

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem

Új megnövelt pontosságú SpCas9 variánsok létrehozása

Kulcsár Péter István

Doktori disszertáció magyar nyelvű rövid összefoglalója

Témavezető:

Dr. Ervin Welker

Biokémiai Intézet
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Magyar Tudományos Akadémia

Enzimológiai Intézet
Természettudományi Kutatóközpont
Magyar Tudományos Akadémia

Szeged

2019

Közlemények listája

A disszertáció témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények:

- I. **Kulcsár P. I.**, Tálás A., Huszár K., Ligeti Z., Tóth E., Weinhardt N., Fodor E., Welker E., Crossing enhanced and high fidelity SpCas9 nucleases to optimize specificity and cleavage, *Genome Biology* (2017). **IF: 13.214**
- II. Tálás A., **Kulcsár P. I.**, Weinhardt N., Borsy A., Tóth E., Szabó K., Krausz S. L., Huszár K., Vida I., Sturm Á., Gordos B., Hoffmann O. I., Bencsura P., Nyeste A., Ligeti Z., Fodor E., Welker E., A convenient method to pre-screen candidate guide RNAs for CRISPR/Cas9 gene editing by NHEJ-mediated integration of a 'self-cleaving' GFP-expression plasmid, *DNA Research* (2017). **IF: 5.415**

A disszertációhoz közvetlenül kapcsolódó közlemények kumulatív hatástényezője: 18.629

A disszertáció témájához közvetve kapcsolódó közlemények:

- III. Tóth E., Czene B. C., **Kulcsár P. I.**, Krausz S. L., Tálás A., Nyeste A., Varga É., Huszár K., Weinhardt N., Ligeti Z., Borsy A. É., Fodor E., Welker E., Mb-and FnCpf1 nucleases are active in mammalian cells: activities and PAM preferences of four wild-type Cpf1 nucleases and of their altered PAM specificity variants, *Nucleic acids research* (2018). **IF: 11.147**
- IV. Tóth E., Weinhardt N., Bencsura P., Huszár K., **Kulcsár P. I.**, Tálás A., Fodor E., Welker E., Cpf1 nucleases demonstrate robust activity to induce DNA modification by exploiting homology directed repair pathways in mammalian cells, *Biology Direct* (2016). **IF: 2.856**

A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények:

- V. Billes V., Kovács T., Manzóger A., Lőrincz P., Szincák S., Rezgős Á., **Kulcsár P. I.**, Korcsmáros T., Lukácsovich T., Hoffmann Gy., Erdélyi M., Mihály J., Takács-Vellai K., Sass M., Vellai T., Developmentally regulated autophagy is required for eye formation in *Drosophila*, *Autophagy* (2018). **IF: 11.059**
- VI. Tóth E., Huszár K., Bencsura P., **Kulcsár P. I.**, Vodicska B., Nyeste A., Welker Zs., Tóth Sz., Welker E., Restriction Enzyme Body Doubles and PCR Cloning: On the General Use of Type IIS Restriction Enzymes for Cloning, *Plos One* (2014). **IF: 3.234**
- VII. Kulcsár G., Gaál D., **Kulcsár P.I.**, Schulcz Á., Czömpöly T. A mixture of amino acids and other small molecules present in the serum suppresses the growth of murine and human tumors in vivo., *Int J Cancer*, (2013). **IF: 5.007**
- VIII. Tóth E., **Kulcsár P. I.**, Fodor E., Ayaydin F., Kalmár L., Borsy A. E., László L., Welker E., The highly conserved, N-terminal (RXXX)(8) motif of mouse Shadoo mediates nuclear accumulation., *Biochim Biophys Acta* (2013). **IF: 5.297**

Az összes közlemény kumulatív hatástényezője: 57.229, h-index: 5, hivatkozások: 102

Bevezetés

Az új genommódosítási technikák kifejlesztése jelentősen megnövelte annak a lehetőségét, hogy bármilyen célszervezet genomjában célzott változásokat tudjunk létrehozni. Ezen technikák alkalmazása az orvosi kezelésektől, a mezőgazdaságon át az alapkutatásig nagy lehetőséget rejt magában. Az egyik kritikus kérdés, amelyet meg kellett oldani ahhoz, hogy a genomszerkesztés széles körben használható legyen, olyan módszerek kifejlesztése volt, melyek a DNS célzott módosítását lehetővé teszik. Habár a meganukleázok (MN), a cinkujjas nukleázok (ZFN) és a TALE-nukleázok (TALEN) fontos lépést jelentettek a terület fejlődése során, egyértelműen a CRISPR/Cas9 (CRISPR: halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések, angolul: clustered regularly interspaced short palindromic repeats; Cas9: CRISPR asszociált fehérje 9, angolul: CRISPR associated protein 9) rendszer alkalmazása az, ami forradalmasította a genomszerkesztést.

A CRISPR/Cas endonukleázok olyan RNS-vezérelt fehérjék, amelyek egy kiválasztott DNS- vagy RNS-szekvencia célzott hasítására képesek. Archaeákban és baktériumokban adaptív immunitást biztosítanak a vírusok, plazmidok és transzpozonok ellen. A CRISPR/Cas rendszereket a tudomány jelenlegi állása szerint két osztályba sorolhatjuk. Az 1. osztály olyan alcsoportokat tartalmaz, amelyekben több effektor alegységgel rendelkező komplexek találhatóak, míg a 2. osztály olyan rendszereket foglal magába, amelyek egyszerűbb, egyetlen multifunkcionális, több doménnel rendelkező fehérjéket tartalmaznak. A 2. osztály II. típusú rendszerek nukleázai hasonló domén felépítésű Cas proteinek tartalmazzák, beleértve a RuvC-szerű és a HNH nukleáz doméneket, amelyek mindegyike egy-egy DNS-szálat hasít. Az első publikált eredmények óta számos különféle CRISPR/Cas nukleáz használatát mutatták be genomszerkesztésre, de közülük a *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) vált napjainkban a genom módosítás leggyakrabban használt eszközévé.

A Cas9 nukleázok ribonukleoprotein komplexe (RNP) magából a Cas9 fehérjéből és két Cas9-asszociált RNS-ből áll [CRISPR RNS (crRNS) és a transzaktiváló crRNS (tracrRNS)], amelyek egymáshoz képest komplementer szekvenciákat tartalmaznak. A DNS kötéséhez és hasításához szükséges a komplementaritás a cél DNS szekvencia és a crRNS spacer-szekvenciája között, valamint a célszekvencia (on-target) 3'-végénél egy rövid PAM motívum (protospacer-adjacent motif) jelenléte. Megmutatták, hogy az SpCas9 nukleázok a kívánt célszekvenciákhoz irányíthatók egy fuzionált cr- és tracrRNS-sel, amelyet sgRNS-nek neveznek.

Habár az SpCas9 fehérje használatának a korábbi rendszerekhez képest sok előnye van, ez a rendszer is rendelkezik néhány limitációval. A komolyabb limitációi közé tartozik a változó hasítási hatékonyság (azaz a kívánt célszekvencia hány százalékát sikerül módosítani), valamint a specificitás/pontosság (azaz az on-target és az off-target hasítás aránya). Az SpCas9 fehérjével a célszekvenciák többségén jó hasítási hatékonyság érhető el, de jelentős off-target hatás mellett; azaz a nukleáz olyan szekvenciákat is hasít, amelyek korlátozott, részleges komplementaritást mutatnak csak az sgRNS spacer szekvenciájával. Megmutatták, hogy az SpCas9 képes hasítani olyan off-target szekvenciákat is, amelyek akár 5-6 bázis-eltéréssel is rendelkeznek a spacer szekvenciához képest, és ezen off-target szekvenciákat *in silico* nehéz prediktálni. Ez problémát jelenthet számos kutatási alkalmazás esetén, és korlátozhatja a nukleáz terápiás célokra való felhasználását.

Számos kutatás irányult arra, hogy különféle módszerekkel csökkentse az SpCas9 nukleáz off-target hatását. A nagyobb pontosságú SpCas9 hasítást lehetővé tevő módszerek fejlesztésének két fő iránya van: (i) az SpCas9 fehérje hatását oly módon próbálják meg korlátozni a sejtekben, hogy az továbbra is megfelelően nagy aktivitással bírjon az on-target hasítás esetén, de semmilyen vagy nagyon alacsony off-target aktivitással rendelkezzen. Erre általában két megközelítést alkalmaznak: az expozíció idejét vagy mértékét korlátozzák (például indukálható Cas9-el vagy *in vitro* expresszált ribonukleoprotein komplex alkalmazásával), vagy a fehérje aktivitását korlátozzák olyan sgRNS-ekkel, amelyekben a spacer szekvencia csonkított (truncated) vagy meghosszabbított. (ii) A másik lehetséges irány az, hogy növeljük a felismerési szekvenciát például párosított SpCas9-nikázok használatával vagy katalitikusan inaktív SpCas9-párok használatával, amelyeket nem-specifikus *FokI* nukleáz doménekhez fuzionáltak.

Azonban az egyik legígéretesebb megközelítés az off-target hatás csökkentésére a megnövelt pontosságú SpCas9 variánsok létrehozása. Az első két ilyen publikált variáns az eSpCas9 és az SpCas9-HF1 volt, melyeket racionális tervezéssel hoztak létre. Mindkét mutáns jelentősen csökkentette a fellépő off-target hatást. Még akkor is ezt tapasztalták, ha teljes genom off-target analízissel vizsgálták őket, habár még mindig találtak olyan off-target szekvenciákat, amiket a két variáns hasított. Azonban ezek a szekvenciák elsősorban olyanok voltak, amelyek csak egy bázissal tértek el az on-target szekvenciától. Továbbá a célszekvenciák egy részhalmaza, amelyet az SpCas9-HF1 publikációban atipikusnak neveztek és ismétlődő vagy homopolimer szekvenciákból álltak, még mindig jelentős mértékű off-target hatást mutattak. Ezen két megjelent publikációt követően további megnövelt pontosságú SpCas9 variánsokat is

leírtak: az ugyancsak racionális tervezéssel kifejlesztett HypaSpCas9-et és az evoSpCas9-et, az utóbbit egy szelekciós sémával azonosították.

Azonban kimutatták, hogy a megnövelt pontosságú variánsok rosszul működnek bizonyos típusú 5' módosított sgRNS-ekkel. Ennek a kérdésnek gyakorlati vonatkozásai is vannak: Az sgRNS-ek átírására általánosan alkalmazott promóterek (U6 és T7) szekvencia-követelménye miatt gyakran használnak 5' módosított sgRNS-eket a vad típusú (WT) SpCas9-el, ahol megfelelő 20G-N19-NGG célszekvenciák bioinformatikailag nem azonosíthatók. Egy másik publikált eredmény, hogy a megnövelt pontosságú variánsok bizonyos on-targetek esetén alacsonyabb aktivitást mutatnak, mint a WT SpCas9. Továbbá arról is beszámoltak, hogy a megnövelt pontosságú variánsok nem működnek hatékonyan RNP formában, aminek a klinikai alkalmazások szempontjából is nagy jelentősége van.

Célkitűzések

A megnövelt pontosságú SpCas9 variánsokkal kapott eredmények nagyon biztatóak, de továbbra is vannak olyan célszekvenciák, amelyek csak a jelentős off-target hatás mellett hasíthatóak ezen variánsokkal. Sajnos nagyon rossz hatékonysággal prediktálhatóak, hogy melyek ezek a szekvenciák.

Továbbá nehéz eldönteni, hogy melyik SpCas9 variánst célszerű választani a többi variánssal szemben az olyan alkalmazások esetén, ahol az off-target-mentes hasítás kiemelkedően fontos, mivel ezen nukleázokat különböző kísérletes rendszerekben jellemezték (különböző célszekvenciákon és sejtvonalakban és különböző módszerekkel a genom-szintű specificitásuk meghatározásához).

Annak ellenére, hogy általánosságban elmondható, hogy a megnövelt pontosságú variánsok alkalmazásának köszönhetően az off-target hatás jelentősen csökkent az SpCas9 használata esetén, a bevezetésben megemlített limitációk (pl. alacsony aktivitás 5' módosított sgRNS-ekkel vagy RNP formában történő alkalmazás esetén, valamint a csökkent számú rendelkezésre álló célszekvencia) megakadályozzák a megnövelt pontosságú variánsok teljes potenciáljának kihasználását.

Ezért a következő célokat tűztem ki:

1. A megnövelt pontosságú variánsok szisztematikus jellemzését ugyanazon kísérletes rendszerekben és ugyanolyan körülmények között.
2. A már publikált variánsokhoz képest egy új, még jobban működő és nagyobb pontosságú SpCas9 variáns létrehozását.
3. A megnövelt pontosságú variánsok és a különböző típusú 5' módosított sgRNS-ek közötti kompatibilitás vizsgálatát.
4. Annak vizsgálatát, hogyan lehetne tovább növelni a genommodosítás specificitását a megnövelt pontosságú variánsok és más specificitás-növelő módszerek kombinálásával.

Módszerek

Plazmid konstrukciók

A vektorokat szokásos molekuláris biológiai technikák alkalmazásával állítottuk elő, beleértve a one-pot klónozási módszert, az E. coli DH5a-közvetített DNS-összeállítási módszerét, a NEBuilder HiFi DNS-összeállítást és a Body Double klónozási módszert.

Sejtkultúrák fenntartása és transzfekciója

Ezen kísérletek során az alábbi sejtvonalakat alkalmaztuk: egér N2a, humán HEK293, N2a.dd-EGFP (általunk létrehozott sejtvonal, amely egy példányban integrálva tartalmazza az EGFP-folA dihidrofolát reduktáz destabilizációs domén fúziós fehérjét kódoló kazettát, amelyet a Prnp promotere hajt meg), N2a.EGFP és HEK-293.EGFP (általunk létrehozott sejtvonal, amely egy példányban integrálva tartalmazza az EGFP kazettát, amelyet a Prnp promotere hajt meg). A transzfektálást TurboFect transzfekciós reagenssel végeztük a gyártó által ajánlott protokoll szerint.

EGFP hasítási teszt

Az SpCas9 variánsokat teszteltük az EGFP hasítási tesztben úgy, hogy a sejtekben a fluoreszcencia jel megszűnését mértük. Az egy példányban integrált EGFP riporter fehérjét kódoló szekvenciában előidézett SpCas9 által célzott kettős szálú DNS törés (DSB) után a hibajavítás a hibára hajlamos nem-homológ vég-a-véghez illesztésből (NHEJ) történik meg, és ez leolvasási keret eltolódást okozó mutációkat hozhat létre, aminek a következtében megszűnik a fluoreszcencia jel. Ezen kísérleteket N2a.EGFP és N2a.dd-EGFP sejtekben végeztük. Az SpCas9 variánsokat és az sgRNS-eket plazmid vagy RNP formában transzfektáltuk. A transzfektált sejteket áramlási citométerrel mértük.

Western blot

Az SpCas9 variánsokat immunoblot elemzéssel teszteltük annak ellenőrzésére, hogy a mutációk nem változtatják-e meg az SpCas9 expressziós szintjét, és hogy a hasonló körülmények között kifejezett fehérjék mennyisége összehasonlítható-e. Az N2a.dd-EGFP sejteket transzfektáltuk, majd a transzfekciós hatékonyság ellenőrzésének céljából a transzfekciót követő negyedik napon áramlási citométerrel lemértük a sejteket, és a maradék sejteket Harlow pufferrel felszuszpendáltuk. A blottot egy éjszakán át 4 ° C-on elsődleges anti-FLAG és anti- β -aktin antitestekben inkubáltuk. Másnap a mosási lépések után a membránokat

HRP-konjugált másodlagos anti-egér antitesttel inkubáltuk. A fehérjékből származó jelet ECL segítségével hívtuk elő és CCD-kamerával detektáltuk.

Transzkripció aktiválás

Azon túl, hogy az SpCas9 egy programozható nukleáz, az egyik alkalmazási lehetősége az, hogy effektor doméneket célzottan a genom egy kiválasztott lokuszához juttassunk vele az endogén gén expressziójának modulálásához. A transzkripció aktiválási kísérleteinkhez a Konermann és munkatársai által publikált módszert használtuk, melyben olyan módosított sgRNS-eket használtunk, amelyek két minimális hairpin aptamert tartalmaznak a tetraloopban és a stem loop 2-ben, és szelektíven kötik a dimerizált MS2 bakteriofág burokkészletét. A katalitikusan inaktív SpCas9-cel komplexált sgRNS kötődik a célszekvenciához és az sgRNS-en található hairpinek az MS2-p65-HSF1 fuzionált fehérjét odatoborozzák, amely transzkripció aktiválást tud mediálni.

GUIDE-seq és TIDE

GUIDE-seq módszerrel különböző SpCas9 variánsokat vizsgáltunk 13 különböző célszekvencián, plazmid vagy RNP formában, HEK293.EGFP sejtekben. A módszer során élő sejtekben elforduló és mesterségesen előidézett kettős szálú DNS törések helyére egy védett, rövid, kettősszálú oligodeoxinukleotid (dsODN) hatékonyan integrálódik. Az egyes célszekvenciától eltérő helyek körüli genomiális környezetet e rövid szekvencia és a ligált adapterek felhasználásával amplifikáljuk, majd új generációs szekvenálást követően *in silico* azonosítjuk a ténylegesen előforduló off-target szekvenciákat. Az on-target hasítást minden kísérlet során vagy EGFP hasítási teszttel vagy TIDE módszerrel ellenőriztük.

'Önvágó' EGFP-expressziós plazmid használata NHEJ-mediált integrációhoz

Ennek a megközelítésnek a legfontosabb eleme egy 'önvágó' plazmid használata, amely fokozza a célzott integrációt. A módszer használata során kétféle plazmidot transzfektálunk: (i) egy plazmidot, ami expresszálja az SpCas9-et és egy genomi helyet célzó sgRNS-t; valamint (ii) egy 'önvágó' donor plazmidot, ami tartalmaz egy EGFP-kazettát és egy sgRNS-t, ami magát a donor plazmidot célozza (és nem található célszekvenciája a genomban). A transzfecció után az SpCas9 nemcsak a genomi on-target szekvenciát, hanem a donor plazmidot is hasítja. A hasított genomi DNS javítása során a lineáris donor plazmid hatékonyabban integrálódik a genomba, mint egy cirkuláris donor plazmid.

Eredmények

A megnövelt pontosságú SpCas9 variánsok között megfigyelhető egy specificitás és egy target-szelektivitás szerinti rangsor, ami szerint a targetek szintén sorrendbe állíthatóak.

A tanulmány első lépéseként egyazon rendszerekben kívántuk jellemezni a vad típusú (WT), a már leírt megnövelt pontosságú SpCas9 variánsokat (e-, -HF1, Hypa- és evoSpCas9), valamint azokat, amelyeket ezeknek a mutációinak a kombinálásával hoztunk létre (Hypa2SpCas9 és HeFSpCas9). Az SpCas9 variánsok első összehasonlító kísérleteit EGFP hasítási teszttel végeztük. Első lépésben az SpCas9 variánsok on-target aktivitását teszteltük 47 sgRNS alkalmazásával, amelyek 20 nukleotid hosszú, a célszekvenciával tökéletesen komplementer spacer szekvenciát tartalmaztak, és az EGFP kódoló szekvenciát célozták meg. Második lépésként a megnövelt pontosságú variánsok mismatch toleranciáját jellemeztük úgy, hogy összehasonlítottuk a hasítási hatékonyságukat olyan sgRNS-ekkel, melyek a spacer PAM-tól távolabb eső régiójában egy bázisos mismatcheket tartalmaznak, és így különbséget tudunk tenni a variánsok specificitása között az adott targeten.

A különféle megnövelt pontosságú variánsok ezen összehasonlítása során fény derült arra, hogy ezen variánsok között sorrend állítható fel a specificitásuk alapján, amely párhuzamosan növekszik a target szelektivitásukkal (nagyobb target szelektivitással rendelkező variáns esetén ezzel fordítottan csökken az aktivitás átlaga és csökken a rendelkezésre álló szekvenciák halmaza is) a következő sorrendben: WT SpCas9 < eSpCas9 < SpCas9-HF1 < HypaSpCas9 < Hypa2SpCas9 < evoSpCas9 < HeFSpCa9. Érdekes módon ezen különbségek a variánsok között nem voltak egyértelműek az eredeti publikációkból.

Figyelemre méltó, hogy a célszekvenciák hasíthatósága a fenti variánsokkal együtt szisztematikusan változik az on-target kísérletekben, ami lehetővé teszi a célszekvenciák hasíthatóságuk szerinti rangsorolását is. A különböző pontosságú nukleáz variánsok off-target hasítási hajlandósága szintén szisztematikusan változik a mismatch teszt során a célszekvenciákon, és ugyanaz a célszekvencia sorrend figyelhető meg rajta, mint az on-target eredmények esetén. Mindez arra enged következtetni, hogy az SpCas9 variánsok hasítási hatékonysága és specificitása összefüggnek és nagyságukat nagyban befolyásolja az adott célszekvenciák nukleotid sorrendje. Azt feltételezzük, hogy az eredményeink során látott mintázat oka a (i) target szekvencia egyedi hozzájárulásának, (ii) a megnövelt pontosságú mutációknak és (iii) a mismatcheknek (amennyiben vannak) az összeadó hatása. Ezeknek a hatásoknak az eredője az, ami elsősorban szabályozza a hasítási aktivitást minden egyes hasítási

esemény esetén. A target sorrendet jobban megnézve láthatjuk, hogy a rangsor egyik végén vannak azon - általunk 'nagy-hozzájárulású' szekvenciáknak elnevezett - szekvenciák, amelyeket minden variáns képes hasítani, de csak a legmagasabb pontosságú variáns hasítja őket minimális off-target hatással. A rangsor másik végén vannak azon - 'kis-hozzájárulású' - szekvenciák, amelyeket csak az kisebb specificitású variánsok és a WT SpCas9 képesek hasítani, viszont lényegesen alacsonyabb szintű off-target aktivitás mellett. A nagyobb pontosságú variánsok, mint például a HeF-, evo-, Hypa2SpCas9, nem hasítják hatékonyan ezeket az alacsony-hozzájárulású célszekvenciákat.

A célszekvenciák ezen tulajdonsága alapján feltételezhető, hogy nem lehetséges egy 'szuper' SpCas9 variáns létrehozása, amely off-target hatás nélkül nagy hatékonysággal hasítja az összes célszekvenciát. Ennek megfelelően eredményeinkből az következik, hogy szükség van egy sor növekvő pontosságú SpCas9 variánsra, hogy lehetséges legyen az optimális nukleáz kiválasztása a rangsorban bárhol elhelyezkedő célszekvenciához.

5' meghosszabbított sgRNS-ek illeszkedő 5' G nukleotiddal jobban csökkentik a megnövelt pontosságú nukleázok aktivitását, mint nem illeszkedő 5' G nukleotiddal.

Az 5' módosított sgRNS-eket gyakran használják a WT SpCas9-el, ha bioinformatikailag nem lehet megfelelő 20G-N19-NGG-célszekvenciákat azonosítani a kívánt genomi régióban. A leggyakrabban alkalmazott promóterek (például az emlős sejtekben használt humán U6 promóter vagy az *in vitro* átíráshoz használt T7 promóter) esetén a hatékony transzkripcióhoz a szekvencia 5' végén egy G nukleotidra van szükség. Ezen 5' G nukleotid feltétel teljesítésére leggyakrabban alkalmazott 5' módosítás során az sgRNS spacer szekvenciáját meghosszabbítják egy extra huszonegyedik 5' G nukleotiddal (21G-sgRNS). Megvizsgáltuk ezen módszer kompatibilitását a megnövelt pontosságú variánsokkal, és azt találtuk, hogy a 21G-sgRNS-ek negatívan befolyásolják ezen nukleázok aktivitását (összhangban a tanulmányunk közzététele után megjelent publikációkkal). Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy a spacer szekvencia meghosszabbítása egy a targetált DNS szálhoz illeszkedő '5' G nukleotiddal sokkal károsabb ezen nukleáz variánsok aktivitására, mint egy nem-illeszkedő 5' G nukleotiddal történő meghosszabbítás. Az eredményekből következik, hogy a megnövelt pontosságú nukleázok általánosságban nem kompatibilisek az 5' meghosszabbított sgRNS-ekkel, és rutinszerűen csak tökéletesen illeszkedő 20G-sgRNS-ekkel használhatók.

A megnövelt pontosságú variánsok WT-szintű kötési aktivitást mutatnak olyan célszekvenciákon, melyeket nem tudtak hatékonyan hasítani.

Az SpCas9 nukleázok egyik alkalmazási lehetősége, hogy effektor doméneket célzottan a genom egy kiválasztott lokuszához tudunk irányítani vele, és így egy endogén gén expresszióját tudjuk szabályozni. Az eSpCas9 és az SpCas9-HF1 nukleázok úgy lettek megtervezve, hogy gyengébb kölcsönhatást alakítsanak ki a DNS szálakkal. Ezért nem volt világos, hogy vajon a ribonukleoprotein komplexeik DNS kötése továbbra is azonos szintű lesz-e, mint a WT SpCas9 esetén. Kíváncsiak voltunk, hogy az eSpCas9 és SpCas9-HF1, valamint a magasabb pontosságú HeFSpCas9 milyen szintű transzkripció aktivációt képes előidézni. A várakozásokkal ellentétben az összes vizsgált nukleáz hasonló aktivitást mutatott, mint a vad típus. Mind a 21G-sgRNS, mind a csonkított spacerrel rendelkező sgRNS-ek esetén 15-20-szoros aktivációt mértünk. Ezen eredmények, bár közvetettek, de arra utalnak, hogy a megnövelt pontosságú nukleázok kötődése az olyan célszekvenciához, amelyeknél a hasítási hatékonyság lecsökkent, nem romlik el még 5' módosított sgRNS-ek esetén sem.

Azért, hogy egy direktebb *in vitro* megközelítéssel is megvizsgáljuk a nukleázok kötődési aktivitását, elektroforetikus mobilitási eltolódási vizsgálatot (EMSA) végeztünk. Azt tapasztaltuk, hogy bár a HeFSpCas9 nem mutat nukleáz aktivitást a kiválasztott célszekvenciákon, mégis megőrzi a DNS-kötő képességének nagy részét ezen targetek esetén. Továbbá annak érdekében, hogy jobban megértsük az 5' G nukleotid meghosszabbítás hatását, megvizsgáltuk az eSpCas9 és SpCas9-HF1 nukleázok *in vitro* kötődését illeszkedő 21G-sgRNS-ekkel. Megállapítottuk, hogy bár az EGFP hasítási tesztben az 5' G meghosszabbítás teljesen megszünteti a nukleázok hasítási aktivitását ezeken a targeteken, úgy tűnik, hogy a kötődésük változatlan marad.

Megnövelt pontosságú variánsok használata RNP formában tovább növeli a specificitást.

A SpCas9 variánsok RNP formában történő használata a leendő klinikai alkalmazások egyik lehetséges módszere. Kíváncsiak voltunk, hogy képesek vagyunk-e tovább növelni a megnövelt pontosságú variánsok genommodosításának specificitását, ha RNP formában használjuk őket szemben azzal, amikor ugyanazon célszekvenciákat ugyanazon nukleáz variánsokkal kívánjuk hasítani, de plazmid formában alkalmazva őket humán sejteken. Az EGFP target site 20, 43 és a *FANCF* target site 2 példáján mutattuk meg, hogy a megnövelt pontosságú variánsokat RNP formában használva valóban tovább csökkenthető az off-target hatás. Ezen eredmények rávilágítanak az RNP-formátummal kombinált megnövelt pontosságú variánsok használatában rejlő óriási potenciálra.

Összefoglalás

Összehasonlítottuk a már publikált megnövelt pontosságú nukleázokat (eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, evoSpCas9) és az általunk létrehozottakat (Hypa2SpCas9, HeFSpCas9) ugyanazon rendszerekben, hogy megértsük azokat a tényezőket, amelyek befolyásolják a hasítási hatékonyságukat és pontosságukat.

1. A különféle megnövelt pontosságú variánsok összehasonlítása során fény derült arra, hogy ezen variánsok között sorrend állítható fel a specificitásuk alapján, amely párhuzamosan növekszik a target-szelektivitásukkal (ezzel fordítottan az adott variáns nem, vagy csak csökkent aktivitással hasítja a célszekvenciák egy részét, amelyeket a WT SpCas9 tud hasítani és ennek eredményeként csökken az átlagos aktivitás és csökken az elérhető szekvenciák halmaza) a következő sorrendben: WT SpCas9 < eSpCas9 < SpCas9-HF1 < HypaSpCas9 < Hypa2SpCas9 < evoSpCas9 < HeFSpCa9.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy nem csak a nukleázok, hanem a célszekvenciák is rangsorolhatóak. A rangsor egyik végén vannak a - 'nagy-hozzájárulású' - szekvenciák, amelyeket minden variáns képes hasítani, de csak a legnagyobb specificitású variáns hasítja őket minimális off-target hatással. A rangsor másik végén vannak a - 'kis-hozzájárulású' - szekvenciák, amelyeket csak az alacsonyabb specificitású variánsok és a WT SpCas9 képesek hasítani, viszont lényegesen alacsonyabb szintű off-target hatás mellett.

2. Az általunk azonosított rangsorok alapján úgy tűnik, hogy nem lehetséges egy 'szuper' SpCas9 variáns létrehozása, amely nagy hatékonysággal hasítja az összes célszekvenciát, off-target hatás nélkül. Ennek megfelelően eredményeinkből az következik, hogy szükség van egy sor növekvő specificitású SpCas9 variánsra, hogy lehetséges legyen az optimális nukleáz kiválasztása a rangsorban bárhol elhelyezkedő célszekvenciákhoz.

3. Megmutattuk, hogy a megnövelt pontosságú variánsok rutinszerűen csak olyan sgRNS-ekkel alkalmazhatók, amelyek 20 nukleotid hosszú, a célszekvenciával tökéletesen komplementer spacer tartalmaznak (20G-sgRNS-ek). Az 5' módosított sgRNS-ek jelentősen csökkentik a megnövelt pontosságú variánsok on-target hasítását.

4. Megmutattuk, hogy a megnövelt pontosságú variánsokat nem plazmid, hanem RNP formában juttatva be a sejtekbe a hasítás specificitása tovább növelhető.