


Изучение влияния детерминант митохондриального импорта в структуре нРНК на активность комплекса нРНК/SpCas9 *in vitro*

Э.Г. Закирова¹, Ю.В. Вяткин², Н.А. Верещагина³, В.В. Музыка⁵, И.О. Мазунин⁴, К.Е. Орищенко¹ 


¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² ООО «АкадемДжин», Новосибирск, Россия

³ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

⁴ Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

⁵ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия


 e-mail: keor@bionet.nsc.ru

Аннотация. О том, что нарушения структуры митохондриального генома приводят к широкому спектру нейромышечных и нейродегенеративных заболеваний, известно уже давно, но до сих пор не найдено эффективного метода лечения болезней митохондриального происхождения. В основном проблемы с терапией подобных заболеваний обусловлены состоянием гетероплазии митохондриальной ДНК (мтДНК). Ввиду многокопийности митохондриального генома мутантные копии мтДНК часто сосуществуют с молекулами дикого типа в одной органелле. Клинические симптомы митохондриальных заболеваний и степень их манифестации напрямую зависят от количества мутантных молекул мтДНК в клетке. Смещая уровень гетероплазии в сторону молекул дикого типа мтДНК, возможно добиться снижения негативного влияния мутации. Для этой цели разработано несколько генно-терапевтических подходов на основе TALE-нуклеаз и нуклеаз типа «цинковые пальцы», однако конструирование белковых доменов таких систем является долгим и трудоемким процессом. Система CRISPR/Cas9 принципиально отличается от данных систем простотой использования, высокой эффективностью и механизмом действия. Все присущие характеристики и возможности системы делают ее перспективным инструментом в области генетической инженерии митохондрий. В настоящей статье мы впервые демонстрируем, что модификации направляющей РНК за счет встройки последовательностей, способствующих импорту нРНК в митохондрии, не влияют на функциональную активность комплекса нРНК/SpCas9 в условиях *in vitro*. Полученные результаты указывают на возможность модификации системы с сохранением ее функциональности и использования в перспективе для редактирования митохондриального генома.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК; CRISPR/Cas9; детерминанты импорта в митохондрии; гетероплазия.

Для цитирования: Закирова Э.Г., Вяткин Ю.В., Верещагина Н.А., Музыка В.В., Мазунин И.О., Орищенко К.Е. Изучение влияния детерминант митохондриального импорта в структуре нРНК на активность комплекса нРНК/SpCas9 *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(5):512-518. DOI 10.18699/VJ20.643

Study of the effect of the introduction of mitochondrial import determinants into the gRNA structure on the activity of the gRNA/SpCas9 complex *in vitro*

E.G. Zakirova¹, Y.V. Vyatkin², N.A. Verechshagina³, V.V. Muzyka⁵, I.O. Mazunin⁴, K.E. Orishchenko¹ 


¹ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² AcademGene Ltd., Novosibirsk, Russia

³ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

⁴ Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Russia

⁵ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 e-mail: keor@bionet.nsc.ru

Abstract. It has long been known that defects in the structure of the mitochondrial genome can cause various neuromuscular and neurodegenerative diseases. Nevertheless, at present there is no effective method for treating mitochondrial diseases. The major problem with the treatment of such diseases is associated with mitochondrial DNA (mtDNA) heteroplasmy. It means that due to a high copy number of the mitochondrial genome, mutant copies of mtDNA coexist with wild-type molecules in the same organelle. The clinical symptoms of mitochondrial diseases and the degree of their manifestation directly depend on the number of mutant mtDNA molecules in the cell. The possible way to reduce adverse effects of the mutation is by shifting the level of heteroplasmy towards the wild-type mtDNA molecules. Using this idea, several gene therapeutic approaches based on TALE and ZF nucleases have been developed for this purpose. However, the construction of protein domains of such systems is rather long and laborious process. Meanwhile, the CRISPR/Cas9 system is fundamentally different from protein systems in that it is easy to use,

highly efficiency and has a different mechanism of action. All the characteristics and capabilities of the CRISPR/Cas9 system make it a promising tool in mitochondrial genetic engineering. In this article, we demonstrate for the first time that the modification of gRNA by integration of specific mitochondrial import determinants in the gRNA scaffold does not affect the activity of the gRNA/Cas9 complex *in vitro*.

Key words: mitochondrial DNA; CRISPR/Cas9; the mitochondrial import determinants; heteroplasmy.

For citation: Zakirova E.G., Vyatkin Y.V., Verechshagina N.A., Muzyka V.V., Mazunin I.O., Orishchenko K.E. Study of the effect of the introduction of mitochondrial import determinants into the gRNA structure on the activity of the gRNA/SpCas9 complex *in vitro*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24(5):512-518. DOI 10.18699/VJ20.643

Введение

Технология CRISPR/Cas9, разработанная на основе системы защиты бактерий и архей от вирусов, мобильных генетических элементов и прочей чужеродной ДНК, зарекомендовала себя в качестве эффективного и многофункционального инструмента в области редактирования ядерного генома практически любого организма. В отличие от белковых систем геномного редактирования (технологий ZFN и TALEN), механизм действия системы CRISPR/Cas9 основывается на комплементарном узнавании 20 нуклеотидов направляющей РНК (нРНК) в целевой последовательности гена и последующем внесении двуцепочечного разрыва, благодаря привлечению к месту разрезания нуклеазы Cas9 (Jinek et al., 2012).

Для сайт-специфического распознавания и расщепления ДНК-последовательности мишени необходимо, чтобы компоненты системы (нРНК и Cas9) сформировали активный эффекторный комплекс (Jinek et al., 2014; Jiang, Doudna, 2017). Так, посредством связывания петель в шпильках на 3'-конце молекулы нРНК и аминокислотных остатков нуклеазного домена Cas9 происходят идентификация сайта посадки нуклеазы и ее конформационное преобразование, приводящее к индукции нуклеазной активности фермента (Wright et al., 2015). По сути, от комплементарности специфических последовательностей нРНК и Cas9 зависят термодинамическая стабильность комплекса, и, следовательно, последующая эффективность разрезания ДНК-мишени (Anders et al., 2014). При анализе кристаллической структуры взаимодействия нуклеазы с дуплексом нРНК-ДНК (Nishimasu et al., 2014) выявлено, что четыре пары нуклеотидов (п. н.) в петлях шпильки tetraloop и stem loop 2 нРНК выступают за пределы рибонуклеопротеинового комплекса нРНК/Cas9 и полностью свободны от взаимодействия с боковыми цепями аминокислот Cas9 (Nishimasu et al., 2014; Konermann et al., 2015). Мы предположили, что замещение свободных петель нРНК аналогичными шпильчатыми структурами из других видов РНК не повлияет на функциональную активность всего комплекса. Уже было показано, что подобные модификации применяются для эпигенетической регуляции экспрессии ядерных генов (Mali et al., 2013; Konermann et al., 2015; Komor et al., 2017). Очевидно, что молекулу нРНК можно реконструировать и для манипуляций с митохондриальным геномом.

В клетках с ядерной ДНК экспрессируется огромное количество молекул РНК, которые выполняют разнообразные функции. При этом известно, что в митохондриях способны импортироваться лишь единичные варианты РНК (Jeandard et al., 2019). Ввиду отсутствия общего мнения по поводу транспорта нуклеиновых кислот в митохондрии, вопрос о применении системы CRISPR/Cas9

для супрессии мутаций мтДНК также остается спорным. Однако существует ряд опубликованных работ, утверждающих наличие специфических детерминант целевого импорта цитозольных РНК в митохондрии. Впервые частичная локализация синтетических РНК, модифицированных F- и D-доменами дрожжевой tRNA^{Lys} (CUU), была продемонстрирована на митохондриях дрожжей в условиях стресса (Martin et al., 1979; Kamenski et al., 2007). С использованием данных шпилек другим ученым также удалось сконструировать рекомбинантные молекулы РНК, которые эффективно импортируются в митохондрии млекопитающих и там блокируют репликацию специфических молекул мтДНК (Comte et al., 2013; Tonin et al., 2014). Аналогичные исследования, но с применением РНК-компонентов рибонуклеаз RP (Doersen et al., 1985; Holzmann et al., 2008) и MRP (Chang, Clayton, 1987), участвующих в митохондриальных матричных процессах млекопитающих, позволили предположить, что домены этих типов РНК могут также служить в качестве детерминант целевого импорта в митохондрии (Wang et al., 2012). Все обнаруженные цитозольные РНК, транспортируемые в митохондрии, являются малыми, некодирующими и содержат палиндромные последовательности, образующие шпильки, ответственные за импорт РНК. Введение таких вторичных структур в последовательность нРНК, вероятно, также может способствовать ее транспортировке в матрикс митохондрий.

В настоящем исследовании впервые проведена работа по модификации РНК-компонента системы CRISPR/Cas9–нРНК для ее направленного импорта во внутримитохондриальное пространство. Поскольку белковый компонент CRISPR/Cas9 ранее уже был адаптирован для импорта в матрикс митохондрий (Орищенко и др., 2016), перепрограммирование нРНК даст возможность манипулировать уровнем гетероплазмы мтДНК в митохондриях млекопитающих.

Материалы и методы

Плазмидные конструкции. Фрагмент митохондриальной ДНК человека, включающий протоспейсер в гене mtND1, амплифицировали с применением ПЦР при использовании праймеров L2797 5'-GTCCCTAAACTACCAACCTGC-3' и H3733 5'-ATGATGGCTAGGGTGACTTC-3' и высокоточной полимеразы Q5, согласно рекомендациям производителя. Подбор последовательности, направляющей РНК на целевой участок мтДНК, осуществляли *in silico* с помощью онлайн-платформы Benchling (<https://benchling.com/>). Выбор нРНК с наименьшим числом потенциальных неспецифических сайтов был произведен посредством онлайн-сервиса на сайте <http://crispr.mit.edu/>. Карты плазмидных векторов нРНК с модификация-

ми построены при помощи программного обеспечения SnapGene (<https://www.snapgene.com/>). Все конструкции проанализированы *in silico* для предсказания вторичной структуры с использованием программы RNAfold из пакета ViennaRNA (Lorenz et al., 2011). Для сборки плазмид, экспрессирующих нРНК, олигонуклеотиды с перекрывающимися концами гибридизовали и встраивали в вектор экспрессии gRNA Cloning Vector, любезно предоставленный George Church (Addgene plasmid # 41824; http://n2t.net/addgene:41824; RRID:Addgene_41824), методом бесшовной сборки по Гибсону. Сборку плазмид по методу Гибсона (NEB, США) осуществляли согласно инструкции фирмы-производителя. Правильность сборки конструкций подтверждали секвенированием по методу Сэнгера.

Реакции *in vitro* расщепления ДНК-субстрата. Направляющие РНК транскрибировали *in vitro* с использованием набора быстрого высокоэффективного синтеза РНК HiScribe T7 согласно рекомендациям производителя (NEB E2050). Полученные нРНК очищали фенол-хлороформной экстракцией с последующим осаждением этанолом. Концентрацию синтезированной РНК измеряли посредством спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific) и затем разбавляли до рабочей концентрации 300 нМ. Реакцию расщепления проводили в объеме 30 мкл: 1 мкл 1 мкМ нуклеазы Cas9 (конечная концентрация ~30 нМ) *Streptococcus pyogenes* (NEB M0386L), 3 мкл 10× реакционного буфера для нуклеазы Cas9 (NEB B0386A), 1 мкл 300 нМ нРНК. Конечный объем реакции доводили водой, не содержащей нуклеаз. После предварительной инкубации в течение 10 мин при 25 °С в реакционную смесь добавляли 1 мкл 30 нМ ДНК-субстрата и инкубировали при 37 °С в течение 45 мин. Реакции расщепления останавливали добавлением 1 мкл 20 мг/мл протеиназы К (NEB P8107S) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Образовавшиеся продукты расщепления анализировали методом электрофореза в 1.5 % агарозном геле. Наличие фрагментов 678 и 298 п. н. свидетельствовало о специфическом расщеплении ДНК-субстрата. Реакции *in vitro* расщепления проводили в трех независимых повторах. Эффективность разрезания ДНК-субстрата определяли при количественной оценке ДНК в бэндах гель-денситометрии в программном обеспечении Image Lab (Bio-Rad, США). Достоверность различий средних значений оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$.

Результаты

Дизайн модифицированных вариантов направляющей РНК. Для изучения влияния модификаций нуклеотидной последовательности направляющей РНК на активность системы CRISPR/Cas9 *in vitro* был проведен дизайн их первичной структуры. Поскольку петли tetraloop и stem loop 2 конститутивной части нРНК (рис. 1, а) частично выступают за пределы рибонуклеопротеинового комплекса (Nishimasu et al., 2014), можно предположить, что введение модификаций в эти локусы не должно повлиять на аффинность связывания всего комплекса с целевой последовательностью ДНК, а также на его функциональную активность. Поэтому нуклеотиды GAAA соответствующих петель (tetraloop или stem loop 2) нРНК заменяли

последовательностью нуклеотидов одной из четырех детерминант импорта РНК в митохондрии: шпильки HD, HF, RP, MRP (см. рис. 1, б) – во всех возможных конформациях (прямая, обратная, комплементарная, обратнo-комплементарная). В результате было получено 32 варианта нРНК со встройкой в структуру tetraloop или stem loop 2 детерминант импорта РНК в митохондрии в разных конформациях. Для каждого варианта модифицированной нРНК была предсказана вторичная структура с использованием веб-сервера RNAfold из пакета программного обеспечения ViennaRNA (Lorenz et al., 2011). Предсказанные *in silico* структуры модифицированных нРНК сравнивали с идеальной теоретической, в которой петли tetraloop или stem loop 2 не были изменены. Для каждой из детерминант импорта было отобрано по одной наиболее оптимальной конформации при встройке в каждую из петель tetraloop или stem loop 2 нРНК. Всего получено восемь вариантов модифицированных нРНК, вторичные структуры которых имели минимальные отличия от немодифицированной нРНК (см. таблицу). Варианты модифицированных нРНК клонировали в вектор gRNA-cloning vector. Вариант HF-SL клонировать не удалось из-за технических трудностей, которые, вероятнее всего, связаны со вторичной структурой в нуклеотидной последовательности.

Анализ влияния модификаций нРНК на функциональную активность комплекса нРНК/Cas9 *in vitro*.

Оценку функциональной активности комплекса нуклеазы Cas9 с различными вариантами модифицированных нРНК проводили с использованием реакций *in vitro* расщепления субстрата ДНК. В реакциях применяли нРНК, синтезированную при помощи *in vitro* транскрипции с РНК-полимеразой T7, и коммерческую рекомбинантную нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*. В качестве субстрата добавляли двуцепочечный фрагмент ДНК длиной 976 п. н., амплифицированный посредством ПЦР. Протоспейсер подбирали таким образом, чтобы в случае успешного внесения комплексом нРНК/Cas9 двуцепочечного разрыва в ДНК-субстрат образовывалось два фрагмента длиной 298 и 678 п. н. В качестве контроля проводили реакции *in vitro* расщепления с немодифицированной нРНК (NEG) и без добавления нРНК. Все реакции осуществляли в трех независимых повторах. Результаты электрофореза в агарозном геле продуктов реакций *in vitro* расщепления представлены на рис. 2, а. При использовании всех вариантов модифицированных нРНК происходит специфическое расщепление ДНК-субстрата с образованием фрагментов ожидаемого размера. Таким образом, несмотря на внесенные модификации в структуру направляющей РНК, комплекс нРНК/Cas9 сохраняет свою функциональную активность.

Количественную оценку эффективности разрезания ДНК-субстрата осуществляли посредством денситометрии. Эффективность расщепления определяли по отношению плотности пикселей в полосах, соответствующих расщепленному ДНК-субстрату, к исходному неразрезанному фрагменту (см. рис. 2, б). Эффективность разрезания ДНК-субстрата нуклеазой Cas9 в комплексе с немодифицированной РНК (NEG) составляет 67 %. Модификация нРНК путем встройки детерминанты импорта HD в прямую конформации в петлю stem loop 2 нРНК (вариант HD-SLO) статистически значимо ($p \leq 0.05$) снижала

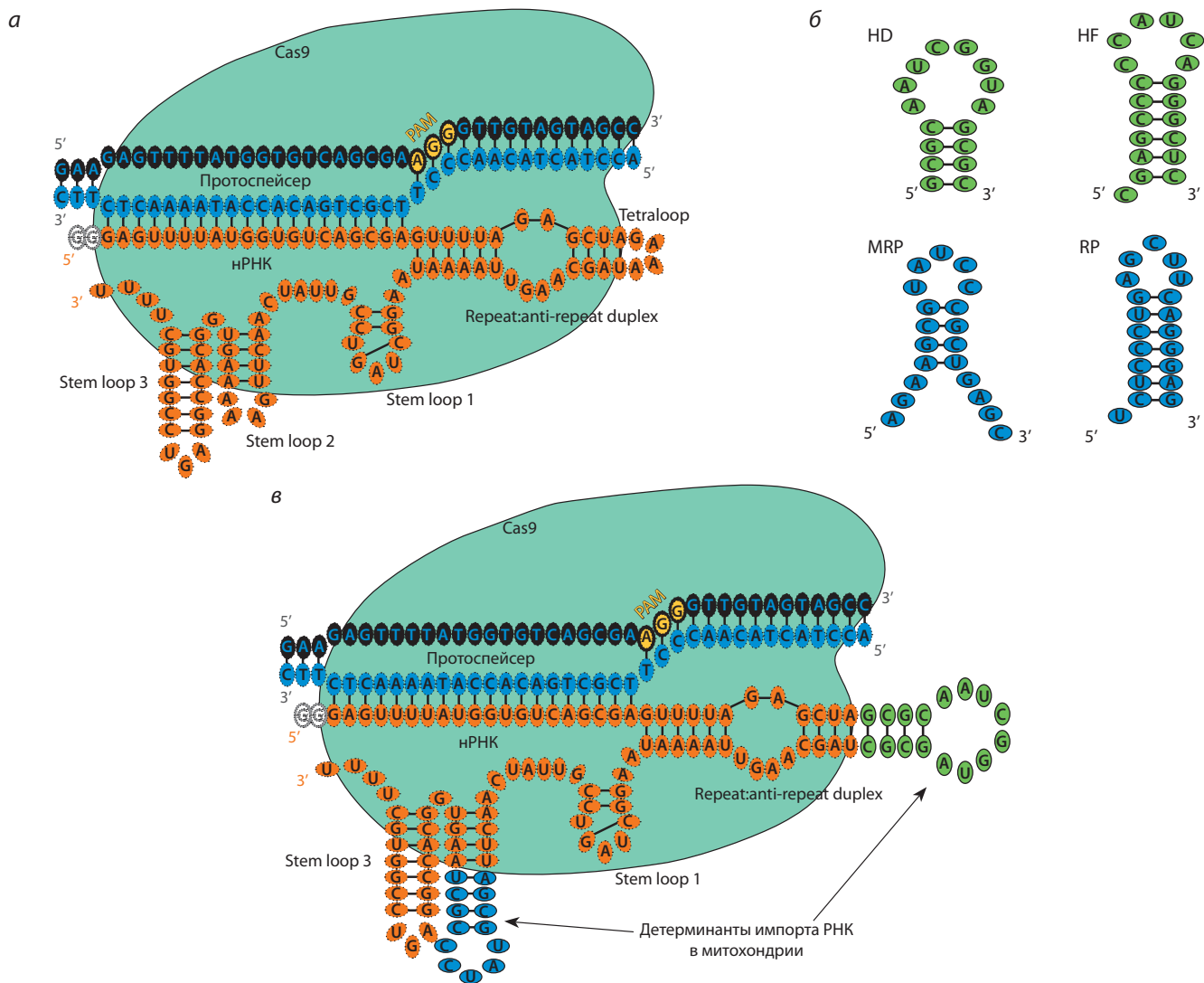


Рис. 1. Дизайн рекомбинантных молекул нРНК.

a – организация комплекса ДНК-нРНК-Cas9, где петли tetraloop и stem loop 2 нРНК свободны от взаимодействия с нуклеазой; *б* – структура шпилек, предположительно выступающих в качестве детерминант импорта РНК в митохондрии; *в* – пример замещения участков петель конstitutивной части нРНК детерминантами импорта.

Характеристика модифицированных направляющих РНК

Модификация нРНК	Расположение детерминанты импорта	Конформация детерминанты импорта	5'–3' вторичная структура нРНК
NEG	Без модификаций	–	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....)))) Tetraloop Stem loop 2
MRP-TLR	Tetraloop	Обратная	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
RP-TLO	Tetraloop	Прямая	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
HD-TLO	Tetraloop	Прямая	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
HF-TLR	Tetraloop	Обратная	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
MRP-SLO	Stem loop 2	Прямая	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
RP-SLO	Stem loop 2	Прямая	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
HD-SLO	Stem loop 2	Прямая	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
HF-SLO	Stem loop 2	Прямая	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))

Примечание. Вторичная структура нРНК представлена в виде точно-скобочной модели. Каждый из символов соответствует основанию в нуклеотидной последовательности нРНК. Скобка обозначает спаренное основание в последовательности нРНК. Точками обозначены неспаренные основания, которые соответствуют петлям в структуре шпилек. Немодифицированные шпильки tetraloop и stem loop 2 выделены серым цветом.

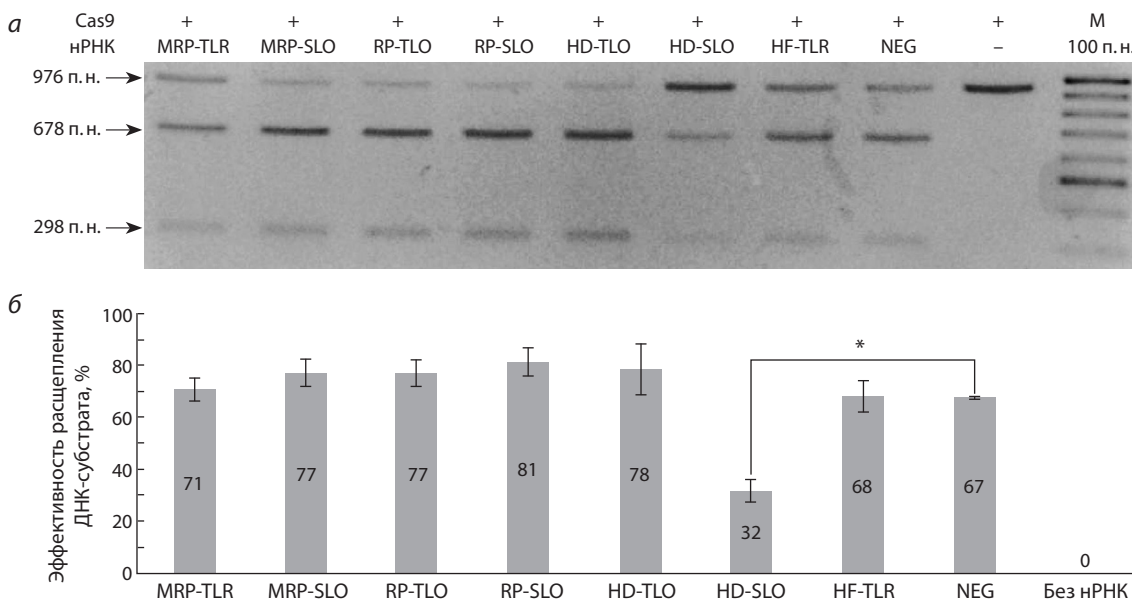


Рис. 2. Расщепление *in vitro* ДНК-субстрата нуклеазой Cas9 в комплексе с различными вариантами модифицированных нРНК. *a* – продукты реакций *in vitro* расщепления анализировали при использовании электрофореза в агарозном геле; *б* – эффективность расщепления ДНК-субстрата оценивали с помощью денситометрии; стандартное отклонение приведено для трех независимых экспериментов. М – ДНК-маркер с шагом 100 п. н.; * значимые различия ($p \leq 0.05$) между средними значениями эффективности расщепления ДНК-субстрата нуклеазой Cas9 в комплексе с немодифицированной нРНК и с модифицированной нРНК.

эффективность расщепления ДНК-субстрата до 32 %, т. е. более чем в два раза по сравнению с немодифицированной РНК (NEG). Другие варианты модификаций нРНК не приводили к каким-либо статистически значимым изменениям в эффективности расщепления ДНК-субстрата.

Обсуждение

Система CRISPR/Cas9 произвела революцию в технологиях редактирования ядерной ДНК и открыла новые возможности как для изучения фундаментальных биологических процессов, так и для разработки подходов лечения заболеваний человека. Адаптация CRISPR/Cas9 для манипуляций с митохондриальной ДНК – цель многих лабораторий по всему миру (Verechshagina et al., 2019). Однако убедительно продемонстрировать эффективную работу подобной системы в митохондриях никому так и не удалось, причем существует мнение, что митохондрии, – возможно, единственные структуры, для которых адаптировать систему CRISPR/Cas9 не получится (Gammage et al., 2018).

Трудности с адаптацией системы для работы в митохондриях прежде всего связаны с тем, что для импорта во внутреннее пространство митохондрии компонентам системы необходимо преодолеть барьер в виде внешней и внутренней митохондриальных мембран. В состав митохондрий входит около 1500 тыс. белков, которые выполняют разнообразные функции, и при этом только 13 из них закодированы в мтДНК и синтезируются непосредственно в митохондриях (Calvo, Mootha, 2010). Неудивительно, что существуют молекулярные механизмы импорта белков во все компартменты митохондрий, и они подробно изучены (Pfanter et al., 2019). Ранее нами (Орищенко и др., 2016), а также другими группами исследователей (Jo et al., 2015; Loutre et al., 2018; Bian et al., 2019) было показано, что

добавление сигнала митохондриальной локализации с N-конца нуклеазы Cas9 приводит к эффективному импорту Cas9 в матрикс митохондрий. Таким образом, один из компонентов системы CRISPR/Cas9 может быть доставлен во внутреннее пространство митохондрий.

Второй этап адаптации CRISPR/Cas9 системы для модификаций мтДНК – импорт нРНК в митохондрии. К сожалению, в настоящее время молекулярные механизмы транспорта РНК через митохондриальные мембраны у млекопитающих не описаны, и нет единого мнения относительно того, какие РНК импортируются, какую функцию они выполняют в митохондриях и через какие каналы осуществляется транспорт. Поэтому разработка подходов импорта направляющей РНК в митохондрии – наиболее узкое место на пути адаптации системы.

Несмотря на это, существует большое количество актуальных публикаций, в которых экспериментально демонстрируется импорт разнообразных типов РНК в митохондрии (Rubio et al., 2008; Wang et al., 2010; Fan et al., 2019; Jeandard et al., 2019). Как правило, детерминантой импорта в таких РНК является шпильчатая структура типа стебель-петля. Показано, что шпильки HF и HD в транспортной РНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* отвечают за импорт в митохондрии tRNA^{Lys} CUU (tRK1). Добавление этих шпилек в структуру других РНК приводило к импорту в митохондрии *in vivo* и восстановлению функций нарушенных патогенными мутациями в мтДНК (Kazakova et al., 1999; Kamenski et al., 2010; Gowher et al., 2013; Tonin et al., 2014). Установлено также, что шпильки RP и MRP в структуре H1 РНК и 7-2 РНК соответственно, выполняют функции детерминант импорта в митохондрии (Wang et al., 2010; Noh et al., 2016; Markantone et al., 2018). Поэтому можно предположить, что добавление подобных детерминант в структуру направляющей РНК позво-

лит достичь ее эффективного импорта в матрикс митохондрий.

Ранее оба компонента системы CRISPR/Cas9 уже подвергались многочисленным модификациям с целью увеличения эффективности и специфичности системы, а также расширения функциональных возможностей. В направляющей РНК выделяют несколько структурных элементов: спейсер – участок длиной около 20 нуклеотидов с 5'-конца нРНК, комплементарный целевой последовательности ДНК в геноме, четыре шпильки – вторичные структуры РНК типа стебель-петля (tetraloop, stem loop 1 или nexus, stem loop 2 и stem loop 3), причем в структуре шпильки tetraloop выделяют нижний стебель, выступ и верхний стебель (Briner et al., 2014; Nishimasu et al., 2014). С помощью направленного мутагенеза выявлено, что выступ и stem loop 1 (nexus) – ключевые элементы в структуре нРНК, необходимые для активности системы CRISPR/Cas9. В свою очередь, верхний стебель в шпильке tetraloop и шпилька stem loop 2 могут быть значительно модифицированы или даже полностью удалены из нРНК, и при этом активность комплекса нРНК/Cas9 сохраняется (Briner et al., 2014; Kopernmann et al., 2015). Более того, при увеличении длины шпилек tetraloop и stem loop 2 повышались стабильность нРНК и эффективность сборки комплекса нРНК и неактивной нуклеазы Cas9 (Ma et al., 2016; Shao et al., 2016). Поэтому мы предположили, что внесение детерминант митохондриального импорта именно в эти структуры нРНК приведет к ее митохондриальной локализации и не повлияет на функциональную активность комплекса нРНК/Cas9.

В нашей работе шпильки HD, HF, RP и MRP были встроены в структуру tetraloop или stem loop 2 нРНК в разнообразных конформациях. Влияние модификаций нРНК на функциональную активность комплекса нРНК/Cas9 оценивали посредством реакций *in vitro* расщепления субстрата ДНК. При использовании всех вариантов модифицированной нРНК происходило специфическое расщепление ДНК-субстрата (см. рис. 2, а), что указывает на то, что введенные нами модификации не нарушают процесс формирования комплекса нРНК/Cas9, специфичность связывания комплекса с ДНК-субстратом, а также нуклеазную активность Cas9. Однако необходимо отметить, что некоторые из модификаций нРНК приводили как к увеличению, так и к снижению эффективности расщепления ДНК-субстрата комплексом нРНК/Cas9. Это может быть связано с влиянием модификаций на стабильность нРНК, эффективность формирования комплекса нРНК/Cas9, а также нуклеазную активность Cas9 (Nowak et al., 2016).

В работе (Loutre et al., 2018) был применен аналогичный подход для импорта нРНК в матрикс митохондрий, только детерминанты импорта были добавлены на 5'- либо 3'-конец нРНК. В случае модификации 3'-конца активность комплекса нРНК/Cas9 *in vitro* была сравнимой с активностью комплекса при использовании немодифицированной РНК, тогда как при модификации 5'-конца активность комплекса значительно снижалась. Сокращение активности комплекса нРНК/Cas9 при использовании в реакции *in vitro* нРНК с модифицированным 5'-концом, скорее всего, связано с процессированием и деградацией 5'-конца модифицированной нРНК, что было продемонстрировано ранее для нРНК с увеличенным районом спейсера, а также

встройкой с 5'-конца MS2 и PP7 шпилек (Ran et al., 2013; Zalatan et al., 2015; Nowak et al., 2016). Модификация 3'-конца также может негативно сказываться на уровне экспрессии и стабильности нРНК, что, в свою очередь, повлияет на активность комплекса нРНК/Cas9 (Zalatan et al., 2015).

Заключение

Таким образом, оптимальным местом для модификации нРНК и, в частности, встройки детерминант импорта в митохондрию являются шпильки tetraloop и stem loop 2. Однако все варианты модификаций необходимо тестировать не только *in vitro*, но и *in vivo* на клеточных линиях, анализируя как активность комплекса нРНК/Cas9, так и эффективность импорта обоих компонентов в митохондрии.

Список литературы / References

- Орищенко К.Е., Софронова Ю.К., Чупахин Е.Г., Лунев Е.А., Мазунин И.О. Импорт нуклеазы Cas9 в митохондрии. *Гены и клетки*. 2016;11(2):100-105.
[Orishchenko K.E., Sofronova J.K., Chupakhin E.G., Lunev E.A., Mazunin I.O. Delivery Cas9 into mitochondria. *Geny i Kletki = Genes and Cells*. 2016;11(2):100-105. (in Russian)]
- Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*. 2014;513(7519):569-573. DOI 10.1038/nature13579.
- Bian W.P., Chen Y.L., Luo J.J., Wang C., Xie S.L., Pei D.S. A knock-in strategy for editing human and zebrafish mitochondrial DNA using mito-CRISPR/Cas9 system. *ACS Synth. Biol.* 2019;8(4):621-632. DOI 10.1021/acssynbio.8b00411.
- Briner A.E., Donohue P.D., Goma A.A., Selle K., Slorach E.M., Nye C.H., Haurwitz R.E., Beisel C.L., May A.P., Barrangou R. Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality. *Mol. Cell*. 2014;56(2):333-339. DOI 10.1016/j.molcel.2014.09.019.
- Calvo S.E., Mootha V.K. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2010;11(1):25-44. DOI 10.1146/annurev-genom-082509-141720.
- Chang D.D., Clayton D.A. A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science*. 1987;235:1178-1184. DOI 10.1126/science.2434997.
- Comte C., Tonin Y., Heckel-Mager A.-M., Boucheham A., Smirnov A., Auré K., Lombès A., Martin R.P., Entelis N., Tarassov I. Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):418-433. DOI 10.1093/nar/gks965.
- Doersen C.J., Guerrier-Takada C., Altman S., Attardi G. Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity. *J. Biol. Chem.* 1985; 260(10): 5942-5949.
- Fan S., Tian T., Chen W., Lv X., Lei X., Zhang H., Sun S., Cai L., Pan G., He L., Ou Z., Lin X., Wang X., Perez M.F., Tu Z., Ferrone S., Tannous B.A., Li J. Mitochondrial miRNA determines chemoresistance by reprogramming metabolism and regulating mitochondrial transcription. *Cancer Res.* 2019;79(6):1069-1084. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-18-2505.
- Gammage P.A., Moraes C.T., Minczuk M. Mitochondrial genome engineering: the revolution may not be CRISPR-ized. *Trends Genet.* 2018;34(2):101-110. DOI 10.1016/j.tig.2017.11.001.
- Gowher A., Smirnov A., Tarassov I., Entelis N. Induced tRNA import into human mitochondria: implication of a host aminoacyl-tRNA-synthetase. *PLoS One*. 2013;8(6):e66228. DOI 10.1371/journal.pone.0066228.
- Holzmann J., Frank P., Löffler E., Bennett K.L., Gerner C., Rossmannith W. RNase P without RNA: identification and functional re-

- constitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell*. 2008;135(3):462-474. DOI 10.1016/j.cell.2008.09.013.
- Jeandard D., Smirnova A., Tarassov I., Barrey E., Smirnov A., Entelis N. Import of non-coding RNAs into human mitochondria: A critical review and emerging approaches. *Cells*. 2019;8(3):286. DOI 10.3390/cells8030286.
- Jiang F., Doudna J.A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* 2017;46(1):505-529. DOI 10.1146/annurev-biophys-062215-010822.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. DOI 10.1126/science.1225829.
- Jinek M., Jiang F., Taylor D.W., Sternberg S.H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A.T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J.A. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. 2014;343(6176):1247997. DOI 10.1126/science.1247997.
- Jo A., Ham S., Lee G.H., Lee Y.I., Kim S., Lee Y.S., Shin J.H., Lee Y. Efficient mitochondrial genome editing by CRISPR/Cas9. *BioMed Res. Int.* 2015;2015:305716. DOI 10.1155/2015/305716.
- Kamenski P., Kolesnikova O., Jubenot V., Entelis N., Krashennikov I.A., Martin R.P., Tarassov I. Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol. *Mol. Cell*. 2007;26(5):625-637. DOI 10.1016/j.molcel.2007.04.019.
- Kamenski P., Smirnova E., Kolesnikova O., Krashennikov I.A., Martin R.P., Entelis N., Tarassov I. tRNA mitochondrial import in yeast: Mapping of the import determinants in the carrier protein, the precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. *Mitochondrion*. 2010;10(3):284-293. DOI 10.1016/j.mito.2010.01.002.
- Kazakova H.A., Entelis N.S., Martin R.P., Tarassov I.A. The amino-acceptor stem of the yeast tRNA(Lys) contains determinants of mitochondrial import selectivity. *FEBS Lett.* 1999;442(2-3):193-197. DOI 10.1016/S0014-5793(98)01653-6.
- Komor A.C., Badran A.H., Liu D.R. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*. 2017;168(1-2):20-36. DOI 10.1016/j.cell.2016.10.044.
- Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Joung J., Abudayyeh O.O., Barcena C., Hsu P.D., Habib N., Gootenberg J.S., Nishimasu H., Nureki O., Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*. 2015;517(7536):583-588. DOI 10.1038/nature14136.
- Lorenz R., Bernhart S.H., Höner zu Siederdisen C., Tafer H., Flamm C., Stadler P.F., Hofacker I.L. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* 2011;6(1):26. DOI 10.1186/1748-7188-6-26.
- Loutre R., Heckel A.M., Smirnova A., Entelis N., Tarassov I. Can mitochondrial DNA be CRISPRized: Pro and contra. *IUBMB Life*. 2018;70(12):1233-1239. DOI 10.1002/iub.1919.
- Ma H., Tu L.C., Naseri A., Huisman M., Zhang S., Grunwald D., Pederson T. Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(5):528-530. DOI 10.1038/nbt.3526.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823-826. DOI 10.1126/science.1232033.
- Markantone D.M., Towheed A., Crain A.T., Collins J.M., Celotto A.M., Palladino M.J. Protein coding mitochondrial-targeted RNAs rescue mitochondrial disease *in vivo*. *Neurobiol. Dis.* 2018;117:203-210. DOI 10.1016/j.nbd.2018.06.009.
- Martin R.P., Schneller J.M., Stahl A.J., Dirheimer G. Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry*. 1979;18(21):4600-4605. DOI 10.1021/bi00588a021.
- Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935-949. DOI 10.1016/j.cell.2014.02.001.
- Noh J.H., Kim K.M., Abdelmohsen K., Yoon J.H., Panda A.C., Munk R., Kim J., Curtis J., Moad C.A., Wohler C.M., Indig F.E., de Paula W., Dudekula D.B., De S., Piao Y., Yang X., Martindale J.L., de Cabo R., Gorospe M. HuR and GRSF1 modulate the nuclear export and mitochondrial localization of the lncRNA RMRP. *Genes Dev*. 2016;30(10):1224-1239. DOI 10.1101/gad.276022.115.
- Nowak C.M., Lawson S., Zerez M., Bleris L. Guide RNA engineering for versatile Cas9 functionality. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(20):9555-9564. DOI 10.1093/nar/gkw908.
- Pfanner N., Warscheid B., Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019;20:267-284. DOI 10.1038/s41580-018-0092-0.
- Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013;8:2281-2308. DOI 10.1038/nprot.2013.143.
- Rubio M.A., Rinehart J.J., Krett B., Duvezin-Caubet S., Reichert A.S., Söll D., Alfonzo J.D. Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105(27):9186-9191. DOI 10.1073/pnas.0804283105.
- Shao S., Zhang W., Hu H., Xue B., Qin J., Sun C., Sun Y., Wei W., Sun Y. Long-term dual-color tracking of genomic loci by modified sgRNAs of the CRISPR/Cas9 system. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(9):e86-e86. DOI 10.1093/nar/gkw066.
- Tonin Y., Heckel A.M., Vysokikh M., Dovydenko I., Meschaninova M., Rötig A., Munnich A., Venyaminova A., Tarassov I., Entelis N. Modeling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* 2014;289(19):13323-13334. DOI 10.1074/jbc.M113.528968.
- Verechshagina N., Nikitchina N., Yamada Y., Harashima H., Tanaka M., Orishchenko K., Mazunin I. Future of human mitochondrial DNA editing technologies. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq. Anal.* 2019;30(2):214-221. DOI 10.1080/24701394.2018.1472773.
- Wang G., Chen H.-W.W., Oktay Y., Zhang J., Allen E.L., Smith G.M., Fan K.C., Hong J.S., French S.W., McCaffery J.M., Lightowers R.N., Morse H.C., Koehler C.M., Teitell M.A. PNPase regulates RNA import into mitochondria. *Cell*. 2010;142(3):456-467. DOI 10.1016/j.cell.2010.06.035.
- Wang G., Shimada E., Zhang J., Hong J.S., Smith G.M., Teitell M.A., Koehler C.M. Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(13):4840-4845. DOI 10.1073/pnas.1116792109.
- Wright A.V., Sternberg S.H., Taylor D.W., Staahl B.T., Bardales J.A., Kornfeld J.E., Doudna J.A. Rational design of a split-Cas9 enzyme complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(10):2984-2989. DOI 10.1073/pnas.1501698112.
- Zalatan J.G., Lee M.E., Almeida R., Gilbert L.A., Whitehead E.H., La Russa M., Tsai J.C., Weissman J.S., Dueber J.E., Qi L.S., Lim W.A. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell*. 2015;160(1-2):339-350. DOI 10.1016/j.cell.2014.11.052.

ORCID ID

K.E. Orishchenko orcid.org/0000-0001-9718-9038

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИЦиГ СО РАН «Молекулярно-генетические основы регуляции экспрессии генов, морфологии, дифференцировки и перепрограммирования клеток» (№ 0324-2019-0042-C-01), при частичной поддержке бюджетного проекта № 0259-2019-0001 и гранта РФФИ № 17-75-20015.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 29.11.2019. После доработки 24.03.2020. Принята к публикации 27.05.2020.