

Редактирование генов корецепторов ВИЧ CXCR4 и CCR5 с помощью трех типов вирусоподобных частиц, содержащих рибонуклеопротеиновые комплексы SpCas9 или AsCas12a.

Научный руководитель – Круглова Наталья Андреевна

Ксенофонтова Анастасия Викторовна

Студент (бакалавр)

Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева,
Агрономии и биотехнологии, Москва, Россия
E-mail: nastyaksen2003@gmail.com

CRISPR/Cas9 – это инструмент генетического редактирования, основанный на механизме адаптивной иммунной системы прокариот. Несмотря на широкое применение этой системы, ее использование все еще во многом ограничено трудностями, связанными с доставкой компонентов CRISPR/Cas в клетки.

Одним из перспективных методов доставки является доставка нуклеазы и гидовой РНК (гРНК) в форме рибонуклеопротеинового комплекса (РНП) внутри вирусоподобных частиц (VLP). Такой способ позволяет снизить токсичное действие на клетки, уменьшить уровень нецелевого редактирования и нацеливать частицы на разные типы клеток. [1] Среди различных описанных конструкций VLP высокую эффективность показали три варианта – NanoMEDIC, Cas9-VLP, eVLP. Однако прямого сравнения данных конструкций и различных нуклеаз в их составе не проводилось. Поэтому для дальнейшего усовершенствования технологии генетического редактирования эукариотических клеток с помощью CRISPR/Cas мы провели сравнение эффективности редактирования при использовании этих трех типов VLP для доставки CRISPR/Cas в форме РНП-комплекса, а также сравнили работу двух Cas-нуклеаз в их составе – SpCas9 и AsCas12a. Благодаря особым свойствам нуклеазы AsCas12a для нее возможно использование гРНК под контролем промотора CMV, транскрипты с которого направлено выходят в цитоплазму и потенциально могут эффективнее упаковываться в VLP. Для проверки данной гипотезы мы оценили эффективность редактирования при использовании в составе VLP с AsCas12a гРНК под контролем двух разных промоторов – U6 и CMV (U6-гРНК и CMV-гРНК).

Сравнение эффективности редактирования проводилось на клинически значимых для генотерапии ВИЧ локусах в двух клеточных линиях: T клеточной линии Jurkat для эндогенного локуса CXCR4 и в клетках 293T/CD4/CCR5 clone 19 для трансгенного локуса CCR5.

Предварительно мы провели оптимизацию наработки и трансдукции вирусоподобных частиц и выбрали условия, позволившие повысить уровень нокаута репортера *Venus* в клетках 293-Venus и значительно упростить процесс работы с VLP.

При тестировании вирусоподобных частиц в клеточной линии 293T/CD4/CCR5 clone 19, было выявлено, что VLP, содержащие в своем составе нуклеазу AsCas12a и CMV-гРНК, снижали уровень CCR5 на поверхности клеток эффективнее других частиц. Согласно результатам проточной цитометрии с иммунофлуоресцентным окрашиванием клеток, максимальный уровень нокаута для всех трех типов VLP с AsCas12a и CMV-гРНК составил около 90%. Среди VLP с SpCas9 и AsCas12a с U6-гРНК самую высокую эффективность показали частицы NanoMEDIC, нокаут при их использовании составил 36% и 82% соответственно.

В клеточной линии Jurkat аналогично были протестированы все типы VLP: три типа с SpCas9 и U6-гРНК, с AsCas12a и U6-гРНК и с AsCas12a и CMV-гРНК.

Источники и литература

- 1) 1. Mazurov D, Ramadan L, Kruglova N. Packaging and Uncoating of CRISPR/Cas Ribonucleoproteins for Efficient Gene Editing with Viral and Non-Viral Extracellular Nanoparticles. Viruses. 2023; 15(3):690. <https://doi.org/10.3390/v15030690>