

УДК 577.29

СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ НОКИНА КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩЕЙ ПЕПТИДНЫЙ ИНГИБИТОР СЛИЯНИЯ ВИЧ-1 МТ-С34, В ЛОКУС *CXCR4* В Т-КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ СЕМ/R5

© 2024 г. Д. С. Голубев^а, Д. С. Комков^{а, б}, М. В. Шепелев^а, Д. В. Мазуров^{а, с}, Н. А. Круглова^{а, *}^аЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия^бDepartment of Physiology and Cell Biology, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, 8410501 Israel^сDivision 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 31.10.2023 г.

После доработки 25.11.2023 г.

Принята к публикации 04.12.2023 г.

Низкая эффективность нокина генетических конструкций, особенно в первичных клетках человека, ограничивает применение технологии редактирования генома для терапевтических целей. Таким образом, остается актуальным поиск способов повышения нокина. В представленной работе на модели нокина конструкции, кодирующей пептидный ингибитор слияния ВИЧ-1 МТ-С34, в локус *CXCR4* человека в Т-клеточной линии СЕМ/R5 изучены возможности нескольких подходов к повышению эффективности этой технологии. В первую очередь оценена модификация донорной ДНК как способа повышения эффективности транспорта плазмид в ядро, а именно: введение в донорную плазмиду последовательностей DTS (DNA transporting sequence) вируса-40 обезьян (SV40) или сайтов связывания транскрипционного фактора NF-κB, влияние которых на уровень нокина было неизвестно. На использованной нами модели нокина в локус *CXCR4* такая модификация оказалась неэффективной. Второй подход, заключающийся в модификации нуклеазы Cas9 путем введения двух дополнительных сигналов ядерной локализации (NLS), позволил повысить уровень нокина на 30%. Наконец, блокировка репарации ДНК по пути негомологичного соединения концов с помощью ингибиторов ДНК-зависимой протеинкиназы вызвала повышение нокина в 1.8 раз. Комбинация двух последних подходов дала аддитивный эффект. Таким образом, с помощью увеличения числа NLS в белке Cas9 и ингибирования репарации ДНК по пути негомологичного соединения концов нам удалось значительно повысить уровень нокина конструкции, кодирующей пептидный ингибитор слияния ВИЧ-1, в клинически релевантный локус *CXCR4*, что может быть использовано для разработки эффективных генотерапевтических подходов к лечению ВИЧ-инфекции.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, редактирование генома, гомологичная рекомбинация, Т-лимфоциты, нокин, ингибиторы NHEJ, DTS, сигнал ядерной локализации

DOI: 10.31857/S0026898424040044, EDN: INCWAY

Технологии геномного редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9 позволяют вводить направленные изменения в геном клеток млекопитающих [1]. Наиболее часто используемая эндонуклеаза Cas9 из *Streptococcus pyogenes* с помощью

короткого РНК-гида (гРНК) распознает последовательность-мишень в геноме и вносит двухцепочечный разрыв (double-strand break, DSB) в строго определенном месте [2]. В клетках млекопитающих репарация DSB происходит наиболее эффективно по механизму негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ), что приводит к формированию инделов, вызывающих сдвиг рамки считывания и нокаут гена. NHEJ – самый быстрый способ репарации и функционирует в любой фазе клеточного цикла [3]. Другой путь репарации DSB – по пути гомологичной рекомбинации (homology-directed repair, HDR) – происходит в присутствии донорной ДНК и позволяет

Сокращения: гРНК – РНК-гид; DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) – ДНК-зависимая протеинкиназа; DSB (double-strand break) – двухцепочечный разрыв; DTS (DNA transporting sequence) – сигнал транспорта ДНК; HDR (homology-directed repair) – репарация по пути гомологичной рекомбинации; NHEJ (non-homologous end joining) – негомологичное соединение концов; SV40 (Simian virus 40) – вирус-40 обезьян.

проводить нокин целевых последовательностей в заданный локус генома. Однако эффективность репарации DSB по механизму HDR существенно ниже по сравнению с NHEJ, а активность HDR ограничена только S- и G2-фазами клеточного цикла [3].

Система CRISPR/Cas9 широко применяется для разработки новых методов генной терапии и уже используется в клинических испытаниях для лечения ряда наследственных болезней, включая серповидноклеточную анемию и бета-талассемию, а также онкологические и инфекционные заболевания [4]. Большое внимание уделяется редактированию T-клеток *ex vivo* для придания им противоопухолевых свойств или устойчивости к заражению ВИЧ [5, 6]. В настоящее время гораздо большие успехи достигнуты в случае, когда требуется провести нокаут гена по сравнению с введением новых последовательностей с использованием технологии нокина. Низкий уровень нокина, в особенности в первичных клетках человека, по-прежнему остается одним из главных ограничений для применения CRISPR/Cas9 в терапии. Для решения этой проблемы предложены различные подходы к повышению эффективности HDR и, как следствие, нокина [7].

Ранее нами разработана CRISPR/Cas9-платформа для нокина коротких нуклеотидных последовательностей, кодирующих пептидные ингибиторы слияния ВИЧ-1 с клеткой [8]. Эта технология перспективна с точки зрения использования в клинике, однако, безусловно, требует дальнейшего усовершенствования. В частности, необходим эффективный нокин конструкций, кодирующих пептидные ингибиторы, в локусы генов-корцепторов ВИЧ. Нами был продолжен поиск способов повышения уровня нокина конструкции, кодирующей пептидный ингибитор слияния ВИЧ-1 MT-C34, в локус *CXCR4* (далее: нокин *MTC34*). Во-первых, предложено модифицировать донорную плазмиду для увеличения эффективности доставки целевой плазмиды в ядро. Для этого использовали сигналы DTS (DNA transporting sequence), которые при введении в плазмиду способствуют направленному транспорту плазмид в ядро [9]. Один из таких сигналов – энхансер SV40, с которым связываются клеточные транскрипционные факторы, включая AP1, AP2 и NF- κ B, и благодаря своим NLS-последовательностям переносят плазмиду из цитоплазмы в ядро [9, 10]. Например, плазмиды с DTS-сигналами обеспечивали более высокий уровень экспрессии репортера при введении в различные типы клеток [11, 12]. Кроме того, показано, что сайты связывания транскрипционного фактора NF- κ B также повышают уровень экспрессии репортерного гена люциферазы в клетках HeLa, HEK293, Hep G2 и U373 [13]; при этом максимальный эффект получали при стимуляции

клеток под действием TNF α , активирующего ядерную транслокацию NF- κ B [13]. Мы решили проверить, может ли модификация донорной ДНК сигналами DTS или сайтами связывания NF- κ B повысить уровень CRISPR/Cas9-опосредованного нокина. Второй подход был направлен на усиление активности Cas9 за счет увеличения числа NLS [14, 15]. Наконец, третий способ повышения эффективности нокина состоял в воздействии на клеточные пути репарации DSB с помощью низкомолекулярных соединений, ингибирующих NHEJ и стимулирующих HDR [16].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии. Клетки линии CEM/R5, полученные на основе T-клеточной линии CCRF-CEM (ATCC) [8], культивировали на среде DMEM/F12 (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (“HyClone”, США), 4 mM L-глутамин и 40 мг/л гентамицин (“ПанЭко”) при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂.

Конструирование плазмид. Плазмиды для эукариотической экспрессии Cas9 с 0×, 1× и 3× NLS конструировали на основе плазмиды pcDNA3.3-hCas9 (#41815; “Addgene”, США). Для этого амплифицировали C-концевой фрагмент Cas9 на матрице плазмиды pcDNA3.3-hCas9 с помощью праймеров 5'-EcoRI-Cas9 и 3'-C_end-Cas9 (последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в табл. 1; плазмидные конструкции, использованные и полученные в данной работе, указаны в табл. 2) и фрагмент, кодирующий эпитоп 3×HA, на матрице плазмиды pCMV-Cas12a-3×HA с праймерами 5'-3×HA и 3'-3×HA. Эпитоп 3×HA представлял собой трижды повторенную последовательность YPYDVPDYA, соответствующую участку 98–106 аминокислотной последовательности гемагглютинаина (HA) вируса гриппа человека. Далее амплифицированные фрагменты объединяли с помощью ПЦР по методу overlap extension и продукт реакции клонировали в вектор pJET1.2 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Фрагмент EcoRI-AgeI из pJET1.2 клонировали по соответствующим сайтам в плазмиду pcDNA3.3-hCas9, получая pcDNA3.3-hCas9-0×NLS-3×HA. Для создания конструкций с одним и тремя NLS фрагменты, кодирующие одну или три последовательности NLS, амплифицировали на матрице плазмиды SP-Cas9-3×NLS с праймерами 5'-linker-NLS_SV40 и 3'-linker-NLS и полученные фрагменты клонировали в вектор pBluescript KS(+) (“Stratagene”, США), из которого затем клонировали фрагменты Acc65I-NheI по соответствующим сайтам в плазмиду pcDNA3.3-hCas9-0×NLS-3×HA, получая pcDNA3.3-hCas9-1×NLS-3×HA, кодирующую Cas9 с одним NLS из SV40, и pcDNA3.3-hCas9-3×NLS-3×HA, кодирующую Cas9 с двумя NLS из SV40 и одним

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'
5'-EcoRI-Cas9	GAGCAAATAAGCGAATTCTCC
3'-C_end-Cas9	CTAGCACCAGCGGTACCGTCTCCACCGAGCTGAG
5'-3×HA	GGTACCGCTGGTGCTAGCTACCCATACGATGTTCCAG
3'-3×HA	ACTAACCGGTCAGGCATAGTCGGG
5'-linker-NLS_SV40	ATACGGTACCGGCTCCGGCACCCCGT
3'-linker-NLS_SV40	GGTAGCTAGCCGAGCCACCGCCCAC
5'-Xba-SV40dts-Nco	CTAGATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACC CTAACTGACACACATTCCACAG
3'-Xba-SV40dts-Nco	CATGCTGTGGAATGTGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG CAGGCAGAAGTATGCAAAGCAT
5'-Not-DTS-Psp	GGCCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACC CTAACTGACACACATTCCACAG
3'-Not-DTS-Psp	TGACTGTGGAATGTGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG CAGGCAGAAGTATGCAAAGCAT
5'-PstI-DTS-DraIII	GATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTA ACTGACACACATTCCACAGCT
3'-PstI-DTS-DraIII	TGTGGAATGTGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATCTGCA
5'-NF-κB_1_BbsI	GGCCGCTCTAGAGGGACTTTCCAGCTGGGGACTTTCCAGCTGGTCTTCAC
3'-NF-κB_1_BbsI	TCGAGTGAAGACCAGCTGGAAAGTCCCCAGCTGGAAAGTCCCTCTAGAGC
5'-NF-κB_2	CAGCTGGGGACTTTCCAGCTGGGGACTTTCCCCATGGGC
3'-NF-κB_2	TCGAGCCCATGGGGAAAGTCCCCAGCTGGAAAGTCCCCA

NLS из нуклеоплазмина (второй основной мотив PAAKKKK) [17].

Донорные плазмиды получали на основе плазмиды pJet-donor_MT-C34, описанной ранее [8]. Для создания плазмиды pJet-donor_MT-C34-3'DTS с одним DTS-сигналом одноцепочечные олигонуклеотиды 5'-Xba-SV40dts-Nco и 3'-Xba-SV40dts-Nco гибридизовали и полученный двухцепочечный олигонуклеотид клонировали в плазмиду pJet-donor_MT-C34 по сайтам XbaI-NcoI.

Для создания плазмиды pJet-donor_MT-C34-5'-3'DTS с двумя DTS-сигналами одноцепочечные олигонуклеотиды 5'-Not-DTS-Psp и 3'-Not-DTS-Psp гибридизовали и полученный двухцепочечный олигонуклеотид клонировали в плазмиду pJet-donor_MT-C34-3'DTS по сайтам NotI-PspXI.

Для создания плазмиды pJet-donor_MT-C34-2×5'-3'DTS с тремя DTS-сигналами одноцепочечные олигонуклеотиды 5'-PstI-DTS-DraIII и 3'-PstI-DTS-DraIII гибридизовали и полученный двухцепочечный олигонуклеотид клонировали в плазмиду pJet-donor_MT-C34-5'-3'DTS по сайтам PstI-DraIII.

Для получения донорных плазмид с сайтами связывания NF-κB сначала олигонуклеотиды 5'-NF-κB_1_BbsI, 3'-NF-κB_1_BbsI, 5'-NF-κB_2 и 3'-NF-κB_2 гибридизовали и клонировали в плазмиду pBluescript KS(+) по сайтам NotI-PspXI. Полученную плазмиду обрабатывали рестриктазами

NotI-PspXI или NcoI-XbaI для клонирования последовательности с 4 сайтами связывания NF-κB на 5'- или 3'-конец донорной ДНК в плазмиду pJet-donor_MT-C34 по соответствующим сайтам рестрикции. Далее последовательности всех сконструированных на основе вектора pJET1.2 донорных молекул клонировали из вектора pJET в вектор pBluescript KS(+) по сайтам PstI-ClaI.

Нуклеотидные последовательности всех сконструированных плазмид верифицировали с помощью секвенирования по Сэнгеру в компании “Евроген” (Россия). Всю плазмидную ДНК, кроме донорной, выделяли с помощью набора Plasmid Midiprep 2.0 (#BC124; “Евроген”), а плазмидные доноры – с использованием набора Plasmid Midi Kit (100) (#12145; “Qiagen”, Германия).

Электропорация. Для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в локус *CXCR4* 10⁶ клеток СЕМ/R5 электропорировали, используя 3 мкг плазмиды pcDNA3.3-hCas9 (#41815; “Addgene”), 1 мкг описанной ранее [8] плазмиды pKS-gRNA-X4ex2, кодирующей гРНК с мишенью в экзоне-2 гена *CXCR4* (спейсер: 5'-CACTTCAGATAACTACACCG-3', РАМ: AGG), а также 1 пмоль (~2.9–3.0 мкг) одной из донорных плазмид (все плазмиды приведены в табл. 2). Для трансфекции использовали прибор Neon electroporation system со 100-микролитровыми наконечниками (“Invitrogen”, США) и следующими

Таблица 2. Плазмидные конструкции, использованные в работе

Название	Описание	Источник/ссылка
pKSgRNA-X4ex2	Вектор для экспрессии гРНК против экзона-2 локуса <i>CXCR4</i>	[8]
pBluescript KS(+)	–	“Stratagene”
pJET1.2	–	“Thermo Fisher Scientific”
pCR-Blunt	–	“Invitrogen”
SP-Cas9-3×NLS	Плазмида для бактериальной экспрессии Cas9 с тремя NLS получена на основе плазмиды SP-Cas9 (#62731, “Addgene”)	Не опубликована
pJet-donor_MT-C34	Немодифицированный плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i>	[8]
pKS-donor_MT-C34	Немодифицированный плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i>	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-3'DTS	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный сигналом DTS на 3'-конце	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-5'-3'DTS	Плазмидный донор конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный двумя сигналами DTS: на 5'- и на 3'-конце	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-2×5'-3'DTS	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный тремя сигналами DTS: двумя на 5'- и одним на 3'-конце	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-3'-NF-κB	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный 4 сайтами связывания NF-κB на 3'-конце	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-5'-NF-κB	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный 4 сайтами связывания NF-κB на 5'-конце	Эта работа
pKS-donor_MT-C34-5'-3'-NF-κB	Плазмидный донор для нокина конструкции, кодирующей пептид MT-C34, в экзон-2 локуса <i>CXCR4</i> , модифицированный 4 сайтами связывания NF-κB на 5'- и на 3'-конце	Эта работа
pcDNA3.3-hCas9	Плазмида для эукариотической экспрессии Cas9 с одним NLS без эпитопных меток	“Addgene”
pcDNA3.3-hCas9-0×NLS-3×HA	Плазмида для эукариотической экспрессии Cas9 без NLS	Эта работа
pcDNA3.3-hCas9-1×NLS-3×HA	Плазмида для эукариотической экспрессии Cas9 с одним NLS	Эта работа
pcDNA3.3-hCas9-3×NLS-3×HA	Плазмида для эукариотической экспрессии Cas9 с тремя NLS	Эта работа
pCMV-Cas12a-3×HA	Плазмида для эукариотической экспрессии AsCas12a ^a с тремя HA-эпитопами	Не опубликована

^aНуклеаза Cas12a из *Acidaminococcus* sp.

настройками: 1230 В, 40 мс, один импульс. Уровень нокаута и нокина анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на 5 сутки после электропорации.

Низкомолекулярные соединения. Сразу после электропорации к клеткам добавляли низкомолекулярные соединения в следующих конечных концентрациях: 1 мкМ SCR7 (SML1546; “Sigma”, США), 1 мкМ RS1 (R9782; “Sigma”), 5 мкМ L755507 (SML1362; “Sigma”), 2 мкМ KU-0060648 (S8045; “Selleckchem”, США), 0.5 мкМ NU7441 (S2638; “Selleckchem”), 0.05 мкМ трихостатин А (“Cayman Chemical”, США) и 2 мкМ M3814 (S8586; “Selleckchem”). В качестве контроля использовали растворитель диметилсульфоксид (DMSO). Среду меняли через 24 ч после добавления этих соединений.

Проточная цитофлуориметрия. Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки СЕМ/R5 инкубировали в течение 30 мин при 4°C в фосфатно-солевом буфере (PBS) с описанными ранее [8] мышинными моноклональными антителами С24 против пептида МТ-С34 или с мышинными моноклональными антителами против CXCR4 (клон 12G5, “Santa Cruz Biotechnology”, США). Клетки дважды промывали в PBS и инкубировали с козьими антителами, конъюгированными с Alexa488 или Alexa546, против IgG мыши (“Thermo Fisher Scientific”) в течение 30 мин при 4°C. Далее клетки два раза промывали в PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (“BeckmanCoulter”, США). В качестве отрицательного контроля использовали клетки, обработанные только вторичными антителами.

Иммуноблотинг. Для анализа уровня Cas9 в электропорированных клетках через 1 сут после электропорации клетки СЕМ/R5 лизировали в буфере RIPA (20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 1% (w/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) дезоксихолат натрия, 0.1% (w/v) додецилсульфат натрия, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид) и инкубировали при 4°C 15 мин. Затем лизаты центрифугировали при 12000 g и 4°C в течение 10 мин, после чего образцы супернатантов смешивали с 4× буфером для SDS-PAGE: 250 мМ Трис-НСl, рН 6.8, 40% глицерин, 8% SDS, 4% 2-меркаптоэтанол и 0.2% бромфеноловый синий – и инкубировали в течение 5 мин при 80°C. Лизаты анализировали электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE) в буферной системе Лэммли. После SDS-PAGE белки переносили на PVDF-мембрану полусухим методом в приборе Trans-Blot Turbo (“Bio-Rad”, США). Мембрану блокировали 5%-ным сухим обезжиренным молоком в PBS с 0.1% Tween-20. Для детекции Cas9 с 3×НА-эпитопом использовали моноклональные кроличьи антитела против эпитопа НА (клон С29F4, #3724; “Cell Signaling”, США),

для детекции α -тубулина использовали моноклональные мышинные антитела клона 12G10 [18]. В качестве вторичных антител использовали поликлональные козы антитела против IgG кролика (#7074; “Cell Signaling”) или мыши (#7076; “Cell Signaling”), конъюгированные с пероксидазой хрена. Хемилюминесцентный сигнал детектировали на приборе ChemiDoc MP (“Bio-Rad”) с использованием реагента Immobilon (“Millipore”, США).

Статистический анализ. Обработку результатов проводили с использованием программы GraphPad Prism 8.0 (США). Для сравнения средних использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для связанных выборок с последующим применением теста Тьюки для множественных сравнений или с последующим применением теста Даннета для сравнения с контрольной группой (эксперимент с низкомолекулярными соединениями). Данные эксперимента с комбинацией подходов анализировали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с двумя факторами (число NLS, добавление соединения M3814) для связанных выборок с последующим применением теста Сидака для множественных сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модификация донорной плазмиды с помощью сигналов DTS и сайтов связывания NF- κ B

В качестве модели для оценки влияния различных модификаций донорной плазмиды на уровень нокина *MTC34* использовали полученную ранее Т-клеточную линию СЕМ/R5, стабильно экспрессирующую корецептор ВИЧ-1 ССR5 [8, 18]. Дизайн донорной конструкции для нокина, разработанный ранее [8], показан на рис. 1а. В результате корректного нокина в начало второго экзона гена *CXCR4* под контролем эндогенного промотора в клетках экспрессируется короткий фрагмент белка *CXCR4* и пептидный ингибитор слияния МТ-С34, разделенные Р2А-пептидом – сигналом пропуска рибосомы. В результате ингибиторный пептид МТ-С34 транслируется отдельно от фрагмента белка *CXCR4* и локализуется на плазматической мембране благодаря наличию лидерной последовательности и GPI-якоря (рис. 1а). Таким образом, все клетки с нокином *MTC34* также нокаутированы по *CXCR4* (нокаут вместе с нокином), в то время как клетки, потерявшие способность к экспрессии *CXCR4*, могут иметь как нокаут, так и нокаут вместе с нокином.

Мы предположили, что повысить уровень нокина можно за счет увеличения эффективности доставки донорной конструкции в ядро клетки. Для этого донорные плазмиды модифицировали путем введения DTS-сигналов из энхансера SV40 [9] или 4 сайтов связывания транскрипционного

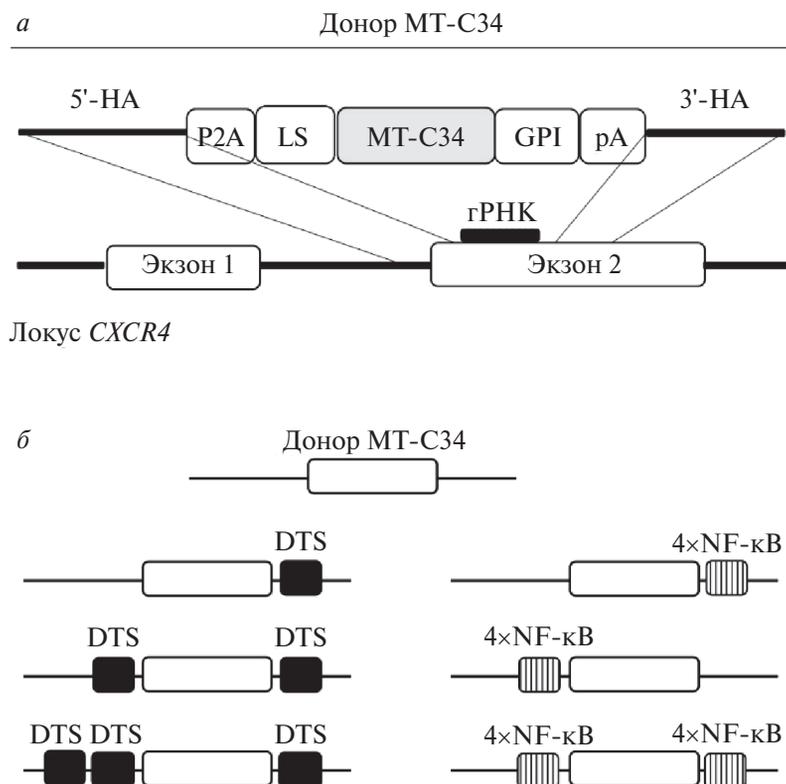


Рис. 1. Дизайн конструкции для нокина *MTC34* в экзон-2 гена *CXCR4* (а) и схемы донорных конструкций с различными модификациями (б). 5'-НА – 5'-плечо гомологии; P2A – сигнал пропуска рибосомы; LS – лидерная последовательность; GPI – последовательность для модификации пептида GPI-якорем; pA – сигнал полиаденилирования; 3'-НА – 3'-плечо гомологии; гРНК – РНК-гид; DTS – ДНК-транспортирующая последовательность; 4×NF-κB – 4 сайта связывания NF-κB, разделенные короткими линкерами.

фактора NF-κB [19]. На основе донорной плазмиды pBluescript_KS-donor_MTC34 (далее: pKS-don_MTC34) были получены плазмиды с одним, двумя или тремя сигналами DTS, а также плазмиды с четырьмя сайтами связывания NF-κB на 5'-, 3'-конце донорной последовательности или с обеих сторон от нее (см. рис. 1б).

Для оценки эффективности нокина клетки СЕМ/R5 электропорировали донорными плазмидами вместе с плазмидами, экспрессирующими Cas9 и гРНК, и на 5 сутки оценивали уровни нокина и нокаута с помощью проточной цитофлуориметрии с антителами соответственно против пептида МТ-С34 и корецептора CXCR4. Сначала определяли уровень нокина при различных дозах донорной ДНК и неизменной концентрации плазмид для экспрессии Cas9 и гРНК. Обнаружено, что при увеличении количества донорной ДНК от 0.5 до 4 пмоль возрастал и уровень нокина (рис. 2а), а уровень нокаута значимо не изменялся (рис. 2б). В результате соотношение нокина к нокауту увеличилось в 2 раза и достигало 60% (рис. 2в). Важно отметить, что при дозе донора в 4 пмоль наблюдалось снижение доли живых клеток (рис. S1, дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI: 10.31857/S0026898424040044 статьи,

а также размещены на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/4/supp_Golubev_rus.pdf). Кроме того, в работах, описывающих модификации донорной ДНК для повышения уровня нокина в Т-клетках, было показано, что как при низких, так и при высоких дозах донорной ДНК эффект от модификаций выражен слабо [20, 21], поэтому для дальнейших экспериментов мы выбрали промежуточную дозу: 1 пмоль донорной плазмиды.

Далее оценили влияние модификаций донорной плазмиды на уровни нокина и нокаута при выбранных условиях. Оказалось, что добавление сигналов DTS или сайтов связывания NF-κB не влияет на уровень как нокина *MTC34* (рис. 3а, б), так и нокаута *CXCR4* (рис. 3в, г).

Повышение нокина *MTC34* за счет увеличения числа NLS в Cas9

Известно, что количество и тип NLS в белке Cas9 влияют на эффективность геномного редактирования [14, 15]. Мы решили увеличить число NLS в белке Cas9 и сравнить активность нуклеаз с одним и тремя NLS, в дополнение использовали конструкцию без NLS (рис. 4а). Для облегчения детекции белков после иммуноблотинга на С-конец Cas9 после NLS добавили 3×НА-эпитоп

(рис. 4а), введение которого не влияло на уровень редактирования локуса *CXCR4* (рис. S2а, б, см. Дополнительные материалы). Плазмиды, кодирующие Cas9 и гРНК, вместе с донорной плазмидой без модификаций электропорировали в клетки СЕМ/Р5 и на 5 сутки оценивали уровень пептида МТ-С34 и белка *CXCR4* на поверхности клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. Максимальный уровень нокина и нокаута достигался при экспрессии Cas9 с 3×NLS (рис. 4б, в). Обнаружено, что даже белок без сигналов NLS вызывал заметный уровень нокаута, однако соотношение нокина к нокауту при этом было снижено (рис. 4в, г). Интересно отметить, что введение последовательности NLS приводило к повышению уровня белка в электропорированных клетках СЕМ/Р5 (рис. 4г, д), а также в трансфицированных клетках НЕК293Т (рис. S2в, см. Дополнительные материалы). Это значит, что последовательности NLS,

кроме обеспечения транслокации в ядро, могут стабилизировать белок Cas9.

Повышение уровня нокина за счет ингибирования NHEJ и стимуляции HDR

Для повышения уровня нокина часто используют низкомолекулярные соединения, влияющие на пути репарации двухцепочечных разрывов ДНК [16]. Учитывая это, для повышения уровня нокина *MTC34* в локус *CXCR4* мы проанализировали ряд соединений, которые, согласно данным литературы, повышают уровень репарации по механизму HDR или блокируют NHEJ. В качестве активаторов HDR использовали соединение RS-1, стабилизирующее Rad51-нуклеофиламенты [22]; агонист β-3 адренергического рецептора L755507 (механизм его влияния на HDR неизвестен) [16] и ингибитор гистондеацетилаз трихостатин А (Trichostatin A,

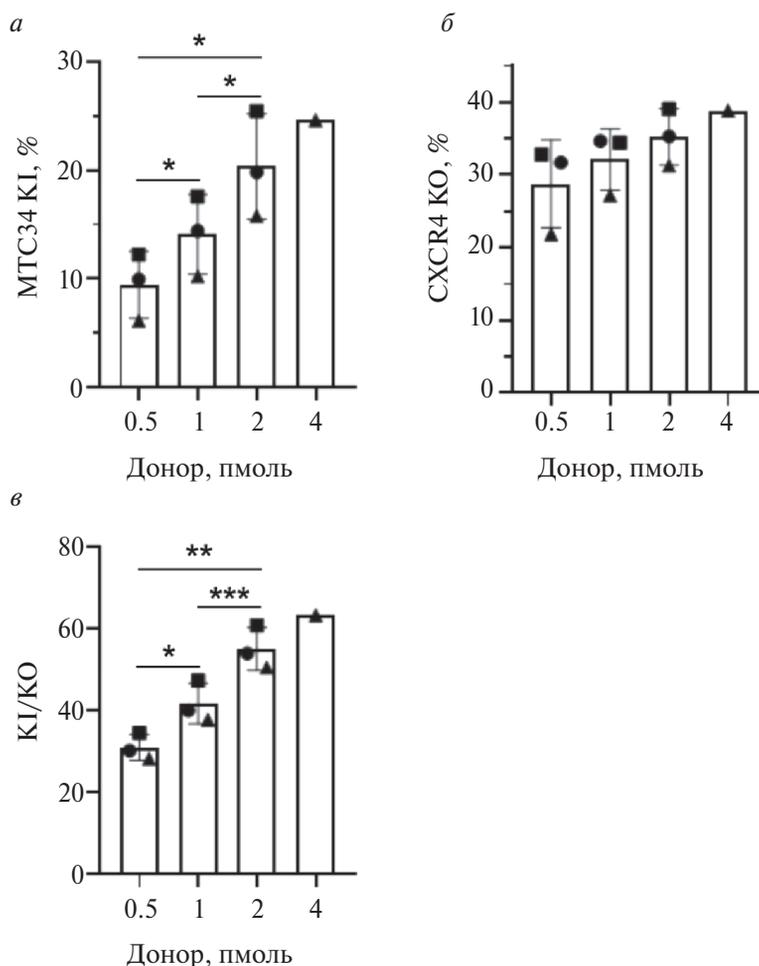


Рис. 2. Уровень нокина *MTC34* (а), нокаута *CXCR4* (б) и соотношение нокин/нокаут (в) в клетках СЕМ/Р5 при различном количестве донорной ДНК. Клетки электропорировали плазмидами рсDNA3.3-hCas9, рKS-gRNA-X4ex2 и донорной плазмидой рKS-don_MТ-С34 и на 5 сутки после электропорации оценивали уровень нокаута *CXCR4* и нокина *MTC34* на поверхности клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. КИ/КО – соотношение нокина к нокауту. Результаты 3 независимых экспериментов представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD) и индивидуальные значения; значками разной формы обозначены независимые эксперименты. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

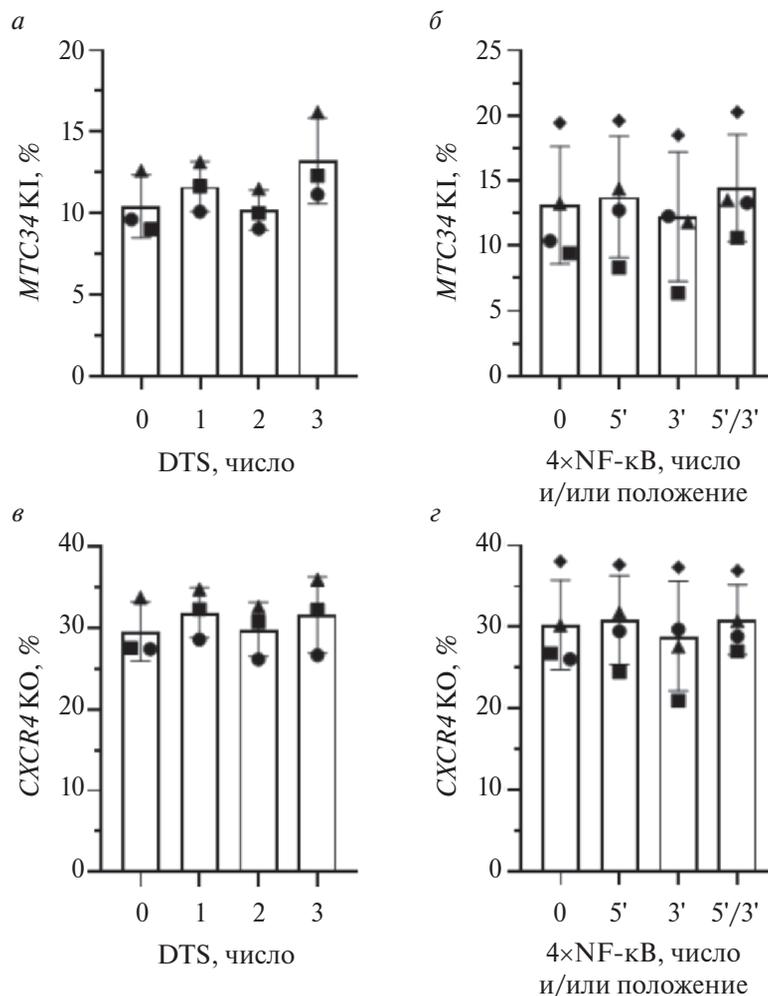


Рис. 3. Влияние DTS-сигналов в плазмидном доноре на уровень нокина. Уровень нокина *MTC34* (а, б) и нокаута *CXCR4* (в, г) в клетках СЕМ/Р5. Клетки электропорировали плазмидами рсDNA3.3-hCas9, рKS-gRNA-X4ex2 и 1 пмоль донорной плазмиды рKS-don_MT-C34 без модификаций, с различным числом сигналов DTS (а, в) или различным числом и/или положением сайтов связывания NF-κB (б, г). На 5 сутки после электропорации оценивали уровень нокаута *CXCR4* и нокина *MTC34* на поверхности клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. Результаты 3–4 независимых экспериментов представлены как среднее ± SD и индивидуальные значения; значками разной формы обозначены независимые эксперименты. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

TSA) [23]. Для блокировки NHEJ использовали ингибиторы ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK) Ku0060648, Nu7441 и M3814 и ингибитор ДНК-лигазы IV SCR7 [23] (рис. 5а).

Для оценки эффективности низкомолекулярных соединений клетки СЕМ/Р5 электропорировали плазмидами, кодирующими Cas9 и гРНК, вместе с 1 пмоль донорной плазмиды и сразу после электропорации добавляли в культуральную среду низкомолекулярные соединения, через 24 ч среду меняли на свежую и еще через 72 ч измеряли уровень нокаута *CXCR4* и нокина *MTC34* по экспрессии кодируемых ими белка *CXCR4* и пептида MT-C34 на поверхности клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. Обнаружено, что уровень нокина достоверно повышался лишь в присутствии ингибиторов DNA-PK, среди которых соединения

Ku0060648 и M3814 обладали максимальным эффектом и увеличивали нокин в 1.8 раза (рис. 5б). Эффективность нокаута в присутствии низкомолекулярных соединений оставалась неизменной (рис. 5в). Это объясняется тем, что в используемой нами модельной системе нокаут *CXCR4* может быть вызван репарацией локуса-мишени как по пути NHEJ, так и по пути HDR. Во втором случае происходит нокин *MTC34* с одновременным нокаутом *CXCR4*. Более длительная инкубация клеток в присутствии низкомолекулярных соединений не приводила к повышению уровня нокина (рис. S3а–в, см. Дополнительные материалы). Стоит отметить, что введение в среду соединения Ku0060648 существенно замедляло рост клеток, в особенности при длительной инкубации (рис. S3г, см. Дополнительные материалы).

Комбинация ингибиторов DNA-PK
с Cas9-3×NLS максимально повышала
эффективность нокина MTC34

В результате проведенных экспериментов установлено, что использование Cas9-3×NLS и обработки клеток ингибиторами DNA-PK: Ku0060648 и M3814 — приводило к значимому повышению уровня нокина MTC34 в локус CXCR4. Далее оценили эффективность комбинирования этих подходов. Для этого клетки электропорировали смесью плазмид, кодирующих гРНК, донорную

последовательность без модификаций и Cas9 с 1×NLS или 3×NLS. После электропорации клетки в течение 24 ч культивировали в среде с DMSO или M3814, переводили в свежую среду и на 5 сутки после электропорации анализировали уровень CXCR4 и МТ-С34 на поверхности клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. В образцах с Cas9-3×NLS по сравнению с образцами Cas9-1×NLS уровень нокаута был выше в среднем на 20%, а уровень нокина — на 30% (рис. 6а, б). При введении в среду соединения M3814 уровень нокина повышался на 30%, а уровень нокаута при

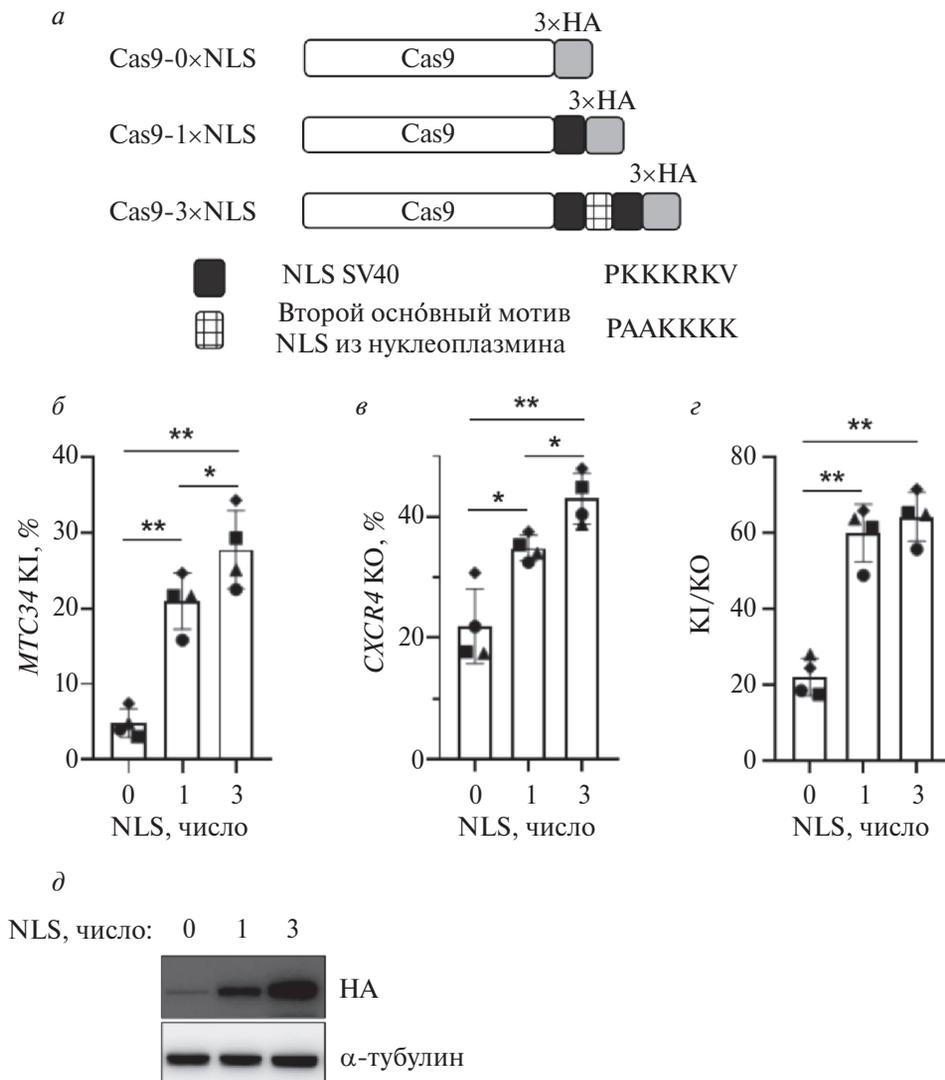


Рис. 4. Влияние числа NLS в белке Cas9 на эффективность редактирования локуса CXCR4. *а* — Схемы конструкций на основе плазмиды pcDNA3.3-hCas9. Приведены аминокислотные последовательности NLS SV40 и последовательность второго основного мотива из NLS нуклеоплазмина. Уровень нокина MTC34 (*б*), нокаута CXCR4 (*в*) и соотношение нокин/нокаут (*г*) в клетках СЕМ/Р5, электропорированных одной из конструкций 1–3 (*а*) вместе с плазмидами pKS-gRNA-X4ex2 и pKS-don_MTC34. Уровень нокаута CXCR4 и нокина MTC34 оценивали методом проточной цитофлуориметрии на 5 сутки после электропорации. KI/KO — соотношение нокина к нокауту. Результаты 4 независимых экспериментов представлены как среднее ± SD и индивидуальные значения; значками разной формы обозначены независимые эксперименты. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. *д* — Анализ методом иммуноблоттинга экспрессии белка Cas9 с разным числом NLS (0, 1 и 3) в клетках СЕМ/Р5. Лизаты окрашивали антителами к HA-эпитопу (для детекции Cas9) и к α-тубулину (для контроля уровня общего белка в лизатах).

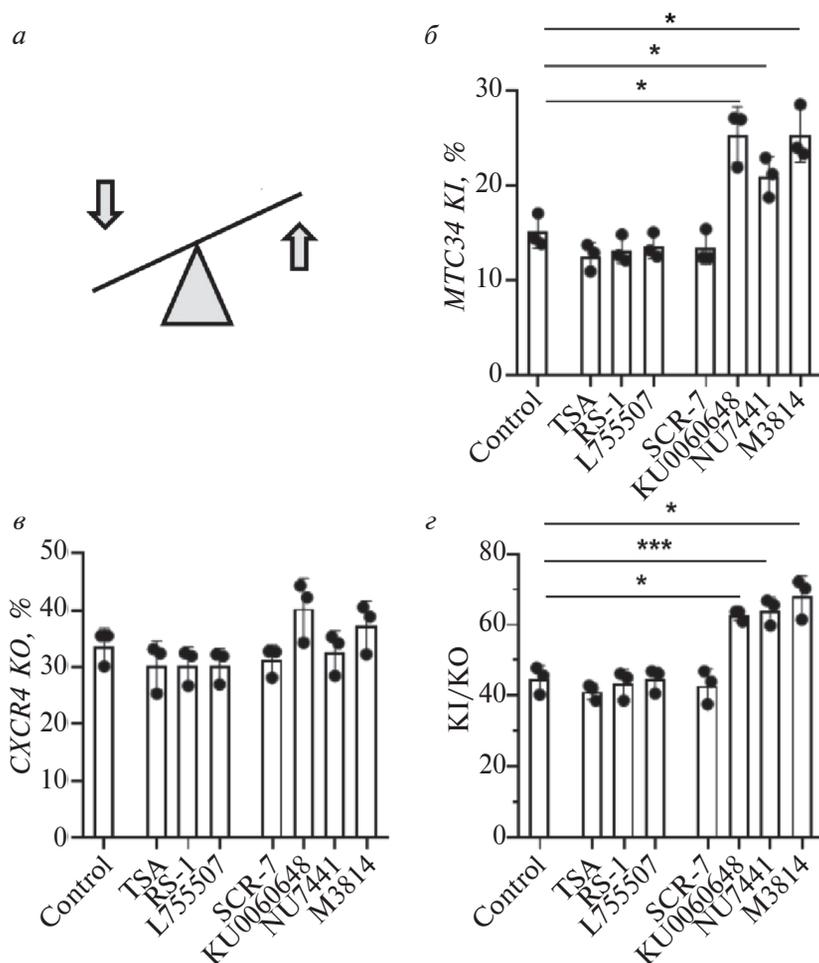


Рис. 5. Повышение уровня нокина за счет ингибирования механизма NHEJ и стимуляции HDR. *a* – Низкомолекулярные соединения, использованные в работе. Уровень нокина *MTC34* (*б*), нокаута *CXCR4* (*в*) и соотношение нокин/нокаут (*г*) в клетках СЕМ/Р5. Клетки электропорировали плазмидами рсDNA3.3-hCas9, рKS-gRNA-X4ex2 и рKS-don_MТ-С34, через 24 ч среду меняли на свежую, еще через 72 ч оценивали уровень нокаута *CXCR4* и нокина *MTC34* методом проточной цитофлуориметрии. KI/KO – соотношение нокина к нокауту. Результаты 3 независимых экспериментов приведены как среднее \pm SD и индивидуальные значения; значками разной формы обозначены независимые эксперименты. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

этом не изменялся. При совместном использовании обоих подходов наблюдался аддитивный эффект, при котором уровень нокина возрастал на 70% по сравнению с контрольным образцом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменение генома клеток с помощью CRISPR/Cas9-опосредованного нокина открывает новые возможности для моделирования и лечения заболеваний человека. Однако эффективность репарации DSB по механизму HDR зачастую невелика, поэтому усилия многих исследователей направлены на поиск условий для повышения уровня нокина. В частности, для этой цели применяли разные способы модификации нуклеазы Cas9, гРНК и донорной ДНК, а также воздействовали на пути репарации DSB [16]. Ранее нам удалось существенно повысить уровень нокина *MTC34* в локус *CXCR4*

на Т-клеточной линии и первичных CD4⁺ Т-лимфоцитах человека путем увеличения плеч гомологии донора со 100 до 500 п.н. и замены ПЦР-донора плазмидой [8]. В данной работе для повышения уровня нокина конструкции, кодирующей пептидный ингибитор слияния ВИЧ-1 МТ-С34, в локус гена *CXCR4* человека в Т-клеточной линии СЕМ/Р5 мы модифицировали донорную ДНК, нуклеазу Cas9 и воздействовали на активность путей репарации DSB с помощью низкомолекулярных соединений. Для повышения уровня нокина за счет более эффективной доставки донорной плазмидной ДНК в ядро клеток плазмиды модифицировали путем введения сигналов DTS, представляющих собой участки энхансера SV40, или сайтов связывания транскрипционного фактора NF- κ B. Подобная модификация донорной ДНК легко выполняема и масштабируема, для ее применения не требуется вводить в клетки дополнительные белки

и, наконец, в отличие от воздействия на пути репарации ДНК с помощью низкомолекулярных соединений, такая модификация донорной ДНК потенциально менее токсична. Однако выбранные модификации донорной ДНК DTS-сигналами или сайтами связывания NF-κB не влияли на уровень нокина в используемой нами модельной системе.

Сигнал DTS из SV40 содержит несколько сайтов связывания различных транскрипционных факторов, экспрессируемых практически всеми типами клеток (AP1, AP2, NF-κB, Oct1, TEF-1) [10]. Как показано еще в 1999 году D. Dean и др. [9], введение в плазмиду последовательности, кодирующей DTS, повышает экспрессию репортера в трансфицированных клетках, что обусловлено направленным переносом плазмидной ДНК в ядро благодаря связыванию DTS-сигналов с транскрипционными факторами, имеющими NLS [9]. Впоследствии обнаружили, что индивидуальные сайты связывания некоторых транскрипционных факторов, в частности NF-κB, могут выступать в роли DTS [13, 24, 25]. Учитывая, что NF-κB – один из ключевых транскрипционных факторов, участвующих в процессе активации Т-клеток [26], мы оценили его вклад в повышение уровня нокина на Т-клеточной линии СЕМ/R5, вводя в донорную ДНК последовательности с сайтами связывания NF-κB, как описано S. Shin и др. [19]. Однако эта модификация не повлияла на уровень нокина *MTC34*, несмотря на то что белки семейства NF-κB содержатся в клетках линии СЕМ [27, 28]. Возможно, требуется дополнительная стимуляция клеток, приводящая

к усиленной транслокации NF-κB в ядро [13]. Можно предположить, что эффект от введения сигналов DTS и сайтов связывания NF-κB в донорную ДНК будет более выражен на первичных активированных Т-клетках, что предстоит проверить экспериментально.

Насколько нам известно, в литературе отсутствуют данные о том, что модификация донорной ДНК DTS-сигналами может повышать уровень CRISPR/Cas9-опосредованного нокина. Ранее лишь в одной работе, выполненной на зиготах крыс, применяли DTS-сигналы из SV40 для повышения CRISPR/Cas9-опосредованного нокина [29]. Однако авторам не удалось добиться детектируемого уровня сигнала, поэтому и вывода о роли DTS в этом процессе сделано не было. При выборе последовательности 4 сайтов связывания NF-κB, разделенных небольшими линкерами, мы ориентировались на работу S. Shin и др. [19]. В этой работе DTS-сигналы из SV40 и сайты связывания NF-κB использовали для повышения эффективности встраивания длинных конструкций по методу RMCE (Recombinase-Mediated Cassette Exchange) с участием Cre-рекомбиназы в локусы *AAVS1* или *ROSA26* [19]. Авторы наблюдали усиление сигнала репортера в 1.5–2 раза в присутствии вставки DTS SV40 или сайтов связывания NF-κB. В обоих случаях модификация требовалась по обоим концам встраиваемой конструкции, в то время как одного сигнала было недостаточно. В представленной нами работе даже введение трех DTS-сигналов SV40 в донорную ДНК не вызывало

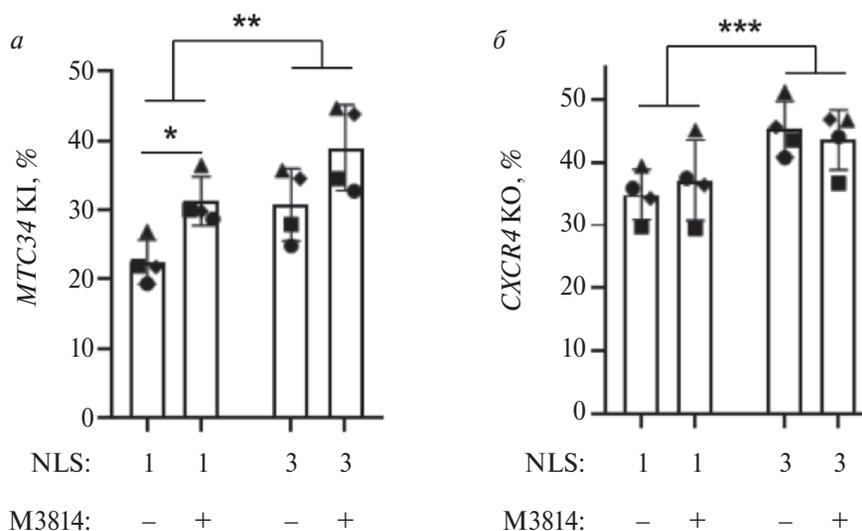


Рис. 6. Повышение уровня нокина *MTC34* за счет экспрессии Cas9-3×NLS и обработки клеток ингибитором DNA-ПК. Уровень нокина *MTC34* (а) и нокаута *CXCR4* (б) в клетках СЕМ/R5, электропорированных плазмидами pKS-gRNA-X4ex2 и pKS-don_MT-C34, а также одной из плазмид pсDNA3.3-hCas9-1×NLS (1) или pсDNA3.3-hCas9-3×NLS (3). В течение 24 ч после электропорации клетки культивировали в присутствии M3814 (+) или в отсутствие (-). На 5 сутки оценивали уровень нокаута *CXCR4* и нокина *MTC34* по экспрессии соответствующих белка *CXCR4* и пептида МТ-С34 на поверхности клеток методом проточной цитофлуориметрии. Результаты 4 независимых экспериментов представлены как среднее ± SD и индивидуальные значения; значками разной формы обозначены независимые эксперименты. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

заметного повышения уровня нокина *MTC34*. Различия могут быть связаны, во-первых, с экспрессией и активацией транскрипционных факторов, ответственных за связывание с сигналами DTS в различных клеточных линиях. Во-вторых, мы использовали Т-клеточную линию СЕМ/R5, а S. Shin с соавт. [19] работали с клетками НЕК293 и СНО. Клетки НЕК293 использовали и в работе, где впервые было показано положительное влияние сайтов связывания NF-κB в плазмиде на экспрессию люциферазы [13].

Второй подход был направлен на модификацию белка Cas9. Ранее показано, что увеличение числа NLS в молекуле Cas9 повышает эффективность доставки фермента в ядро и позволяет повысить уровень редактирования [14, 15]. Нами получена конструкция, кодирующая белок Cas9 с 3×NLS, которая позволила увеличить уровень нокаута *CXCR4* на 20%, а уровень нокина *MTC34* на 30% по сравнению с конструкцией, содержащей один сигнал NLS. Стоит отметить, что даже белок без сигналов NLS вызывал заметный уровень нокаута (20% по сравнению с 40% для белка Cas9-3×NLS); а уровень нокина был непропорционально снижен. Так, соотношение нокина к нокауту для белков Cas9-3×NLS и Cas9-1×NLS составляло около 60%, а для белка Cas9-0×NLS только 20%. В литературе описания похожего эффекта мы не нашли. Возможно, такая разница обусловлена различной кинетикой накопления Cas9-3×NLS и Cas9-0×NLS в ядре, что в последнем случае накладывает на снижение количества донорной ДНК, приводя в результате к падению уровня нокина. Кроме того, замечено, что уровень Cas9 в клетке повышался при увеличении числа NLS в молекуле (рис. 4д). В литературе мы не нашли такого типа данных ни для Cas9, ни для других белков. Недавно S. Shui и др. [30] сообщили о повышении эффективности редактирования локуса *CCR5* в Т-клеточной линии Jurkat при добавлении второго NLS SV40 на С-конец Cas9 [30], однако общий уровень белка Cas9 в электропорированных клетках авторы не оценивали. Стоит отметить, что S. Shui с соавт. [30] использовали рибонуклеопротеиновые (РНП) комплексы и добились повышения уровня редактирования в 1.5–2 раза, тогда как мы работали с плазмидными конструкциями и при введении двух сигналов NLS достигли повышения эффективности нокаута только на 20%. Можно предположить, что если Cas9 доставляется в клетки в форме РНП, то эффект от различных модификаций белка, в том числе добавления сигналов NLS, будет выражен сильнее по сравнению с доставкой Cas9 в виде экспрессионных конструкций. В последнем случае уровень нуклеазы в клетке оказывается гораздо выше, чем при использовании РНП, что может сгладить различия, существенные при невысокой концентрации нуклеазы в клетке. Кроме того, различия в наблюдаемом повышении эффективности

нокаута могут быть связаны с тем, что для оценки этого показателя мы использовали проточную цитофлуориметрию, тогда как S. Shui с соавт. [30] анализировали уровень инделов менее точным методом – T7E1.

Воздействие на пути репарации ДНК с помощью низкомолекулярных соединений с целью повышения уровня нокина описано во многих работах (см. обзор [16]). Однако из-за различий в клеточных моделях и в подобранных концентрациях исследуемых соединений сравнение наблюдаемых эффектов затруднено. При выборе низкомолекулярных соединений мы ориентировались на данные, полученные для Т-клеточных культур и первичных Т-клеток [21, 23, 31]. В результате из 7 протестированных веществ повышение нокина *MTC34* обнаружено лишь при обработке клеток ингибиторами DNA-ПК: M3814 и Ku0060648, – что согласуется с ранее опубликованными данными [23, 31]. Интересно, что для SCR7 и L755507 ранее также не было выявлено влияния на уровень нокина в клетках Jurkat [23], а для RS-1 эффект был зарегистрирован на клеточных линиях НЕК293А [22] и MCF-7 [32], но не на K562 [33]. Стоит отметить, что низкомолекулярные соединения, например M3814, могут быть полезным инструментом фундаментальных исследований, но для их применения в клинической практике возникнут затруднения. Так, показано, что при экспансии отредактированных CAR-Т клеток в присутствии M3814 уровень нокина повышался, но существенно снижался суммарный выход клеток [21].

Наконец, при использовании комбинации двух подходов: экспрессия Cas9-3×NLS и обработка клеток M3814 – нами зарегистрирован аддитивный эффект на уровень нокина – повышение на 70%. Заметим, что при введении только дополнительных сигналов NLS в молекулу Cas9 увеличивался как уровень нокина, так и нокаута, а обработка M3814 повышала только уровень нокина. В результате при использовании комбинации Cas9-3×NLS + M3814 уровень нокина *MTC34* стабильно достигал 30–40%. В дальнейшем оптимизированные конструкции будут использованы для внесения нокина в первичные CD4⁺ Т-клетки, в которых ранее уровень нокина для конструкций без модификаций составлял менее 1% [8]. Клетки с нокином можно будет дополнительно отсортировать с помощью полученных нами ранее мышинных моноклональных антител против МТ-С34 [8].

Таким образом, нам удалось повысить уровень CRISPR/Cas9-опосредованного нокина конструкции, кодирующей пептидный ингибитор слияния ВИЧ-1, в локус *CXCR4* человека с помощью модификации нуклеазы Cas9 и применения низкомолекулярных соединений – ингибиторов DNA-ПК. Полученные результаты могут быть использованы в разработке генотерапевтических подходов

к лечению ВИЧ-1, а также служить отправной точкой для поиска эффективных способов повышения нокина в релевантной с терапевтической точки зрения модели для экспрессии пептидных ингибиторов слияния ВИЧ.

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

- Jinek M., East A., Cheng A., Lin S., Ma E., Doudna J. (2013) RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*. **2**, e00471. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.00471>
- 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>
- Nambiar T.S., Baudrier L., Billon P., Ciccia A. (2022) CRISPR-based genome editing through the lens of DNA repair. *Mol. Cell*. **82**, 348–388. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.12.026>
- Li T., Yang Y., Qi H., Cui W., Zhang L., Fu X., He X., Liu M., Li P.F., Yu T. (2023) CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal. Transduct. Target Ther.* **8**, 36. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7>
- 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>
- Cornu T.I., Mussolino C., Müller M.C., Wehr C., Kern W.V., Cathomen T. (2021) HIV gene therapy: an update. *Hum. Gene Ther.* **32**, 52–65. <https://doi.org/10.1089/HUM.2020.159>
- Liu M., Rehman S., Tang X., Gu K., Fan Q., Chen D., Ma W. (2019) Methodologies for improving HDR efficiency. *Front. Genet.* **9**, 691. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00691>
- 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>
- Dean D.A., Dean B.S., Muller S., Smith L.C. (1999) Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp. Cell Res.* **253**, 713–722. <https://doi.org/10.1006/EXCR.1999.4716>
- Bai H., Lester G.M.S., Petishnok L.C., Dean D.A. (2017) Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA. *Biosci. Rep.* **37**, BSR20160616. <https://doi.org/10.1042/BSR20160616>
- Vacik J., Dean B.S., Zimmer W.E., Dean D.A. (1999) Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Ther.* **6**, 1006–1014. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300924>
- Young J.L., Benoit J.N., Dean D.A. (2003) Effect of a DNA nuclear targeting sequence on gene transfer and expression of plasmids in the intact vasculature. *Gene Ther.* **10**, 1465–1470. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302021>
- Mesika A., Grigoreva I., Zohar M., Reich Z. (2001) A regulated, NFκB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol. Ther.* **3**, 653–657. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0312>
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. **339**, 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Maggio I., Zittersteijn H.A., Wang Q., Liu J., Janssen J.M., Ojeda I.T., van der Maarel S.M., Lankester A.C., Hoeben R.C., Gonçalves M.A.F.V. (2020) Integrating gene delivery and gene-editing technologies by adenoviral vector transfer of optimized CRISPR–Cas9 components. *Gene Ther.* **27**, 209–225. <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0119-y>
- 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>
- Makkerh J.P.S., Dingwall C., Laskey R.A. (1996) Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr. Biol.* **6**, 1025–1027. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00648-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00648-6)
- Zotova A., Pichugin A., Atemasova A., Knyazhanskaya E., Lopatukhina E., Mitkin N., Holmuhamedov E., Gotikh M., Kuprash D., Filatov A., Mazurov D. (2019) Isolation of gene-edited cells via knock-in of short glycoposphatidylinositol-anchored epitope tags. *Sci. Rep.* **9**, 3132. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-40219-Z>
- Shin S., Kim S.H., Lee J.S., Lee G.M. (2021) Streamlined human cell-based recombinase-mediated cassette exchange platform enables multigene expression for the production of therapeutic proteins. *ACS Synth. Biol.* **10**, 1715–1727. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00113>
- 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>
- Shy B.R., Vykunta V.S., Ha A., Talbot A., Roth T.L., Nguyen D.N., Pfeifer W.G., Chen Y.Y., Blaeschke 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>

22. Pinder J., Salsman J., Delleire G. (2015) Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic Acids Res.* **43**, 9379–9392. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv993>
23. 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., Schmueck-Henneresse M., Stripecke 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>
24. Young J.L., Zimmer W.E., Dean D.A. (2008) Smooth muscle-specific gene delivery in the vasculature based on restriction of DNA nuclear import. *Exp. Biol. Med.* **233**, 840–848. <https://doi.org/10.3181/0712-RM-331>
25. Degiulio J.V., Kaufman C.D., Dean D.A. (2010) The SP-C promoter facilitates alveolar type II epithelial cell-specific plasmid nuclear import and gene expression. *Gene Ther.* **17**, 541–549. <https://doi.org/10.1038/gt.2009.166>
26. Schulze-Luehrmann J., Ghosh S. (2006) Antigen-receptor signaling to nuclear factor κ B. *Immunity.* **25**, 701–715. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.010>
27. Wu W., Nie L., Zhang L., Li Y. (2018) The notch pathway promotes NF- κ B activation through Asb2 in T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **23**, 37. <https://doi.org/10.1186/s11658-018-0102-4>
28. Castro-caldas M., Mendes A.F., Carvalho A.P., Duarte C.B., Lopes M.C. (2003) Dexamethasone prevents interleukin-1 β -induced nuclear factor- κ B activation by up-regulating I κ B- α synthesis, in lymphoblastic cells. *Mediators Inflamm.* **12**, 37–46. <https://doi.org/10.1080/0962935031000096953>
29. Remy S., Chenouard V., Tesson L., Usal C., Ménoret S., Brusselle L., Heslan J.M., Nguyen T.H., Bellien J., Merot J., De Cian A., Giovannangeli C., Concordet J.P., Aneon I. (2017) Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation. *Sci. Rep.* **7**, 16554. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16328-y>
30. Shui S., Wang S., Liu J. (2022) Systematic investigation of the effects of multiple SV40 nuclear localization signal fusion on the genome editing activity of purified SpCas9. *Bioengineering.* **9**, 83. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9020083>
31. Fu Y.-W., Dai X.Y., Wang W.T., Yang Z.X., Zhao J.J., Zhang J.P., Wen W., Zhang F., Oberg K.C., Zhang L., Cheng T., Zhang X.B. (2021) Dynamics and competition of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins and AAV donor-mediated NHEJ, MMEJ and HDR editing. *Nucleic Acids Res.* **49**, 969–985. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1251>
32. Killian T., Dickopf S., Haas A.K., Kirstenpfad C., Mayer K., Brinkmann U. (2017) Disruption of diphthamide synthesis genes and resulting toxin resistance as a robust technology for quantifying and optimizing CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Sci. Rep.* **7**, 15480. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15206-x>
33. Wienert B., Nguyen D.N., Guenther A., Feng S.J., Locke M.N., Wyman S.K., Shin J., Kazane K.R., Gregory G.L., Carter M.A.M., Wright F., Conklin B.R., Marson A., Richardson C.D., Corn J.E. (2020) Timed inhibition of CDC7 increases CRISPR-Cas9 mediated templated repair. *Nat. Commun.* **11**, 2109. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15845-1>

Increasing the Level of Knock-in of a Construct Encoding the HIV-1 Fusion Inhibitor, MT-C34 Peptide, into the *CXCR4* Locus in the CEM/R5 T Cell Line

D. S. Golubev¹, D. S. Komkov^{1,2}, M. V. Shepelev¹, D. V. Mazurov^{1,3}, N. A. Kruglova¹, *

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

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

³*Division of Infectious Diseases and International Medicine, Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, 55455 USA*

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

The low efficiency of knock-in, especially in primary human cells, limits the use of genome editing technology for therapeutic purposes, which makes it important to develop approaches for increasing knock-in levels. In this work, using a knock-in model of the peptide fusion inhibitor of HIV MT-C34 into the human *CXCR4* locus in the CEM/R5 T cell line, we analyzed the effectiveness of several approaches to increasing knock-in levels. First, donor DNA modification aimed at improving the efficiency of plasmid transport into the nucleus was evaluated, namely the introduction into the donor plasmid of the SV40 DNA transport sequence (DTS) or the binding sites for the transcription factor NF- κ B, whose effects on knock-in levels have not been described. In the MT-C34 knock-in model into the *CXCR4* locus, this modification was ineffective. The second approach, modifying the Cas9 nuclease by introducing two additional nuclear localization signals (NLS), increased the knock-in level by 30%. Finally, blocking DNA repair via the nonhomologous end joining pathway using DNA-dependent protein kinase inhibitors caused a 1.8-fold increase in knock-in. The combination of the last two approaches caused an additive effect. Thus, increasing the number of NLSs in the Cas9 protein and inhibiting DNA repair via the nonhomologous end joining pathway significantly increased the level of knock-in of the HIV-1 peptide fusion inhibitor into the clinically relevant locus *CXCR4*, which can be used to develop effective gene therapy approaches for the treatment of HIV infection.

Keywords: CRISPR/Cas9, genome editing, homology-directed repair, T lymphocytes, knock-in, NHEJ inhibitors, DTS, NLS