

УДК 577.29

МОДУЛЬ RRE-REV НЕ ОКАЗЫВАЕТ ВЛИЯНИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ УПАКОВКИ БЕЛКОВ CAS9 И GAG В ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ СИСТЕМЫ NANOMEDIC

© 2024 г. Н.А. Круглова¹, Д.С. Комков^{1,2}, Д.В. Мазуров^{1,3}, М.В. Шепелев^{1,*}

Представлено академиком РАН П.Г. Георгиевым

Поступило 22.11.2023 г.

После доработки 30.11.2023 г.

Принято к публикации 01.12.2023 г.

Доставка рибонуклеопротеиновых комплексов нуклеазы Cas9 и гидовой РНК в клетки-мишени в формате вирусоподобных частиц (VLP, virus-like particles) — один из новых методов геномного редактирования, в перспективе пригодный для генной терапии заболеваний человека. Эффективность редактирования генома с помощью VLP зависит от упаковки в них нуклеазы Cas9, что опосредуется вирусным белком Gag. Для улучшения упаковки Cas9 в VLP системы NanoMEDIC плазмидные конструкции для экспрессии Cas9 и Gag были модифицированы добавлением элемента RRE (Rev response element) вируса ВИЧ, который должен повышать экспорт RRE-содержащих транскриптов из ядра в цитоплазму за счет акцессорного белка Rev, как описано для системы VLP на основе Vpr-Cas9. Было установлено, что уровни белков Cas9 и Gag в лизатах клеток повышаются при котрансфекции как плазмиды для экспрессии Rev, так и контрольной пустой плазмиды, и этот эффект не зависит от наличия RRE-элемента в транскрипте. Кроме того, установлено, что основную роль при упаковке Cas9 в частицы системы NanoMEDIC играет AP21967-индуцированная димеризация FRB и FKBP12, но не модификация плазмид с помощью элемента RRE и/или котрансфекция плазмиды, экспрессирующей Rev. Полученные результаты указывают на нецелесообразность использования RRE-Rev модуля для улучшения упаковки нуклеазы Cas9 в VLP.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, VLP, RNP, ВИЧ, RRE, Rev.

DOI: 10.31857/S2686738924020121, EDN: WFAFTA

Развитие технологий редактирования генома человека с помощью системы CRISPR/Cas9 позволило начать разработки лекарственных средств для лечения ряда заболеваний человека, многие из которых уже находятся на различных стадиях клинических исследований [1]. Это обуславливает актуальность создания эффективных технологий доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки человека [2]. Один из таких методов до-

ставки — вирусоподобные частицы (VLP, virus-like particles) на основе оболочечных вирусов: лентивируса ВИЧ или γ-ретровируса MLV [3]. VLP представляют собой вирусные частицы, собранные из структурных белков и содержащие некоторые вирусные ферменты, но лишенные вирусного генома и акцессорных белков. На своей поверхности VLP несут белок оболочки, чаще всего гетерологичный белок VSVG из вируса везикулярного стоматита (VSV). За счет этого VLP могут эффективно проникать в клетки, доставляя компоненты системы редактирования генома [3]. Различные варианты VLP для доставки комплекса белка Cas9 и гидовой РНК (рибонуклеопротеиновый комплекс, РНКП) были описаны в ряде недавних работ [4–8]. При этом одна из лимитирующих стадий получения VLP — это упаковка в них нуклеазы Cas9. Большинство вариантов систем сборки VLP основано на слиянии нуклеазы Cas9 с полипротеином Gag вирусов ВИЧ или MLV [6–8]. Нуклеаза Cas9 упаковывается в частицы в составе слитого белка с Gag, и после формирования частицы вирусные протеазы расщепляют

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

²Место работы в настоящее время: Department of Physiology and Cell Biology, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Be'erSheva, Israel

³Место работы в настоящее время: Division of Infectious Diseases and International Medicine, Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, USA

*E-mail: mshepelev@mail.ru

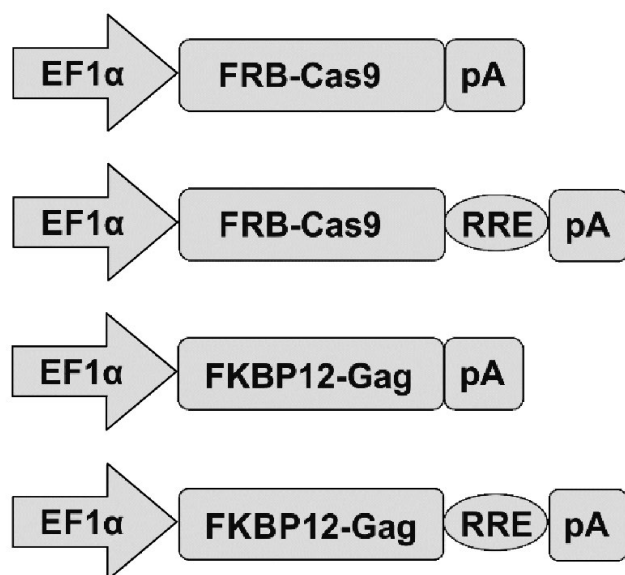


Рис. 1. Схемы плазмидных конструкций для получения VLP системы NanoMEDIC. Плазмиды pHLS-EF1α-FRB-SpCas9-A и pHLS-EF1α-FKBP12-Gag(HIV) модифицировали путем добавления элемента RRE вируса ВИЧ-1 (RRE) между кодирующей последовательностью (FRB-Cas9 или FKBP12-Gag) и сигналом полиаденилирования (pA). EF1α – промотор гена EEF1A1 человека.

слитый белок, высвобождая Cas9. Было обнаружено, что протеаза вируса ВИЧ способна частично разрушать нуклеазу Cas9 [5]. Для предотвращения деградации Cas9 была разработана система сборки VLP NanoMEDIC, в которой упаковка Cas9 в VLP основана на димеризации Cas9, слитой с доменом FRB (FRB-Cas9), с белком Gag из вируса ВИЧ, слитым с доменом FKBP12. В присутствии рапамицина или его аналогов домены FKBP12 и FRB димеризуются, в результате чего нуклеаза Cas9 привлекается в упаковывающиеся частицы, а в клетках-мишенях концентрация димеризатора падает, и Cas9 высвобождается из комплекса с Gag [5].

Геном ретровирусов содержит так называемые Rev response element (RRE), которые необходимы для экспорта несплайсированных вирусных транскриптов из ядра в цитоплазму. У вируса ВИЧ аксессуарный белок Rev связывается с RRE и помогает экспорту по CRM1-зависимому пути [9]. У более простых ретровирусов молекулы РНК-генома содержат так называемые constitutive transport elements (CTEs), которые привлекают компоненты NXF1/NXT1-зависимого пути экспорта вирусных транскриптов. Есть данные о том, что добавление RRE элемента к транскрипту в присутствии белка Rev значительно ускоряет экспорт транскрипта в цитоплазму и приводит к более быстрому накоплению белка-репортера [10]. Подобное наблюдение было сделано и для CTE сигнала вируса М-PMV

[10]. В работе [Indikova et al., 11] была предложена система для сборки VLP на основе слитого белка Vpr-Cas9, и для повышения эффективности сборки VLP в генетическую конструкцию, кодирующую Vpr-Cas9, были добавлены элементы RRE или CTE. Оказалось, что RRE-Rev модуль примерно в два раза повышал уровень упаковки Vpr-Cas9 в VLPs по сравнению с CTE-сигналом [11]. Однако в данной работе не проводилось сравнение эффективности упаковки Vpr-Cas9 в VLP между конструкциями несущими RRE или CTE и без таковых [11]. Таким образом, остается непонятным, каков был вклад RRE-Rev модуля в улучшенную упаковку Vpr-Cas9 в VLP по сравнению с конструкциями без RRE. В данной работе мы решили выяснить, можно ли повысить эффективность упаковки нуклеазы Cas9 и белка Gag в VLP системы NanoMEDIC за счет RRE-Rev-зависимого экспорта транскриптов из ядра. Для этого был оценен эффект добавления RRE-элементов в генетические конструкции, кодирующие FRB-Cas9 и FKBP12-Gag, на уровень соответствующих белков в клеточных лизатах и VLP системы NanoMEDIC.

Вначале на основе ранее описанных плазмид системы NanoMEDIC pHLS-EF1α-FRB-SpCas9-A (Addgene # 138477) и pHLS-EF1α-FKBP12-Gag(HIV) (Addgene # 138476), любезно предоставленных [Akitsu Hotta, 5], были получены конструкции, несущие элемент RRE вируса ВИЧ-1 между кодирующей последовательностью и сигналом полиаденилирования (рис. 1). Для этого элемент RRE амплифицировали в ПЦП на матрице плазмиды pUCHR (описана ранее в [12]) с праймерами 5'-EcoRI-BstBI-RRE (5-CCGAATTCGAAGAGCAG TGGGAATAGGAGC-3) и 3'-PspXI-RRE (5-CGAC TCGAGGAGCTGTTGATCCTTTAGG-3) и клонировали по сайтам EcoRI/PspXI в pHLS-EF1α-FRB-SpCas9-A или по сайтам BstBI/PspXI в вектор pHLS-EF1α-FKBP12-Gag(HIV). Далее оценивали эффект от введения RRE элементов на уровень продукции белков FRB-Cas9 и FKBP12-Gag при транзитной трансфекции в клетки линии HEK293T (получены из NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, США), которые культивировали при 37 °C в увлажненной атмосфере в присутствии 5% CO₂ в среде Dulbecco's modified Eagle's medium (HyClone, #SH30285.01), содержащей 10%-ю фетальную бычью сыворотку (HyClone, США, #SV30160.03), 2 mM L-глутамин (Gibco, США, #25003-024), 1000 ед./мл пенициллина и 1000 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США, 15140-122) и 400 мкг/мл G418 сульфата (Calbiochem, Германия, #345812). Клетки рассевали в 24-х луночные планшеты (Costar, США, #3524) в плотности 100-150 тыс. в лунку, и трансфицировали плазмидами для экспрессии FRB-Cas9 или FKBP12-Gag, содержащими RRE элемент или без такового, вместе с плазмидой для экспрессии

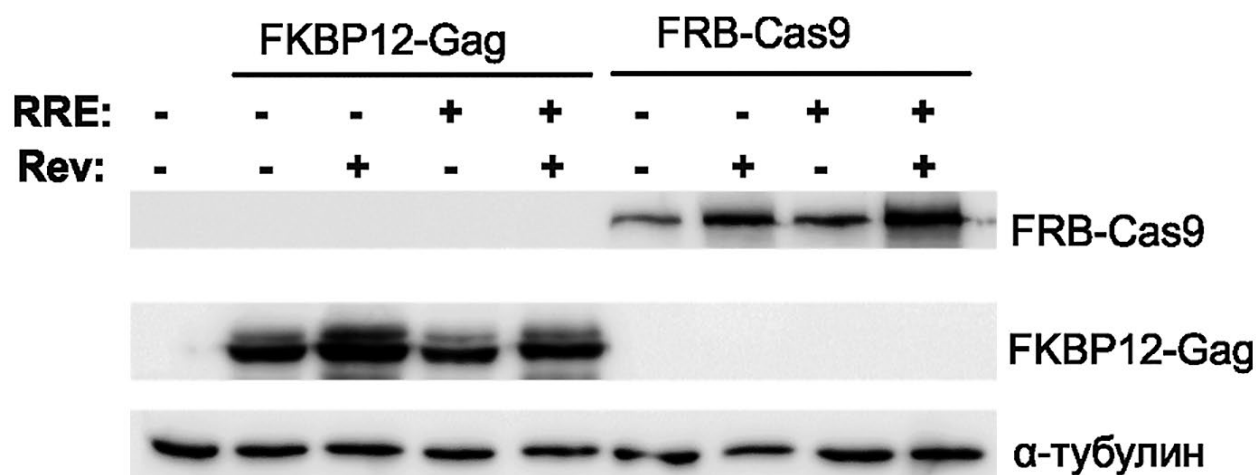


Рис. 2. Влияние экспрессии белка Rev на уровень продукции FRB-Cas9 и FKBP12-Gag. Лизаты клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами для экспрессии FRB-Cas9 и FKBP12-Gag с элементами RRE (RRE+) или без таковых (RRE-) вместе с плазмидой для экспрессии белка Rev (Rev+) или контрольной плазмидой pBluescriptSKII(-) (Rev-), анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с антителами к HA-эпиту (FRB-Cas9), белку ВИЧ p27 (FKBP12-Gag) и α -тубулину для контроля суммарного уровня белка в лизатах клеток. Показаны результаты одного из двух репрезентативных экспериментов.

белка Rev (pRSV-Rev, Addgene #12253, любезно предоставлена Дидье Троно и описана ранее [13] или вместе с контрольной плазмидой pBluescriptSKII(-) (Stratagene, США), которая не содержит функциональных генетических элементов млекопитающих, в соотношении 1:1. Клетки трансфицировали, используя реагент GenJect™-39 (Molox, Россия) в соответствии с протоколом производителя, используя 500 нг плазмидной ДНК на лунку. Через 48 ч после трансфекции клетки лизировали в 1-кратном буфере для ДСН-ПААГ и полученные лизаты анализировали с помощью вестерн-блоттинга с мышиными моноклональными антителами к белку p17 HIV Type 1 клон 32/5.8.42 (Zeptomatrix, США, #0801005) в разведении 1:2500, мышиными моноклональными антителами к α -тубулину, клон DM1 α (Sigma-Aldrich, США, #T6199), в разведении 1:2000, и кроличьими поликлональными антителами к HA-эпиту для детекции Cas9 (Cell Signaling, Нидерланды, #3724S), разведение 1:2000. Хемилуминесцентный сигнал детектировали с помощью системы гель-документации ChemiDoc MP (Bio-Rad, США), используя набор реагентов Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, США). Денситометрический анализ результатов вестерн-блоттинга проводили с помощью программы Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad). В результате было установлено, что котрансфекция плазмиды для экспрессии белка Rev приводила к 1.76-кратному повышению уровня FRB-Cas9-RRE в клеточных лизатах (рис. 2, FRB-Cas9, образцы Rev+ RRE+). Неожиданно, более выраженный эффект (3-кратное повышение уровня белка FRB-Cas9) отмечался в случае транскрипта без элемента RRE (см. рис. 2, FRB-Cas9,

образцы Rev+ RRE-). Для белка FKBP12-Gag было выявлено незначительное повышение уровня белка примерно в 1.2-раза при котрансфекции плазмиды для экспрессии Rev, также не зависящее от наличия в транскрипте элемента RRE (рис. 2, FKBP12-Gag, Rev+ и Rev-). Полученные результаты указывают либо на неспецифический эффект от котрансфекции плазмиды pRSV-Rev, либо на то, что эффект от экспрессии белка Rev не зависит от его способности стимулировать экспорт мРНК из ядра за счет связывания с RRE элементами.

Для проверки этих гипотез был проведен контрольный эксперимент, в котором плазмиды для экспрессии FRB-Cas9 и FRB-Cas9-RRE котрансфицировали вместе с плазмидой pRSV-Rev (рис. 3, Rev) или с контрольными плазмидами pBluescriptSKII(-) (pBI), pCMV-pA (CMV) и pEYFP-N1 (Clontech, США) (EYFP). Плазмида pCMV-pA получена ранее в лаборатории и содержит промотор цитомегаловируса человека и сигнал полиаденилирования вируса SV40, но не содержит кДНК. Плазмида pEYFP-N1 экспрессирует флуоресцентный белок EYFP под контролем промотора CMV и сигнала полиаденилирования вируса SV40. В результате было установлено, что уровень белка FRB-Cas9 повышался при котрансфекции как pRSV-Rev (в 1.66 для FRB-Cas9 и в 1.25 для FRB-Cas9-RRE), так и контрольной плазмиды pCMV-pA (в 1.39 для FRB-Cas9 и в 1.9 для FRB-Cas9-RRE), независимо от присутствия в транскрипте элемента RRE (рис. 2a). Таким образом, наблюдаемый эффект на уровень белка FRB-Cas9, по всей видимости, не связан с взаимодействием белка Rev с RRE-элементом, а яв-

ляется следствием неспецифического эффекта при котрансфекции плазмиды.

Дополнительно были получены плазмиды на основе pRSV-Rev с нарушенной кодирующей последовательностью белка Rev. Для этого плазмиду pRSV-Rev либо обрабатывали рестриктазой BamHI, после чего липкие концы плазмиды достраивали с помощью фрагмента Кленова и лигировали вектор сам на себя. В результате в кодирующей последовательности Rev образуется преждевременный стоп-кодон, таким образом экспрессируется укороченный белок Rev с 1 по 61 аминокислоту (RevΔB). В другом варианте плазмиду pRSV-Rev обрабатывали рестриктазами PspXI-BamHI, удаляя N-концевой фрагмент белка Rev вместе со старт-кодоном (RevΔBP). Полученная плаزمида не содержит старт-кодон в одной рамке считывания с С-концевой частью белка Rev и не должна экспрессировать даже минимальные фрагменты этого белка. В результате трансфекции полученных плазмид вместе с FRB-Cas9 было обнаружено 2-кратное повышение уровня FRB-Cas9 при экспрессии Rev, но не RevΔB или RevΔBP (см. рис. 2б). Полученный результат указывает на то, что помимо неспецифического эффекта от транзитной трансфекции, наблюдаемый эффект от трансфекции плазмиды pRSV-Rev частично может быть связан с функцией Rev, не ассоциированной с влиянием на экспорт мРНК из ядра. Однако для FRB-Cas9-RRE в данном эксперименте не было обнаружено существенного эффекта от котрансфекции плазмид с Rev (см. рис. 2б). С одной стороны, это противоречит результатам на рис. 1 и 2а, но с другой стороны, эффект от экспрессии Rev в этих экспериментах составлял всего 1.75 и 1.25. Поэтому вариабельность результатов может быть обусловлена малой величиной наблюдаемого эффекта при котрансфекции плазмиды для экспрессии Rev вместе с FRB-Cas9-RRE либо быть артефактом транзитной трансфекции (см. ниже).

Для выявления эффекта RRE-Rev модуля на упаковку Cas9 и Gag в VLP системы NanoMEDIC получали VLP, используя плазмиды для экспрессии соответствующих белков с RRE элементом или без такового в присутствии или отсутствии плазмиды для экспрессии Rev. В частности, для продукции VLP $2 \cdot 10^5$ клеток HEK293T рассеивали в лунки 12-луночного планшета в 1 мл полной среды (DMEM/F12 ("ПанЭко", Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки телят (HyClone), 4 mM L-глутамина и 40 мг/л гентамицина ("ПанЭко"). Через 24 ч клетки трансфицировали, используя 0.1 мкг плазмиды pHLF-EF1α-FRB-Cas9 или pHLF-EF1α-FRB-Cas9-RRE, 0.1 мкг плазмиды pHLS-EF1α-FKBP12-Gag или pHLS-EF1α-FKBP12-Gag-RRE, 0.04 мкг плазмиды pCMV-VSV-G (Addgene

#8454, любезно предоставлена Бобом Вайнбергом и описана ранее [14]), 0.08 мкг pKSgRNA-GFPt (плазмида для экспрессии геновой РНК, направленной к кДНК белка TurboGFP, мишень: GATGCGGCACTCGATCTCCATGG) с добавлением 0.1 мкг плазмиды pRSV-Rev или pBluescriptII KS (+). Для трансфекции использовали трансфекционный реагент GenJect-39 ("Молекта") в соотношении 1:2 (мкг ДНК : мкл GenJect) и среду OptiMEM (Gibco). Через 4 ч после добавления к клеткам комплексов ДНК/GenJect среду меняли на свежую, предварительно прогретую до 37°C, для образцов с димеризатором в среду добавляли реагент AP21967 (Takara Bio Inc., Япония) до конечной концентрации 300 нМ.

Для получения препарата VLP через 48 ч после трансфекции отбирали супернатант, центрифугировали его 5 мин при 3600 g, после чего переносили в новые пробирки и центрифугировали при 4 °C и 21 000 g в течение 2.5 ч. Супернатант отбирали, оставляя около 15 мкл жидкости над осадком, содержащим VLP. Суммарный объем доводили до 20 мкл с помощью OptiMEM (Gibco), смешивали с 4-кратным буфером для ДСН-ПААГ (250 mM Трис-HCl, pH = 6.8, 40%-ный глицерин, 8%-ный ДСН, 4%-ный 2-меркаптоэтанол и 0.2%-ный бромфеноловый синий) и инкубировали в течение 5 мин при 80 °C. Параллельно клетки-продуценты вирусоподобных частиц трипсинизировали с помощью раствора трипсина-ЭДТА 0.05% ("ПанЭко"), отмывали в буфере PBS, суспендировали на холоду в 120 мкл лизирующего буфера, содержащего 20 mM Трис-HCl pH = 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 1% (w/v) "Тритон X-100", 1 mM фенилметилсульфонилфторида и инкубировали при 4 °C 15 мин. Затем лизаты центрифугировали 10 мин при 4 °C и 12 000 g, после чего супернатанты смешивали с 4-кратным буфером образца для ДСН-ПААГ и инкубировали в течение 5 мин при 80 °C.

Далее проводили вестерн-блот-анализ полученных препаратов VLP и лизатов клеток-продуцентов с антителами к НА-эпиту, белку Gag и α-тубулину. В результате было установлено, что обработка клеток веществом AP21967, вызывающим димеризацию FRB и FKBP12, приводит к примерно 2-3-кратному повышению уровня упаковки Cas9 в VLP, что было описано ранее для системы NanoMEDIC [5] (рис. 4, образцы AP+). При этом уровень упаковки Cas9 в VLP в образцах без добавления AP21967 был примерно в два раза выше для RRE-транскриптов, но не зависел от присутствия Rev. В образцах, обработанных AP21967, уровень Cas9 существенно не различался между образцами с RRE и без такового. Анализ клеточного лизата выявил повышение уровня белка Cas9 примерно в два раза во всех образцах, трансфицированных

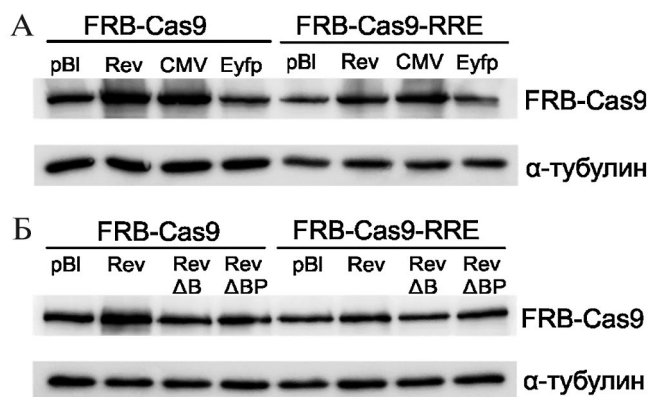


Рис. 3. Оценка специфичности эффекта от экспрессии белка Rev на уровень продукции FRB-Cas9. Лизаты клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами для экспрессии FRB-Cas9 с элементами RRE или без таковых (RRE-) вместе с плазмидами (а) для экспрессии белков Rev и EYFP или контрольными плазмидами pBluescriptSKII(-) (pBI) и pCMV-pA (CMV), или (б) для экспрессии белка Rev, его укороченной формы (RevΔB), плазмиды с делецией N-концевой части кДНК Rev (RevΔBP) и контрольной плазмиды (pBI) анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с антителами к HA-эпиту (FRB-Cas9) и α-тубулину для контроля суммарного уровня белка в лизатах клеток. Показаны результаты одного из двух репрезентативных экспериментов.

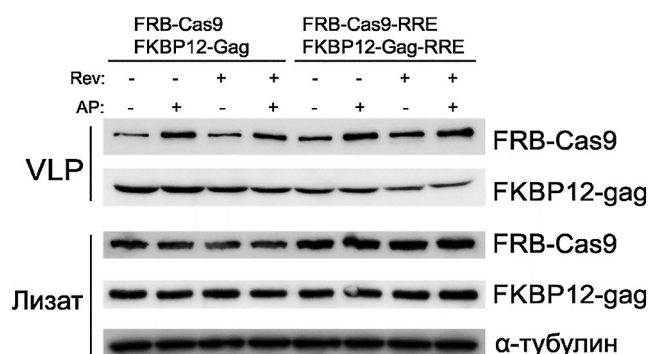


Рис. 4. Влияние RRE-элементов на упаковку нуклеазы Cas9 в VLP системы NanoMEDIC. VLP получали, как описано в тексте, используя плазмиды для экспрессии FRB-Cas9 и FKBP12-Gag с элементами RRE или без таковых в присутствии белка Rev (Rev+) или без белка Rev (Rev-). Для индукции димеризации FRB и FKBP12 клетки обрабатывали веществом AP21967 в концентрации 300 нМ (AP+) или ДМСО (AP-). Через 48 ч после трансфекции получали лизаты VLP и клеток-продуцентов и анализировали их с помощью Вестерн-блоттинга с антителами к HA-эпиту (FRB-Cas9), белку ВИЧ p17 (FKBP12-Gag) и α-тубулину для контроля суммарного уровня белка в лизатах клеток. Показаны результаты одного из двух репрезентативных экспериментов.

плазмидами с RRE элементом, не зависящее от присутствия Rev (см. рис. 4, панель лизаты, FRB-Cas9). По всей видимости повышенный уровень

упаковки Cas9 в VLP в клетках, трансфицированных RRE плазмидами и не обработанных AP21967, обусловлен повышением уровня Cas9 в лизатах. Кроме того, при получении VLP для трансфекции используется смесь из четырех плазмид, поэтому возможное влияние плазмиды pRSV-Rev на уровень белка FRB-Cas9 в данных условиях может быть менее выражено по сравнению с экспериментами с котрансфекцией двух плазмид.

Таким образом, было установлено, что лишь обработка клеток димеризатором AP21967 оказывала существенный эффект на уровень упаковки Cas9 в VLP. Присутствие элемента RRE повышало уровень Cas9 в лизатах и уровень упаковки Cas9 в VLP без обработки димеризатором AP21967, однако при добавлении AP21967 уровень упаковки Cas9 в VLP был примерно одинаков во всех образцах. Это свидетельствует о том, что основную роль при упаковке Cas9 в частицы системы NanoMEDIC играет именно AP21967-индуцированная димеризация FRB и FKBP12, но не модификация плазмид с помощью элемента RRE или ко-трансфекция плазмиды, экспрессирующей Rev.

Доставка РНП с помощью VLP для редактирования генома с терапевтическими целями сходна по эффективности с электропорацией РНП [7]. При этом VLP можно псевдотипировать различными белками вирусной оболочки, тем самым направляя в определенный тип клеток *in vivo* [7]. Наконец, доставка РНП снижает вероятность редактирования нецелевых локусов из-за быстрой деградации белка Cas9, а также элиминирует риск инсерционного мутагенеза из-за отсутствия вирусного генома [15]. Все это в совокупности определяет актуальность развития методов эффективной продукции VLP.

В данной работе был оценен эффект от модификации транскриптов элементами RRE для повышения упаковки FRB-Cas9 и FKBP12-Gag в частицы системы NanoMEDIC в присутствии акцессорного белка Rev. Было выявлено, что транзитивно котрансфицируемые плазмиды, как для экспрессии Rev, так и контрольные, не содержащие кДНК, могут неспецифически влиять на уровни белков Cas9 и Gag в клеточных лизатах. При этом эффект не зависит от наличия элемента RRE в этих плазмидах. Известно, что при транзитивной котрансфекции плазмидных векторов могут наблюдаться различные артефакты, включая активацию репортерных генов пустыми плазмидными векторами [16], а также ряд других парадоксальных эффектов (см. обзор [17]). Это может объяснить полученные в данной работе результаты.

Влияние модуля RRE-Rev на уровень упаковки нуклеазы Vpr.Prot.Cas9 в VLP было показано в ра-

боте [Indikova et al, 11]. Уровень упаковки Vpr.Prot. Cas9 в VLP был в два раза выше для RRE по сравнению со СТЕ-элементом, однако уровень Vpr.Prot. Cas9 в лизатах не различался между транскриптами с СТЕ и RRE элементами. Важно отметить, что в данной работе не проводилось сравнения с контрольным транскриптом, не содержащим RRE или СТЕ элементы. В качестве источника белка Rev авторы использовали плазмиды pRSV-Rev и упаковочную плазмиду psPAX2, несущую также гены gag и pol. Наличие двух плазмид, кодирующих Rev, вероятно, обеспечивает более высокий уровень белка Rev по сравнению с нашей экспериментальной системой. Однако и в этом случае отсутствовал необходимый контроль в виде оценки упаковки Vpr.Prot.Cas9-RRE в VLP в отсутствие плазмиды pRSV-Rev. Таким образом, отсутствие важных контролей, а также вероятность детекции артефактов транзитной котрансфекции не позволяют сделать вывод о необходимости модуля RRE-Rev для повышения эффективности упаковки Vpr.Prot.Cas9. Результаты нашей работы указывают на то, котрансфекция не только pRSV-Rev, но и контрольных плазмид, не экспрессирующих Rev, обладает неспецифическим эффектом на уровень экспрессии FRB-Cas9 в лизатах, и это не зависит от наличия RRE элемента в транскрипте. Более того, было обнаружено, что именно AP21967-индуцированная димеризация FRB и FKBP12 играет основную роль при упаковке Cas9 в частицы системы NanoMEDIC, но не модификация плазмид с помощью элемента RRE или котрансфекция плазмиды, экспрессирующей Rev.

В настоящий момент основной способ получения VLP — это транзитная котрансфекция нескольких плазмид [4, 5, 7, 11]. Результаты данной работы указывают на нецелесообразность использования RRE-Rev модуля для повышения упаковки нуклеазы Cas9 в VLP системы NanoMEDIC. Полученные артефактные результаты при транзитной котрансфекции определенных плазмид указывают на необходимость тщательного контроля условий получения VLP для выявления факторов, повышающих эффективность упаковки нуклеазы Cas9 в VLP. Мы предполагаем, что создание стабильных клеточных линий, экспрессирующих некоторые из компонентов, необходимых для сборки функциональных VLP, может помочь в стандартизации и оптимизации условий получения VLP.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием инфраструктуры Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института биологии гена РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00381).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследований с участием людей и/или животных не проводилось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doudna J.A. // *Nature*. 2020. V. 578. № 7794. P. 229–236.
2. Lino C.A., Harper J.C., Carney J.P., Timlin J.A. // *Drug Deliv*. 2018. V. 25. № 1. P. 1234–1257.
3. Mazurov D., Ramadan L., Kruglova N. // *Viruses*. 2023. V. 15. № 3. P. 690.
4. Banskota S., Raguram A., Suh S., Du S.W., Davis J.R., Choi E.H., Wang X., Nielsen S.C., Newby G.A., Randolph P.B., et al. // *Cell*. 2022. V. 185. № 2. P. 250–265.e16.
5. Gee P., Lung M.S.Y., Okuzaki Y., Sasakawa N., Iguchi T., Makita Y., Hozumi H., Miura Y., Yang L.F., Iwasaki M., et al. // *Nat Commun*. 2020. V. 11. № 1. P. 1334.
6. Mangeot P.E., Risson V., Fusil F., Marnef A., Laurent E., Blin J., Mournetas V., Massouridès E., Sohler T.J.M., Corbin A., et al. // *Nat Commun*. 2019. V. 10. № 1. P. 45.
7. Hamilton J.R., Tsuchida C.A., Nguyen D.N., Shy B.R., McGarrigle E.R., Sandoval Espinoza C.R., Carr D., Blaeschke F., Marson A., Doudna J.A. // *Cell Rep*. 2021. V. 35. № 9. P. 109207.
8. Montagna C., Petris G., Casini A., Maule G., Franceschini G.M., Zanella I., Conti L., Arnoldi F., Burrone O.R., Zentilin L., et al. // *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018. V. 12. P. 453–462.
9. Fernandes J., Jayaraman B., Frankel A. // *RNA Biol*. 2012. V. 9. № 1. P. 6–11.
10. Pocock G. M., Becker J. T., Swanson C. M., Ahlquist P., Sherer N. M. // *PLoS Pathog*. 2016. V. 12. № 4. P. e1005565.
11. Indikova I., Indik S. // *Nucleic Acids Res*. 2020. V. 48. № 14. P. 8178–8187.
12. Mazurov D., Ilinskaya A., Heidecker G., Lloyd P., Derse D. // *PLoS Pathog*. 2010. V. 6. № 2. P. e1000788.
13. Dull T., Zufferey R., Kelly M., Mandel R.J., Nguyen M., Trono D., Naldini L. // *J Virol*. 1998. V. 72. № 11. P. 8463–8471.
14. Stewart S.A., Dykxhoorn D.M., Palliser D., Mizuno H., Yu E.Y., An D.S., Sabatini D.M., Chen I.S.Y., Hahn W.C., Sharp P.A., et al. // *RNA*. 2003. V. 9. № 4. P. 493–501.
15. Han X., Liu Z., Ma Y., Zhang K., Qin L. // *Adv Biosyst*. 2017. V. 1. № 1–2. P. e1600007.
16. Hu Q., Suzuki K., Hirschler-Laszkiwicz I., Rothblum L.I. // *Biotechniques*. 2002. V. 33. № 1. P. 74, 76, 78 passim.
17. Stepanenko A.A., Heng H.H. // *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017. V. 773. P. 91–103.

THE RRE-REV MODULE HAS NO EFFECT ON THE PACKAGING EFFICIENCY OF CAS9 AND GAG PROTEINS INTO NANOMEDIC VIRUS-LIKE PARTICLES

N. A. Kruglova^a, D. S. Komkov^{a, b}, D. V. Mazurov^{a, c}, M. V. Shepelev^{a, #}

Presented by Academician of the RAS P.G. Georgiev

^a*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b*Current address: Department of Physiology and Cell Biology, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Be'erSheva, Israel*

^c*Current address: Division of Infectious Diseases and International Medicine, Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, USA*

[#]*E-mail: shepelev@mail.ru*

Delivery of ribonucleoprotein complexes of Cas9 nuclease and guide RNA into target cells with virus-like particles (VLP) is one of the novel methods of genome editing, suitable for gene therapy of human diseases in the future. Efficiency of genome editing with VLPs depends on the packaging of Cas9 into VLPs, that is mediated by viral Gag protein. To increase the packaging of Cas9 into NanoMEDIC system VLPs plasmid constructs for expression of Cas9 and Gag were modified by the addition of HIV RRE (Rev response element), that is expected to increase the nuclear export of RRE-containing transcripts to cytosol via accessory protein Rev, as described for Vpr-Cas9-based VLP system. Here we found that Cas9 and Gag protein levels in the cell lysates are increased upon cotransfection of either Rev-expressing plasmid or empty control plasmid. Moreover, this effect does not depend on the presence of RRE in the transcript. On the top of that, we showed that AP21967-induced dimerization of FRB and FKBP12, but not the modification of plasmids with RRE and/or cotransfection of Rev-expressing plasmid, plays the major role in packaging of Cas9 into NanoMEDIC system VLPs. These data suggest that it is impractical to use the RRE-Rev module to enhance the packing of Cas9 nuclease into VLPs.

Keywords: CRISPR/Cas9, VLP, RNP, HIV, RRE, Rev.