесения двухцепочечного разрыва в геном клетки (метод “double-cut donor”). Другой подход основан на введении в донорную ДНК укороченных мишеней для Cas9 (truncated, tCTS), включающих сайт РАМ и 16 проксимальных к нему нуклеотидов, которые предположительно не должны вызывать расщепление донорной плазмиды, но способны стимулировать ее транспорт в ядро за счет Cas9. Однако точные механизмы повышения уровня нокина под действием обоих типов модификаций донорной ДНК неизвестны. Мы оценили влияние этих модификаций донорной ДНК на эффективность нокина конструкции, кодирующей пептидный ингибитор слияния ВИЧ-1 МТ-С34, в локус *CXCR4* в Т-клеточной линии СЕМ/Р5. При введении в донорную плазмидную ДНК полноразмерных CTS уровень нокина повышался в 2 раза вне зависимости от числа CTS или их положения относительно донорной последовательности. Модификации tCTS не влияли на уровень нокина. Установлено, что *in vitro* оба типа сайтов эффективно расщеплялись под действием Cas9. Для детального изучения механизма действия этих модификаций необходимо оценивать их процессинг *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, редактирование генома, Т-лимфоциты, knock-in, донорная ДНК, мишени Cas9, ядерный транспорт ДНК

DOI: 10.31857/S0026898424040058, **EDN:** INCOYT

Появление технологий редактирования генома с помощью программируемых нуклеаз открыло новые возможности для лечения различных заболеваний человека [1]. Наиболее широко используемая нуклеаза Cas9 с помощью короткой молекулы

РНК-гида (гРНК) распознает ДНК-мишень и вносит двухцепочечный разрыв (DSB) в геном [2]. Репарация DSB в клетках происходит преимущественно по механизму негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ), который вызывает появление небольших делеций или инсерций (инделов), что можно использовать для нокаута гена. Репарация по механизму гомологичной рекомбинации (homology-directed repair, HDR) менее эффективна по сравнению с NHEJ и требует присутствия ДНК-матрицы (донорной ДНК). Доставка в клетки экзогенной донорной ДНК позволяет вносить в геном целевые нуклеотидные последовательности, что называется

Сокращения: гРНК – РНК-гид; РНП – рибонуклеопротеин; DSB (double-strand breaks) – двухцепочечные разрывы; CTS (Cas9 targeting sequence) – последовательность-мишень Cas9; HDR (homology-directed repair) – репарация по пути гомологичной рекомбинации; NHEJ (non-homologous end joining) – негомологичное соединение концов; tCTS (truncated Cas9 targeting sequence) – укороченная последовательность-мишень Cas9.

knock-in (нокин). Для генной терапии ряда заболеваний человека с помощью системы CRISPR/Cas9 можно использовать нокаут генов [3, 4]. Однако наиболее интересна возможность внесения направленных изменений в геном с помощью нокина, например, для исправления точечных мутаций при лечении моногенных заболеваний [5] или для создания CAR-T клеток [4]. К сожалению, эффективность CRISPR/Cas9-опосредованного нокина в большинстве случаев остается низкой, что ограничивает использование этой технологии в клинической практике. В связи с этим разработка новых подходов к повышению эффективности нокина, в первую очередь на клинически релевантных моделях в первичных клетках человека, не теряет своей актуальности.

Описаны различные способы модификации Cas9, гРНК и донорной ДНК, приводящие к повышению уровня нокина [6]. Кроме того, можно воздействовать на клеточный цикл или механизмы репарации ДНК с помощью низкомолекулярных соединений, чтобы сместить равновесие с механизма NHEJ в сторону HDR [7, 8]. Ряд подходов, направленных на модификацию донорной ДНК, включает использование различных типов ДНК-матриц (одноцепочечные олигонуклеотиды, оцДНК, дцДНК и т.д.), варьирование длины и симметрии плеч гомологии, химические модификации одноцепочечных олигонуклеотидов и др. [9]. Например, для конструкции длиной более 100 п.н. уровень нокина коррелирует с длиной плеч гомологии, однако достигает плато после некоторого значения (800–1500 п.н.) и затем падает из-за возрастающей токсичности ДНК [10]. Показано, что модификации концов линейной молекулы ДНК триэтиленгликолем и/или 2'-О-метил-рибонуклеотидами поддерживают стабильность донора и тем самым способствуют процессу HDR [11].

Для успешного нокина донорная ДНК должна находиться в ядре в момент образования DSB. При невирусном способе доставки донора какие-либо специфические механизмы его транспорта в ядро отсутствуют. В делящихся клетках трансфицированная ДНК оказывается в ядре в результате циклического разрушения и формирования ядерной мембраны [12]. Для повышения эффективности доставки донора к месту DSB и его пространственного сближения с комплексом Cas9/гРНК предложены различные способы ковалентной сшивки донора с гРНК или Cas9 [13–16]. Однако все эти способы требуют дополнительных этапов подготовки *in vitro* и чаще всего снижают способность комплекса расщеплять мишень. В результате повышение уровня HDR, описываемое для таких модификаций, на самом деле представляет собой увеличение соотношения HDR/NHEJ, в то время как абсолютный уровень HDR падает [13–16].

Кроме таких технически сложных методов описано два способа модификации донорной ДНК путем введения на 5'- и 3'-концы последовательностей-мишеней для Cas9, которые представляют собой протоспейсер и следующий за ним сайт РАМ (protospacer adjacent motif) [10, 17]. Первый тип модификации донора, включающий полноразмерный протоспейсер длиной 20 нуклеотидов, был назван "double-cut" [10], потому что Cas9 расщепляет такую донорную ДНК в двух местах, фланкирующих плечи гомологии. Показано, что одновременное внесение разрыва в геномную мишень и в донорную ДНК приводит к повышению уровня нокина более чем в 10 раз [10]. Однако механизм такого эффекта детально не исследован.

Авторы второго способа предположили, что, если Cas9 будет связываться с донорной ДНК в цитоплазме, но не будет вносить в нее разрыв, то донор в комплексе с Cas9 может эффективно транспортироваться в ядро за счет белка Cas9, имеющего сигналы ядерной локализации (NLS) [17]. Для этого донорные молекулы модифицировали путем добавления укороченных последовательностей-мишеней Cas9 (truncated Cas9 targeting sequence, tCTS) с протоспейсером длиной 16 нуклеотидов, которые, как показано J. Zhang с соавт. [18], не расщепляются под действием Cas9. Влияние модификации донорной ДНК сайтами tCTS на уровень нокина было изучено в ряде работ [19–22], при этом общалось как о повышении нокина в 2–4 [17, 19] или в 1.5 раза [20, 22], так и об отсутствии влияния [21]. Важно отметить, что в перечисленных работах не проверяли способность Cas9 расщеплять tCTS-сайты *in vitro* или в клетках. Кроме того, не было исследовано, действительно ли донорная ДНК с такими модификациями в большей степени накапливается в ядре по сравнению с немодифицированной.

В представленной работе на клинически значимой модели нокина конструкции, кодирующей пептидный ингибитор слияния ВИЧ-1 МТ-С34 (далее: нокин *MTC34*), в локус *CXCR4* в Т-клеточной линии СЕМ/Р5 [23] была оценена эффективность двух способов повышения уровня нокина: модификация донорной плазмиды по методу "double-cut" [10] и с помощью введения tCTS-сайтов, которые, предположительно, способствуют переносу донорной плазмиды в ядро за счет белка Cas9 [17].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии. Клетки линии СЕМ/Р5, полученные на основе Т-клеточной линии CCRF-СЕМ (ATCC) [23], культивировали в среде DMEM/F12 ("ПанЭко", Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота ("HyClone", США), 4 mM L-глутамин и 40 мг/л гентамицина

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Клонирование полноразмерных сигналов CTS в плазмидный донор	
на 5'-конец	
5'-Not-X4ex2-Psp	GGCCGAATTCACTTCAGATAACTACACCGAGG
3'-Not-X4ex2-Psp	TCGACCTCGGTGTAGTTATCTGAAGTGAATTC
на 3'-конец	
5'-Xba-X4ex2-Nco	CTAGCCTCGGTGTAGTTATCTGAAGTGAATTC
3'-Xba-X4ex2-Nco	CATGGAATTCACCTTCAGATAACTACACCGAGG
Клонирование tCTS с 4 некомплементарными основаниями в плазмидный донор	
на 5'-конец	
5'-tCTS(4MM)-Not-X4ex2-Psp	GGCCGAattcTCAGATAACTACACCGAGG
3'-tCTS(4MM)-Not-X4ex2-Psp	TCGACCTCGGTGTAGTTATCTGAGAATTC
на 3'-конец	
5'-tCTS(4MM)-Xba-X4ex2-Nco	CTAGCCTCGGTGTAGTTATCTGAGAATTC
3'-tCTS(4MM)-Xba-X4ex2-Nco	CATGGAattcTCAGATAACTACACCGAGG
Клонирование tCTS с 6 некомплементарными основаниями в плазмидный донор	
на 5'-конец	
5'-tCTS(6MM)-Not-X4ex2-Psp	GGCCGAattcagAGATAACTACACCGAGG
3'-tCTS(6MM)-Not-X4ex2-Psp	TCGACCTCGGTGTAGTTATCTCTGAATTC
на 3'-конец	
5'-tCTS(6MM)-Xba-X4ex2-Nco	CTAGCCTCGGTGTAGTTATCTCTGAATTC
3'-tCTS(6MM)-Xba-X4ex2-Nco	CATGGAattcagAGATAACTACACCGAGG
Клонирование tCTS с 8 некомплементарными основаниями в плазмидный донор	
на 5'-конец	
5'-tCTS(8MM)-Not-X4ex2-Psp	GGCCGAattcagtcATAACTACACCGAGG
3'-tCTS(8MM)-Not-X4ex2-Psp	TCGACCTCGGTGTAGTTATGACTGAATTC
на 3'-конец	
5'-tCTS(8MM)-Xba-X4ex2-Nco	CTAGCCTCGGTGTAGTTATGACTGAATTC
3'-tCTS(8MM)-Xba-X4ex2-Nco	CATGGAattcagtcATAACTACACCGAGG

Примечание. Для каждого праймера, содержащего таргетную последовательность, жирным шрифтом выделен сайт PAM, протоспейсер подчеркнут, некомплементарные основания в его составе показаны строчными символами.

(“ПанЭко”) при 37°С в увлажненной атмосфере 5% CO₂.

Конструирование плазмид. Донорные плазмиды получали на основе плазмиды pJet-donor_MT-C34, описанной ранее [23]. Для создания донорной плазмиды pJet-donor_MT-C34 с сайтом связывания Cas9 (Cas9 targeting sequence, CTS) на 5'-конце донорной последовательности, несущим 0, 4, 6 или 8 некомплементарных оснований, соответствующие одноцепочечные олигонуклеотиды: 5'-Not-X4ex2-Psp и 3'-Not-X4ex2-Psp – гибридизовали и клонировали в плазмиду pJet-donor_MT-C34 по сайтам NotI-PspXI (все последовательности праймеров приведены в табл. 1, а список использованных и полученных в работе плазмид – в табл. 2).

Для создания донорной плазмиды pJet-donor_MT-C34 с CTS-сайтом на 3'-конце донорной последовательности, несущим 0, 4, 6 или 8 некомплементарных оснований, соответствующие олигонуклеотиды: 5'-Xba-X4ex2-Nco и 3'-Xba-X4ex2-Nco – гибридизовали и клонировали в плазмиду pJet-donor_MT-C34 по сайтам XbaI-NcoI. Для получения донора с двумя CTS плазмиду pJet-donor_MT-C34-5'CTS обрабатывали рестриктазами XmaI-Bsu36I, фрагмент размером 566 п.н. клонировали в плазмиду pJet-donor_MT-C34-3'CTS по соответствующим сайтам. Полученные последовательности донорной ДНК в векторе pJet переклонировали в вектор pBluescript KS(+) (“Stratagene”,

Таблица 2. Плазмидные конструкции, использованные в работе

Название	Описание	Источник/ ссылка
pKSgRNA-X4ex2	Вектор для экспрессии гРНК против экзона-2 локуса <i>CXCR4</i>	[23]
pJET1.2		“Thermo Fisher Scientific”
pBluescript KS (+)		“Stratagene”
pJet-donor_MT-C34	Немодифицированный плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i>	[23]
pKS-donor_MT-C34	Немодифицированный плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i>	Не опубликована
pKS-donor_MT-C34-CTS-5'	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный по 5'-концу полноразмерным CTS	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-CTS-3'	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный по 3'-концу полноразмерным CTS	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-CTS-5'-3'	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный по 5'- и 3'-концам полноразмерным CTS	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-tCTS(4MM)-5'	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный по 5'-концу tCTS 4 некомплементарными основаниями	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-tCTS(4MM)-3'	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный по 3'-концу tCTS с 4 некомплементарными основаниями	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-tCTS(4MM)-5'-3'	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный по 5'- и 3'-концам tCTS с 4 некомплементарными основаниями	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-tCTS(6MM)-5'	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный по 5'-концу tCTS с 6 некомплементарными основаниями	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-tCTS(6MM)-3'	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный по 3'-концу tCTS с 6 некомплементарными основаниями	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-tCTS(6MM)-5'-3'	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный по 5'- и 3'-концам tCTS с 6 некомплементарными основаниями	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-tCTS(8MM)-5'	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный по 5'-концу tCTS с 8 некомплементарными основаниями	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-tCTS(8MM)-3'	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный по 3'-концу tCTS с 8 некомплементарными основаниями	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-tCTS(8MM)-5'-3'	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный по 5'- и 3'-концам tCTS с 8 некомплементарными основаниями	Эта работа

США) по сайтам PstI/ClaI. Все эксперименты проводили с донорами в векторе pBluescript KS(+).

Нуклеотидные последовательности всех полученных плазмид верифицировали секвенированием по Сэнгеру в компании “Евроген” (Россия). Донорные плазмиды выделяли с помощью набора Plasmid Midi Kit (100) (#12145; “Qiagen”, Германия). Все остальные плазмиды выделяли с использованием набора Plasmid Midiprep 2.0 (#BC124; “Евроген”).

Электропорация. Для нокина *МТС34* в локус *CXCR4* электропорировали 1×10^6 клеток СЕМ/RS5, используя 3 мкг плазмиды pcDNA3.3-hCas9 (#41815; “Addgene”, США) и 1 мкг плазмиды pKS-gRNA-X4ex2, кодирующей гРНК против экзона-2 гена *CXCR4* (спейсер: 5'-CACTTCAGATAACTACACCG-3', РАМ: AGG), которая описана ранее [23], вместе с 1 пмоль (~2.9 мкг) соответствующего плазмидного донора. Кроме гРНК против *CXCR4*, использовали гРНК против последовательности, кодирующей белок р24 ВИЧ-1 (спейсер: 5'-GTAAAGAGACCATCAATG-3', РАМ: AGG), описанную ранее [23], а также контрольную гРНК с рандомизированной последовательностью, не имеющей комплементарных участков в геноме человека (спейсер: 5'-GCACTACCAGAGCTAACTCA-3'). Для электропорации использовали прибор Neon electroporation system со 100-микролитровыми накопечниками (“Invitrogen”, США) и следующими настройками: 1230 В, 40 мс, один импульс. На 5 сутки после электропорации клетки окрашивали соответствующими антителами и анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

Проточная цитофлуориметрия. Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки СЕМ/RS5 инкубировали в течение 30 мин при 4°C в фосфатно-солевом буфере (PBS) с мышиными моноклональными антителами С24 против пептида МТ-С34, описанными ранее [23], или с мышиными моноклональными антителами против *CXCR4* (клон 12G5; “Santa Cruz Biotechnology”, США). Затем клетки дважды отмывали в PBS и инкубировали с козьими антителами против IgG мыши, конъюгированными с Alexa488 или Alexa546 (“Thermo Fisher Scientific”, США) в течение 30 мин при 4°C. Далее клетки два раза промывали в PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (“Beckman Coulter”, США). В качестве отрицательного контроля использовали клетки, окрашенные только вторичными антителами.

Расщепление плазмидной ДНК под действием рибонуклеопротеина (РНП) *in vitro*. Для сборки РНП-комплексов использовали белок Cas9, наработанный и очищенный в лаборатории по протоколу, описанному ранее [23]. Cas9 разводили в буфере Orange (BO5; “Thermo Fisher Scientific”) до концентрации 3 мкМ. гРНК получали с помощью набора для *in vitro* транскрипции HiScribe T7 High Yield RNA synthesis kit (#E2040S; “NEB”, США), как описано в статье А. Масленниковой

(Maslennikova) с соавт. [23]. гРНК разводили в воде (“Ambion Thermo Scientific”, США) до концентрации 3 мкМ. На одну реакцию для сборки РНП брали 3 мкл 10× Orange, по 3 мкл (9 пмоль) Cas9 и гРНК и 18 мкл воды, инкубировали смесь 15 мин при комнатной температуре, после чего делали 27-микролитровые аликвоты и в каждую добавляли 3 мкл плазмидной ДНК с концентрацией 100 мкг/мл (0.037 мкМ). Реакционная смесь содержала 9 пмоль РНП и 0.111 пмоль плазмиды, то есть 81-кратный молярный избыток РНП. Реакцию проводили в течение 30 мин при 37°C, затем добавляли 1 мкл протеиназы К (20 мг/мл) и инкубировали 10 мин при 56°C. В образцы добавляли 6× буфер для нанесения образцов и 1/2 образца разделяли в 1%-ном ТАЕ-агарозном геле.

Для эксперимента по титрованию РНП собирали комплексы, как описано выше, получали общую смесь с концентрацией РНП 0.3 мкМ и готовили 5 последовательных двукратных разведений. Реакционная смесь содержала 3 мкл (0.9 пмоль) РНП и 5 мкл (0.185 пмоль) плазмидной ДНК, инкубацию проводили в описанных выше условиях.

Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.0 (США). Для сравнения средних использовали однофакторный ANOVA с последующим тестом Даннета для множественных сравнений с контрольной группой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние CTS в донорной плазмиде на уровень нокина

В качестве модели использовали нокин конструкции, кодирующей пептидный ингибитор слияния ВИЧ-1 МТ-С34, в экзон-2 гена *CXCR4* человека, как описано нами ранее [23]. Донорная конструкция несет плечи гомологии для локуса *CXCR4*, фланкирующие последовательность, кодирующую пептид МТ-С34 (рис. 1а). В результате корректного нокина в начало кодирующей последовательности гена *CXCR4* клетки теряют корецептор *CXCR4* (нокаут) и начинают экспрессировать пептид МТ-С34 на своей поверхности (нокин).

Для оценки влияния полноразмерных CTS на уровень нокина были получены плазмиды, несущие мишени для Cas9 на 5'- или 3'-конце донорной последовательности или с обеих сторон от нее (рис. 1б). Сайты CTS представляли собой прото-спейсер длиной 20 п.н. и РАМ, соответствующие выбранной целевой последовательности в локусе *CXCR4*. Для оценки влияния укороченных сайтов, tCTS, на уровень нокина были получены донорные плазмиды, модифицированные tCTS с 4, 6 или 8 некомплементарными основаниями в протоспейсере в дистальной области от РАМ (рис. 1в).

Полученные донорные плазмиды вместе с плазмидами, кодирующими Cas9 и гРНК, электропорировали в клетки СЕМ/R5 и на 5 сутки измеряли уровень нокина и нокаута с помощью проточной цитофлуориметрии. Обнаружено, что конструкции с полноразмерными сайтами CTS повышали уровень нокина в 1.5–2 раза по сравнению с немодифицированным донором (контроль) вне зависимости от количества или их положения относительно донорной последовательности, тогда как все сайты tCTS, содержащие некомплементарные основания, не влияли на уровень нокина (рис. 2а). Уровень нокаута для всех донорных конструкций не отличался от такового для немодифицированного донора (рис. 2б). В результате повышалось и соотношение уровней нокина к нокауту: примерно в 2 раза для доноров с сайтами CTS (рис. 2в).

Расщепление CTS-сайтов под действием Cas9 *in vitro*

С целью оценить способность Cas9 в комплексе с гРНК расщеплять донорные плазмиды с CTS-или tCTS-сайтами *in vitro* мы использовали плазмиды, в которых эти сайты находились по обеим сторонам донорной последовательности. По нашим расчетам, в этом случае под действием Cas9

из плазмид будет вырезаться фрагмент размером около 1400 п.н. В результате было обнаружено, что донорная плазида с 4 некомплементарными основаниями (4ММ) расщеплялась Cas9 так же эффективно, как и плазида с полноразмерными CTS (рис. 3а). Плазида с 6ММ в протоспейсере также расщеплялась под действием Cas9, однако менее эффективно (рис. 3а, дорожка 3), и лишь в случае 8ММ расщепления не происходило (рис. 3а, дорожка 2). Важно отметить, что контрольная плазида с немодифицированной донорной последовательностью (рис. 3а, дорожка 1) не расщеплялась Cas9, как и все плазмиды в комплексе с контрольной гРНК (scrambled guide RNA, гРНК-Scr), не имеющей мишеней в геноме человека (рис. 3б). При расщеплении ДНК с помощью Cas9 *in vitro* обычно используют молярный избыток РНП, так как Cas9 — фермент одного цикла [24]. В эксперименте, представленном на рис. 3, использовали 81-кратный молярный избыток РНП. Предположив, что расщепление некомплементарных сайтов связано с избытком РНП, мы провели эксперимент с титрованием количества РНП. Как видно из рис. 3в и 3г, плазмидный субстрат с 4 некомплементарными основаниями (4ММ) расщеплялся так же эффективно, как и не имеющий

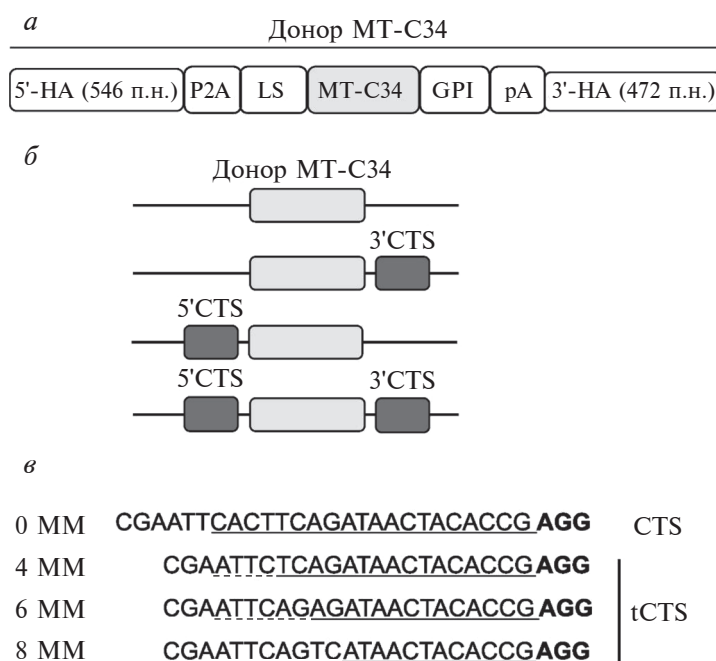


Рис. 1. Схема донорной конструкции для нокина МТС34 в экзон-2 локуса CXCR4 (а) и ее модификаций (б, в). Обозначения: 5'-НА — 5'-плечо гомологии; P2A — сигнал пропуска рибосомы; LS — лидерная последовательность; GPI — последовательность для модификации пептида GPI-якорем; рА — сигнал полиаденилирования; 3'-НА — 3'-плечо гомологии. б — Схематичное изображение плазмид, несущих CTS на 5'- или 3'- конце донорной ДНК (перед 5'-НА или после 3'-НА соответственно); в — последовательности CTS и tCTS. 0ММ — в протоспейсере нет некомплементарных оснований; 4ММ, 6ММ и 8ММ — на 5'-конце протоспейсера находятся соответственно 4, 6 или 8 некомплементарных оснований. Сайт РАМ показан жирным шрифтом, протоспейсер подчеркнут, некомплементарные основания в его составе подчеркнуты пунктирной линией. Здесь: CTS — таргетная последовательность Cas9, соответствующая протоспейсеру вместе с РАМ; tCTS — таргетная последовательность Cas9, соответствующая протоспейсеру с некомплементарными основаниями.

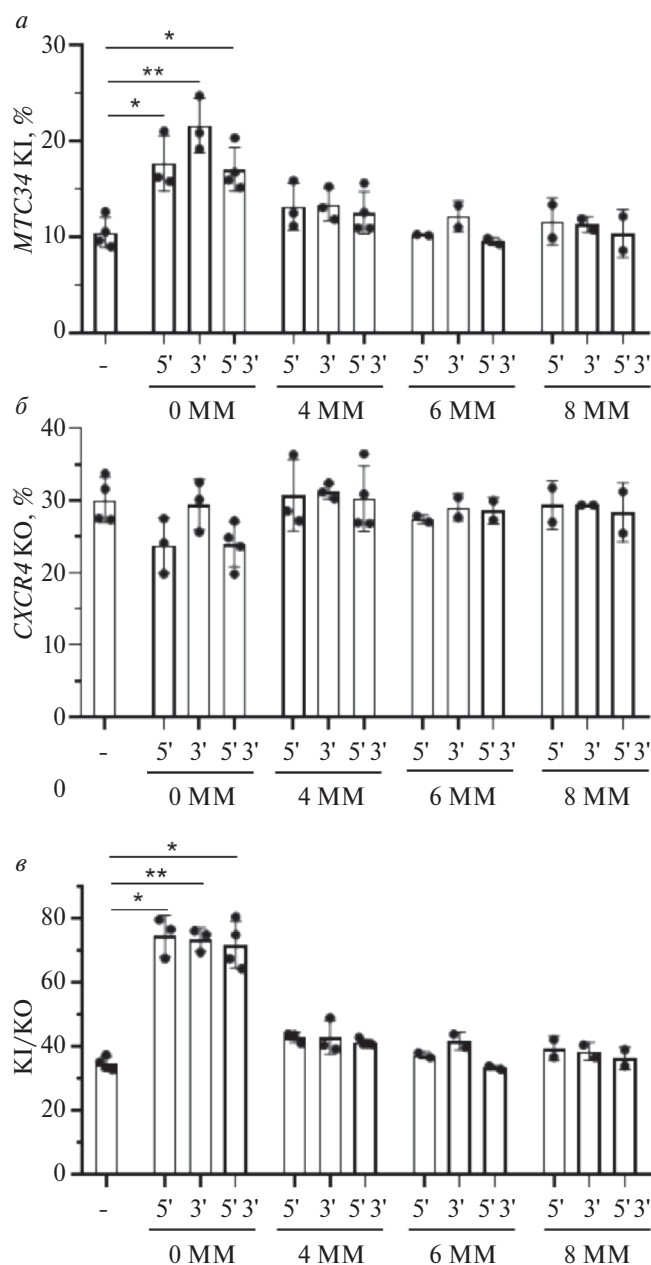


Рис. 2. Влияние CTS-модификаций донорной ДНК на уровень нокина *MTC34* (а), нокаута *CXCR4* (б) и соотношения нокин/нокаут (в) в клетках СЕМ/Р5. Клетки электропорировали плазмидами рсDNA3.3-hCas9, рKS-gRNA-X4ex2 и одним из вариантов донорной плазмиды рKS-don_MT-C34, на 5 сутки оценивали уровень нокаута (КО) *CXCR4* и нокина (КИ) *MTC34* по экспрессии соответствующих белка *CXCR4* и пептида MT-C34 на поверхности клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. КИ/КО – соотношение нокина к нокауту; контроль (–) – донорная плазмида рKS-don_MT-C34 без модификаций; (0, 4, 6, 8) MM – число некомплементарных оснований в протоспейсере CTS. Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение (SD) и отдельные результаты трех независимых экспериментов. * $p < 0.01$, ** $p < 0.0001$.

некомплементарных оснований (0MM), даже при молярном соотношении РНП: субстрат, равном 2.43 (рис. 3г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе мы оценили влияние модификаций плазмидной донорной ДНК путем добавления таргетных сайтов для Cas9 с протоспейсерами без некомплементарных оснований (CTS, 0MM, “double-cut donor”) или с протоспейсерами, имеющими 4, 6 или 8 некомплементарных оснований на 5'-конце (tCTS), на уровень нокина конструкции, кодирующей пептидный ингибитор слияния ВИЧ-1 MT-C34 (*MTC34*), в локус *CXCR4*. В результате обнаружено повышение уровня нокина при фланкировании донорной последовательности сайтами CTS, но не tCTS.

Выявленное нами повышение уровня нокина *MTC34* при введении CTS согласуется с результатами J. Zhang и др. [10], впервые систематически сравнивших немодифицированные и “double-cut” доноры. Однако это не совпадает с результатами D. Nguyen и др. [17], которые регистрировали повышение уровня нокина в 2–4 раза при введении в донорную ДНК tCTS-сайтов с 4 MM. Авторы предположили, что повышение эффективности нокина за счет CTS-сайтов обусловлено одновременным расщеплением последовательности-мишени Cas9 в геноме и в донорной ДНК [10]. Однако механизм действия “double-cut” доноров на уровень нокина остается неизвестным. D. Nguyen с соавт. [16] объяснили эффект сайтов tCTS с 4MM тем, что они не подвергаются расщеплению, но вызывают связывание донора с нуклеазой и облегчают его транспорт в ядро за счет NLS в Cas9. Авторы не исследовали расщепление донорной ДНК, несущей такие сайты, ни *in vitro*, ни *in vivo*. Мы установили, что доноры, модифицированные tCTS с 4 MM, расщеплялись под влиянием Cas9 *in vitro* так же эффективно, как и доноры с полноразмерными CTS, но не вызывали повышения уровня нокина *MTC34*. Можно предположить, что эффект от введения мишеней Cas9 в донорную ДНК связан или с процессом линеаризации плазмидного донора, или с его взаимодействием с Cas9, или с обоими факторами.

Нами показано, что повышение уровня нокина происходило при введении даже одного CTS-сайта по 5'- или 3'-концу донорной последовательности, тогда как J. Zhang и др. [10] исследовали только парные сайты. Можно допустить, что для повышения уровня нокина достаточно расщепления донорной ДНК в одном месте, с любой стороны от донорной последовательности, а наличие второго сайта расщепления не влияет на конечный результат. Недавно R. Jing и др. [25] показали, что уровень нокина повышался в два раза при введении

в плазмидный донор одного сайта CTS и в 10 раз при введении двух сайтов, в то время как третий сайт не приводил к дополнительному увеличению эффективности. Кроме того, при введении полно-размерных CTS повышение эффективности нокина регистрировали даже для линейных доноров. Все вышеперечисленное позволяет сделать вывод о том, что объяснить механизм действия CTS-сайтов исключительно линейризацией донорной ДНК невозможно, так как необходимо учитывать фактор взаимодействия донорной ДНК с Cas9.

Известно, что нуклеаза Cas9 — фермент одного цикла [24] и после расщепления субстрата *in vitro* в течение нескольких часов остается связанным с концами ДНК [26], поэтому при проведении *in vitro* расщепления ДНК по завершении

процесса реакционную смесь обрабатывают протеиназой К — для деградации Cas9 и высвобождения продуктов реакции из РНП-комплекса [27, 28]. Учитывая это, можно предположить, что *in vivo* Cas9 расщепляет таргетный сайт в донорной плазмиде, после чего остается связанной со свободным концом расщепленной ДНК. Если расщепление ДНК произошло в цитоплазме, то за счет NLS в белке Cas9 комплекс РНП и ДНК-матрицы может проникать в ядро. В ядре гРНК направляет Cas9 на целевой locus, что приводит к транспорту связанной ДНК-матрицы к месту репарации DSB. Кроме того, часть ДНК-матрицы может попасть в ядро и другим способом, где подвергнется расщеплению Cas9.

Нами показано, что доноры, модифицированные tCTS с 4 некомплементарными основаниями,

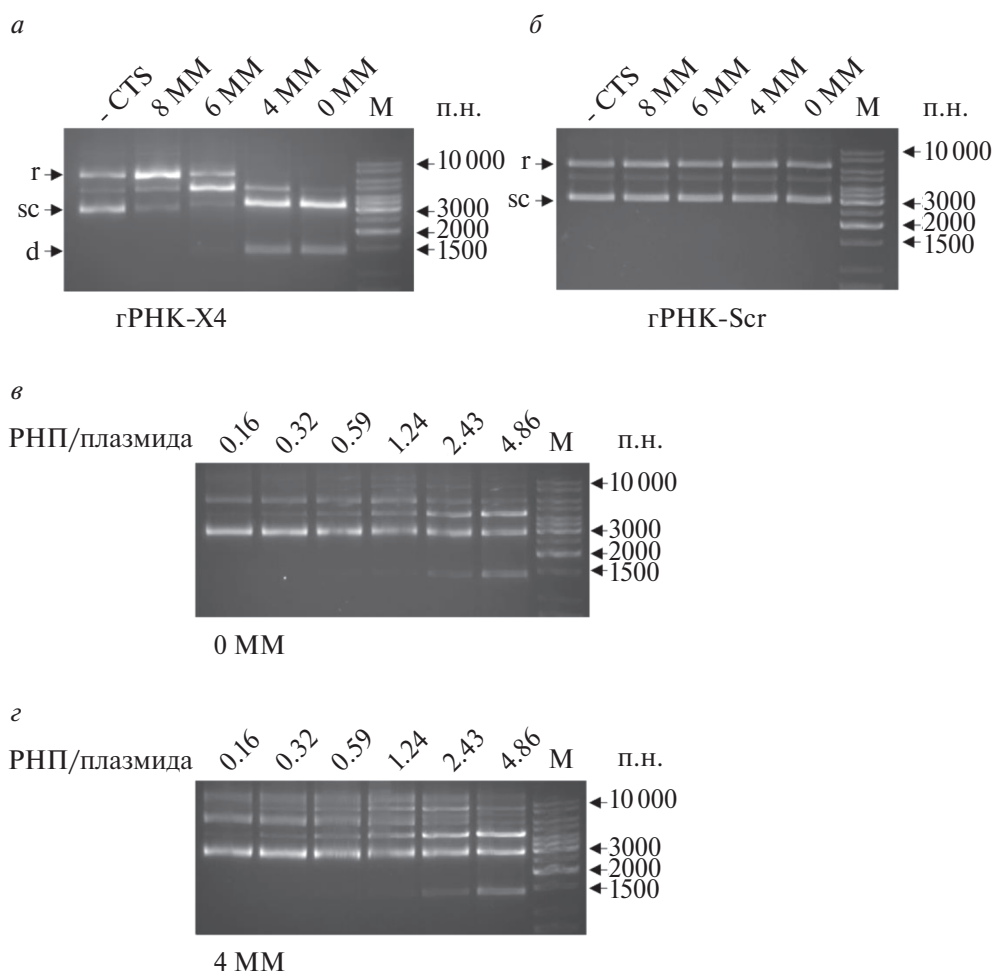


Рис. 3. Расщепление CTS-сайтов под действием Cas9 *in vitro*. Донорные плазмиды с CTS-сайтами, содержащими 0, 4, 6 или 8 некомплементарных оснований, а также донорную плазмиду без модификаций (-CTS) инкубировали *in vitro* с комплексом Cas9 и гРНК против *CXCR4* (гРНК-X4) (а) или контрольной (гРНК-Scr) (б) и оценивали уровень расщепления плазмиды с помощью электрофореза в 1%-ном TAE-агарозном геле. Условные обозначения: r (relaxed) — релаксированная форма плазмиды, sc (supercoiled) — суперскрученная форма. Донорные плазмиды с CTS-сайтами, содержащими 0 (в) или 4 (г) некомплементарных оснований, инкубировали *in vitro* с возрастающим количеством РНП и оценивали уровень расщепления плазмиды с помощью электрофореза в 1%-ном TAE-агарозном геле. РНП/плазмиды — молярное соотношение РНП к плазмидной ДНК. М — маркеры длины ДНК: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750 п.н. (#SM1163; “Thermo Fisher Scientific”, США).

in vitro расщеплялись Cas9 так же, как и доноры с полноразмерными сайтами, однако это не влияло на уровень нокина. Если предположить, что для повышения уровня нокина необходимо именно расщепление донора, то введенные по его концам сайты tCTS с некомплементарными основаниями, скорее всего, не расщепляются Cas9 *in vivo* в клетках. Это предположение требует экспериментальной проверки. К сожалению, надежные способы оценки расщепления донорных плазмид в клетках под действием Cas9 пока не разработаны. Нам не удалось показать расщепление донорной ДНК *in vivo* с помощью количественной ПЦР (данные не приведены). Мы предполагаем, что при электропорации и транзиторной экспрессии в клетках образуется очень небольшое количество расщепленной донорной плазмиды, в результате уровень исходной плазмиды снижается настолько незначительно, что чувствительности количественной ПЦР для детекции этих изменений не хватает.

Стоит еще раз отметить, что ни в одной из опубликованных ранее работ, в которых использовали CTS или tCTS для модификации донорной ДНК, ее расщепление *in vivo* не исследовали. Кроме того, наличие или отсутствие эффекта от tCTS можно объяснить различиями в аффинности Cas9 к таким сайтам, которая варьирует в зависимости от нуклеотидной последовательности. В результате нуклеаза Cas9 может образовывать короткоживущий комплекс с tCTS донора, что не позволит ей эффективно переносить донорную ДНК в ядро. Эта гипотеза также требует экспериментальной проверки.

Отсутствие эффекта от tCTS в использованной нами модели можно связать с особенностью выбранного локуса — *CXCR4*. Так, В. Shy и др. [19] продемонстрировали, что влияние модификации донорной ДНК tCTS-сайтами на уровень нокина сильно варьировало для разных локусов: от отсутствия эффекта до повышения в 10 раз. Среди локусов с минимальным влиянием tCTS-сайтов на нокин был и *CXCR4*, хотя последовательность протоспейсера для этого локуса в работе не указана. Можно предположить, что в каждом индивидуальном случае, в зависимости от последовательности протоспейсера и некомплементарных оснований, *in vivo* расщепление донорной ДНК под действием Cas9 происходит либо эффективно, и в этом случае регистрируют повышение уровня нокина, либо неэффективно — тогда повышения нокина не детектируют.

Необходимо отметить, что в большинстве опубликованных работ, в которых изучали расщепление мишеней под действием Cas9 при формировании укороченного гетеродуплекса, использовали укороченные гРНК [18, 29]. В работе D. Nguyen и др. [17] для формирования связи между донором и Cas9 использовали укороченные протоспейсеры. Однако данных о расщеплении ДНК-мишени при

использовании укороченных протоспейсеров, а не укороченных гРНК, мы не нашли. В этом случае гетеродуплекс, формирующийся между ДНК-мишенью и гРНК, на самом деле нельзя считать укороченным в полной мере — укорочена лишь область комплементарности в протоспейсере, за которой следуют нуклеотиды, уникальные для каждого таргетного локуса генома и способные вносить различный вклад в стабильность гетеродуплекса. По этой причине мы предполагаем, что для понимания механизма действия tCTS-сайтов необходимо для каждой конкретной таргетной последовательности оценивать ее процессинг под действием Cas9 *in vitro* и *in vivo*.

Вероятно, при эффективном расщеплении *in vivo* таргетных последовательностей Cas9 сайты tCTS повышают уровень нокина, а в случае неэффективного расщепления *in vivo* эффект от tCTS отсутствует. В таком случае наблюдаемые J. Zhang и др. [10] и D. Nguyen и др. [17] эффекты от соответственно CTS- и tCTS-сайтов имеют одинаковую природу. Подтверждение этого предположения потребует анализа нокина в ряд дополнительных локусов с одновременной оценкой расщепления донорной плазмиды *in vivo* и *in vitro*, а также измерения кинетических параметров связывания Cas9 с таргетными последовательностями.

Таким образом, на клинически значимой модели нокина в Т-клетках нам удалось повысить уровень нокина *MTC34* в локус *CXCR4* путем модификации донорной плазмиды мишенями Cas9, фланкируемыми донорными последовательностями. Выяснение молекулярных механизмов этого эффекта позволит усовершенствовать технологию нокина за счет модификации донорной ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00310).

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doudna J.A. (2020) The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. **578**, 229–236. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>
2. Jiang F., Doudna J.A. (2017) CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
3. Antoniani C., Meneghini V., Lattanzi A., Felix T., Romano O., Magrin E., Weber L., Pavani G., El Hoss S., Kurita R., Nakamura Y., Cradick T.J., Lundberg A.S., Porteus M., Amendola M., El Nemer W., Cavazzana M., Mavilio F., Miccio A. (2018) Induction of fetal hemoglobin

- synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human β -globin locus. *Blood*. **131**, 1960–1973.
<https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-811505>
4. Pavlovic K., Tristán-Manzano M., Maldonado-Pérez N., Cortijo-Gutierrez M., Sánchez-Hernández S., Justicia-Lirio P., Carmona M.D., Herrera C., Martín F., Benabdelah K. (2020) Using gene editing approaches to fine-tune the immune system. *Front. Immunol.* **11**, 570672.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.570672>
 5. Kotagama O.W., Jayasinghe C.D., Abeyasinghe T. (2019) Era of genomic medicine: a narrative review on CRISPR technology as a potential therapeutic tool for human diseases. *Biomed. Res. Int.* **2019**, 1369682.
<https://doi.org/10.1155/2019/1369682>
 6. Sun W., Liu H., Yin W., Qiao J., Zhao X., Liu Y. (2022) Strategies for enhancing the homology-directed repair efficiency of CRISPR-Cas systems. *CRISPR J.* **5**, 7–18.
<https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0039>
 7. Shams F., Bayat H., Mohammadian O., Mahboudi S., Vahidnezhad H., Soosanabadi M., Rahimpour A. (2022) Advance trends in targeting homology-directed repair for accurate gene editing: an inclusive review of small molecules and modified CRISPR-Cas9 systems. *Bioimpacts*. **12**, 371–391.
<https://doi.org/10.34172/bi.2022.23871>
 8. Smirnikhina S.A., Zaynitdinova M.I., Sergeeva V.A., Lavrov A.V. (2022) Improving homology-directed repair in genome editing experiments by influencing the cell cycle. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 5992.
<https://doi.org/10.3390/ijms23115992>
 9. Richardson C.D., Ray G.J., DeWitt M.A., Curie G.L., Corn J.E. (2016) Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat. Biotechnol.* **34**, 339–344.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3481>
 10. 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.
<https://doi.org/10.1186/S13059-017-1164-8>
 11. Ghanta K.S., Chen Z., Mir A., Dokshin G.A., Krishnamurthy P.M., Yoon Y., Gallant J., Xu P., Zhang X.O., Ozturk A.R., Shin M., Idrizi F., Liu P., Gneid H., Edraki A., Lawson N.D., Rivera-Pérez J.A., Sontheimer E.J., Watts J.K., Mello C.C. (2021) 5'-Modifications improve potency and efficacy of DNA donors for precision genome editing. *Elife*. **10**, e72216.
<https://doi.org/10.7554/eLife.72216>
 12. Haraguchi T., Koujin T., Shindo T., Bilir Ş., Osakada H., Nishimura K., Hirano Y., Asakawa H., Mori C., Kobayashi S., Okada Y., Chikashige Y., Fukagawa T., Shibata S., Hiraoka Y. (2022) Transfected plasmid DNA is incorporated into the nucleus via nuclear envelope reformation at telophase. *Commun. Biol.* **5**, 78.
<https://doi.org/10.1038/s42003-022-03021-8>
 13. Carlson-Stevermer J., Abdeen A.A., Kohlenberg L., Goedland M., Molugu K., Lou M., Saha K. (2017) Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing. *Nat. Commun.* **8**, 1711.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01875-9>
 14. Ma M., Zhuang F., Hu X., Wang B., Wen X.Z., Ji J.F., Xi J.J. (2017) Efficient generation of mice carrying homozygous double-floxed alleles using the Cas9-Avidin/Biotin-donor DNA system. *Cell Res.* **27**, 578–581.
<https://doi.org/10.1038/cr.2017.29>
 15. Savic N., Ringnalda F.C., Lindsay H., Berk C., Bargsten K., Li Y., Neri D., Robinson M.D., Ciaudo C., Hall J., Jinek M., Schwank G. (2018) Covalent linkage of the DNA repair template to the CRISPR-Cas9 nuclease enhances homology-directed repair. *Elife*. **7**, e33761.
<https://doi.org/10.7554/eLife.33761>
 16. Aird E.J., Lovendahl K.N., St. Martin A., Harris R.S., Gordon W.R. (2018) Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun. Biol.* **1**, 54.
<https://doi.org/10.1038/s42003-018-0054-2>
 17. Nguyen D.N., Roth T.L., Li P.J., Chen P.A., Apathy R., Mamedov M.R., Vo L.T., Tobin V.R., Goodman D., Shifrut E., Bluestone J.A., Puck J.M., Szoka F.C., Marson A. (2020) Polymer-stabilized Cas9 nanoparticles and modified repair templates increase genome editing efficiency. *Nat. Biotechnol.* **38**, 44–49.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0325-6>
 18. Zhang J.P., Li X.L., Neises A., Chen W., Hu L.P., Ji G.Z., Yu J.Y., Xu J., Yuan W.P., Cheng T., Zhang X.B. (2016) Different effects of sgRNA length on CRISPR-mediated gene knockout efficiency. *Sci. Rep.* **6**, 28566.
<https://doi.org/10.1038/srep28566>
 19. Shy B.R., Vykunta V.S., Ha A., Talbot A., Roth T.L., Nguyen D.N., Pfeifer W.G., Chen Y.Y., Blaesche F., Shifrut E., Vedova S., Mamedov M.R., Chung J.J., Li H., Yu R., Wu D., Wolf J., Martin T.G., Castro C.E., Ye L., Esensten J.H., Eyquem J., Marson A. (2023) High-yield genome engineering in primary cells using a hybrid ssDNA repair template and small-molecule cocktails. *Nat. Biotechnol.* **41**, 521–531.
<https://doi.org/10.1038/s41587-022-01418-8>
 20. Kath J., Du W., Pruene A., Braun T., Thommandru B., Turk R., Sturgeon M.L., Kurgan G.L., Amini L., Stein M., Zittel T., Martini S., Ostendorf L., Wilhelm A., Akyüz L., Rehm A., Höpken U.E., Pruß A., Künkele A., Jacobi A.M., Volk H.D., Schmuck-Henneresse M., Striepecke R., Reinke P., Wagner D.L. (2022) Pharmacological interventions enhance virus-free generation of TRAC-replaced CAR T cells. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **25**, 311–330.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.03.018>
 21. Oh S.A., Senger K., Madireddi S., Akhmetzyanova I., Ishizuka I.E., Tarighat S., Lo J.H., Shaw D., Haley B., Rutz S. (2022) High-efficiency nonviral CRISPR/Cas9-mediated gene editing of human T cells using plasmid donor DNA. *J. Exp. Med.* **219**, e20211530.
<https://doi.org/10.1084/jem.20211530>
 22. Lin-Shiao E., Pfeifer W.G., Shy B.R., Saffari Doost M., Chen E., Vykunta V.S., Hamilton J.R., Stahl E.C., Lopez D.M., Sandoval Espinoza C.R., Deyanov A.E., Lew R.J., Poirer M.G., Marson A., Castro C.E., Doudna J.A. (2022) CRISPR-Cas9-mediated nuclear transport and genomic integration of nanostructured genes in human primary cells. *Nucleic Acids Res.* **50**, 1256–1268.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac049>
 23. Maslennikova A., Kruglova N., Kalinichenko S., Komkov D., Shepelev M., Golubev D., Siniavin A., Vzorov A., Filatov A., Mazurov D. (2022) Engineering T-cell resistance

- to HIV-1 infection via knock-in of peptides from the heptad repeat 2 domain of gp41. *mBio*. **13**, e0358921. <https://doi.org/10.1128/mbio.03589-21>
24. Sternberg S.H., Redding S., Jinek M., Greene E.C., Doudna J.A. (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. **507**, 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>
 25. Jing R., Jiao P., Chen J., Meng X., Wu X., Duan Y., Shang K., Qian L., Huang Y., Liu J., Huang T., Jin J., Chen W., Zeng X., Yin W., Gao X., Zhou C., Sadelain M., Sun J. (2021) Cas9-cleavage sequences in size-reduced plasmids enhance nonviral genome targeting of CARs in primary human T cells. *Small Methods*. **5**, e2100071. <https://doi.org/10.1002/smt.202100071>
 26. Aldag P., Welzel F., Jakob L., Schmidbauer A., Rutkauskas M., Fettes F., Grohmann D., Seidel R. (2021). Probing the stability of the SpCas9–DNA complex after cleavage. *Nucleic Acids Res.* **49**, 12411–12421. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1072>
 27. Zou R., Liu Y., Ha T. (2021) *In vitro* cleavage and electrophoretic mobility shift assays for very fast CRISPR. *Bio Protoc.* **11**, e4138. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4138>
 28. Liu Y., Zou R.S., He S., Nihongaki Y., Li X., Razavi S., Wu B., Ha T. (2020) Very fast CRISPR on demand. *Science*. **368**, 1265–1269. <https://doi.org/10.1126/science.aay8204>
 29. Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 279. <https://doi.org/10.1038/NBT.2808>

Increasing the Level of Knock-In of the MT-C34-Encoding Construct into the *CXCR4* Locus by Modifying Donor DNA with Cas9 Target Sites

M. V. Shepelev¹, D. S. Komkov^{1, 2}, D. S. Golubev¹,
S. E. Borovikova³, D. V. Mazurov^{1, 4}, N. A. Kruglova^{1, *}

¹Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Department of Physiology and Cell Biology, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev,
Beer-Sheva, 8410501 Israel

³Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

⁴Division of Infectious Diseases and International Medicine, Department of Medicine, University of Minnesota,
Minneapolis, 55455 USA

*e-mail: natalya.a.kruglova@yandex.ru

For successful application of genome editing technology using CRISPR/Cas9 system in clinical practice, it is necessary to achieve high efficiency of knock-in, the insertion of a genetic construct into a given locus in the genome of a target cell. One approach to increasing knock-in efficiency involves modifying donor DNA with the same targets for Cas9 (Cas9 targeting sequence, CTS) that are used for induction of double-strand breaks in the cell genome (the “double-cut donor” method). Another approach is based on introducing truncated targets for Cas9 (truncated CTS, tCTS), including a PAM site and 16 nucleotides proximal to it, into the donor DNA. Presumably, tCTS sites do not induce cleavage of the donor plasmid, but can support its transport into the nucleus by Cas9. However, the exact mechanisms for the increase in knock-in levels with both types of donor DNA modifications are unknown. Here, we evaluated the effect of these modifications on the knock-in efficiency of the *MTC34* genetic construct encoding the HIV-1 fusion inhibitor, MT-C34 peptide, into the *CXCR4* locus of the CEM/R5 T cell line. When full-length CTS sites were introduced into the donor plasmid DNA, the knock-in level increased twofold, regardless of the number of CTSs or their position relative to the donor sequence. Modifications of donor plasmids with tCTS sites did not affect knock-in levels. It was found that *in vitro* both types of sites were efficiently cleaved by Cas9. In order to study the mechanism of action of these modifications in detail, it is necessary to evaluate their cleavage *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: CRISPR/Cas9, genome editing, T lymphocytes, knock-in, donor DNA, Cas9 targeting site, DNA nuclear transport