

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук



Геномное редактирование в биомедицинских исследованиях

Степанов Григорий Александрович,
к.х.н., заведующий лабораторией геномного редактирования

2021
г. Красноярск

Направления работы лаборатории

Миссия: разработка средств борьбы с заболеваниями человека.

Подход: усовершенствование систем геномного редактирования и внедрение их в стратегии борьбы с заболеваниями человека.

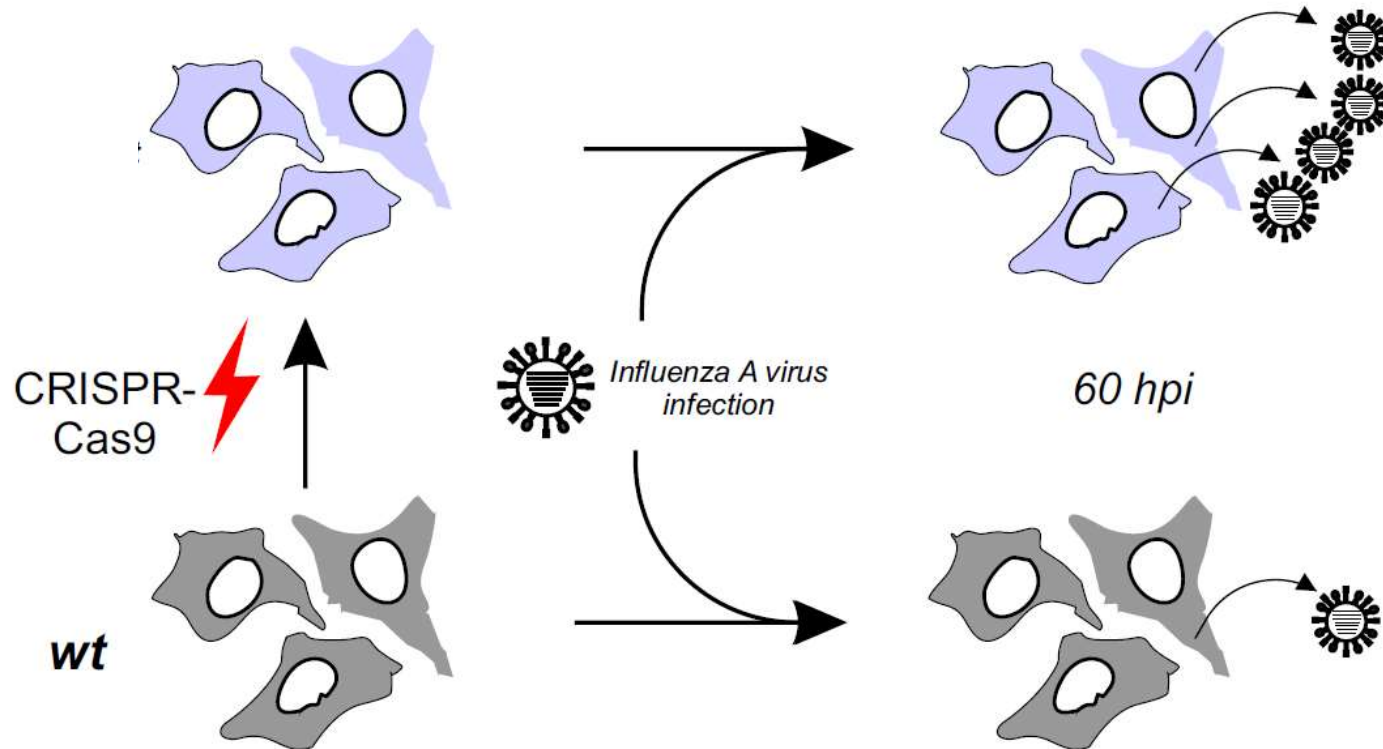
Профилактика – Диагностика - Терапия

Объекты:

- вирусные заболевания человека,
- онкологические заболевания,
- фундаментальные процессы модификации РНК.

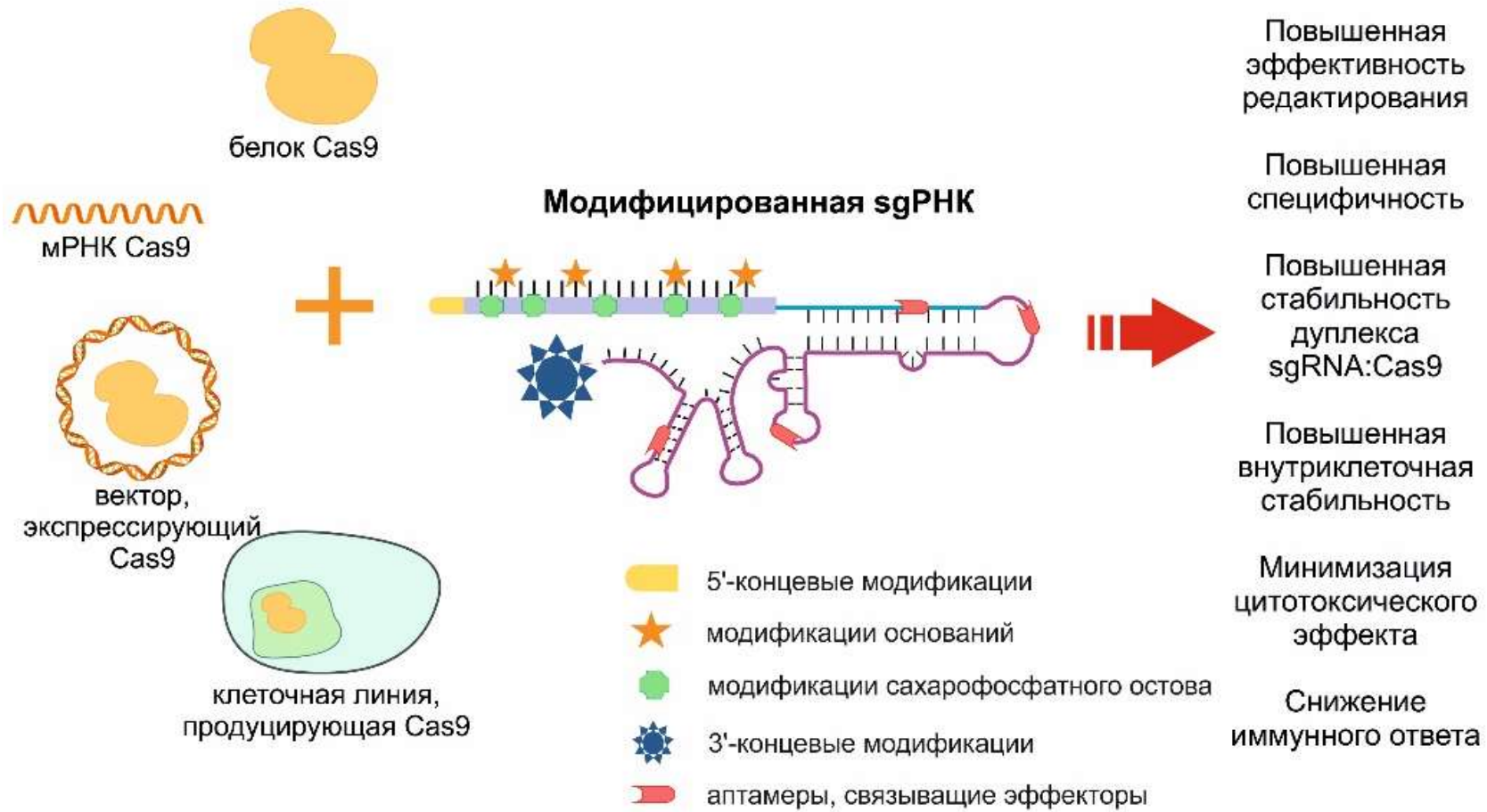
Продукт: клеточные линии с измененным уровнем экспрессии генов-мишеней.

Создание модифицированных клеточных линий для наработки вирусных препаратов



Получена коллекция
клеточных линий с нокаутом
генов каскада врожденного
иммунного ответа:
IRF-7, IRF-9, IFITM3, PKR.

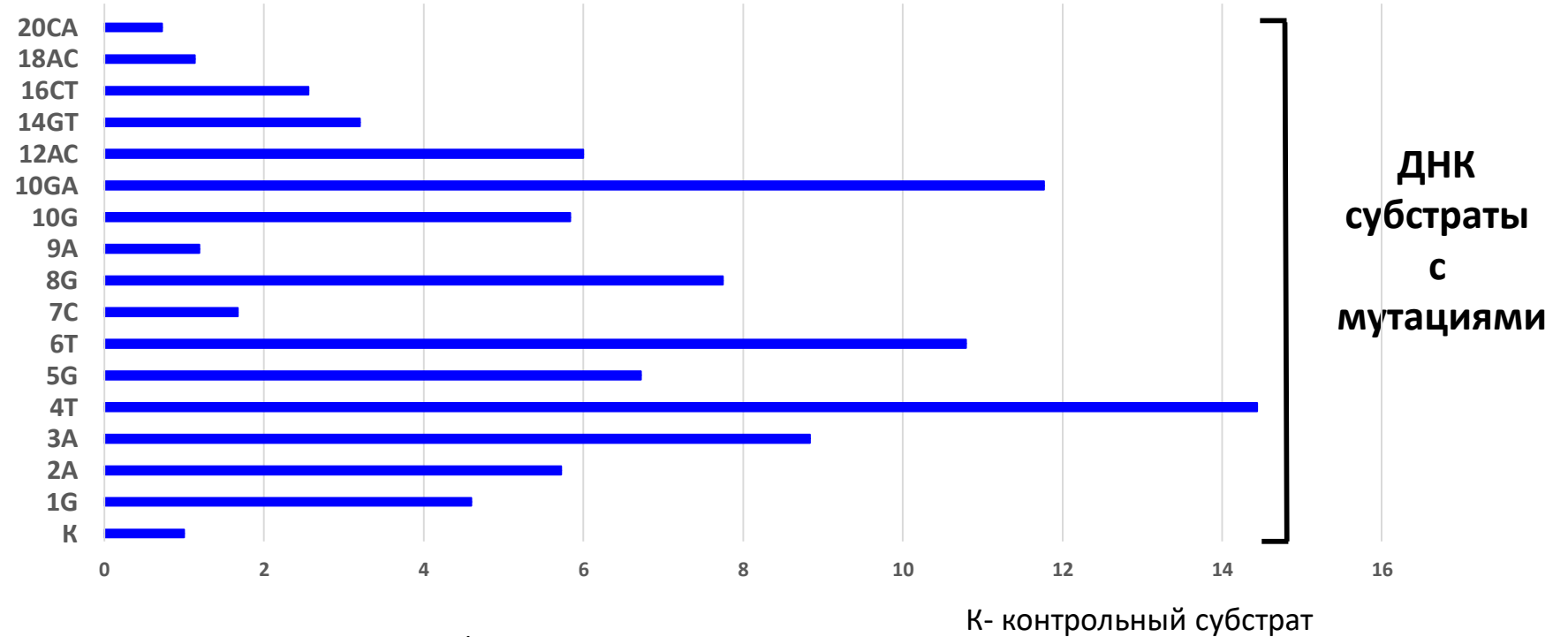
Разработка модифицированных систем геномного редактирования



Оценка специфичности системы CRISPR/Cas9 при использовании модифицированных направляющих РНК *in vitro*

Относительное повышение специфичности химерной направляющей РНК,
содержащей фосфорилгуанидиновую группу

ДНК субстрат с мутациями	протоспейсер (5'-->3') PAM
20CA	CATGGACATGCTCGACATTC GGG
18AC	GTACGACATGCTCGACATTC GGG
16CT	GTTGCTCATGCTCGACATTC GGG
14GT	GTTGGAGTTGCTCGACATTC GGG
12AC	GTTGGACAACCTCGACATTC GGG
10GA	GTTGGACATGGACGACATTC GGG
10G	GTTGGACATGGTCGACATTC GGG
9A	GTTGGACATGCACGACATTC GGG
8G	GTTGGACATGCTGGACATTC GGG
7C	GTTGGACATGCTCCACATTC GGG
6T	GTTGGACATGCTCGTCATTC GGG
5G	GTTGGACATGCTCGAGATTC GGG
4T	GTTGGACATGCTCGACTTTC GGG
3A	GTTGGACATGCTCGACAATC GGG
2A	GTTGGACATGCTCGACATAC GGG
1G	GTTGGACATGCTCGACATTG GGG
К- контроль	GTTGGACATGCTCGACATTC GGG



Немодифицированная РНК 5'-GGUUGGACAUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'
IG8 5'-GGUUGGAC*AUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'

*- фосфорилгуанидиновая группа

РНК мономеры отмечены красным

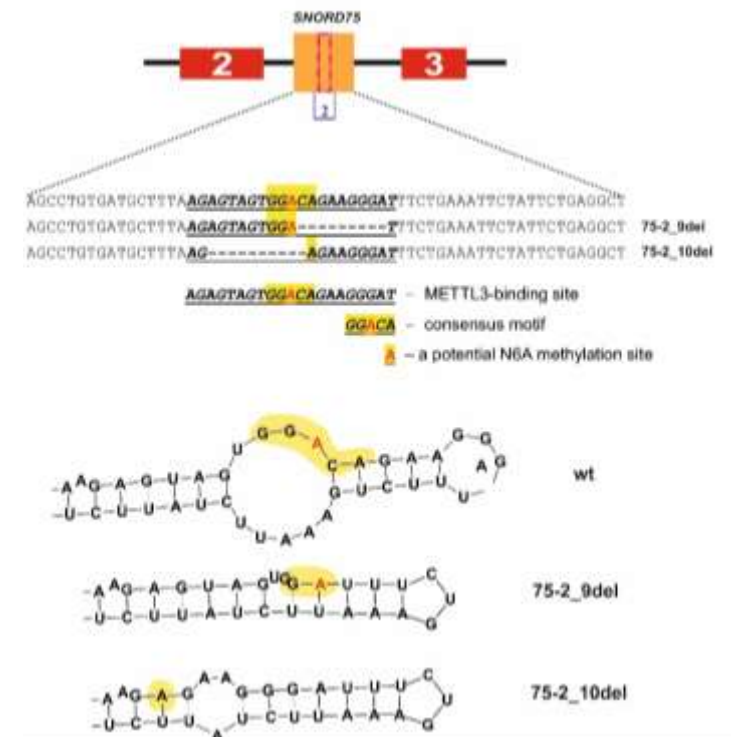
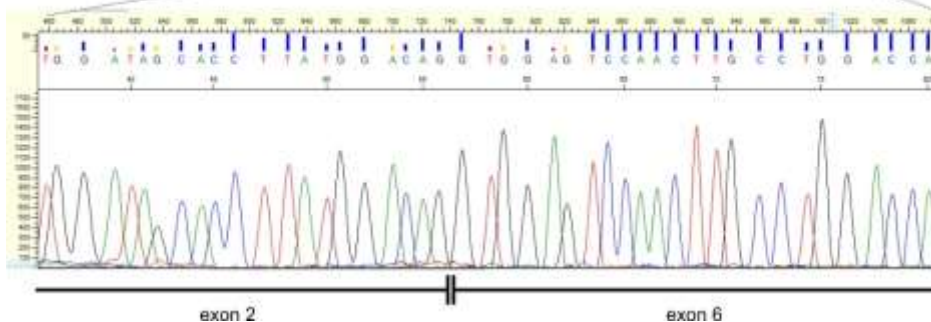
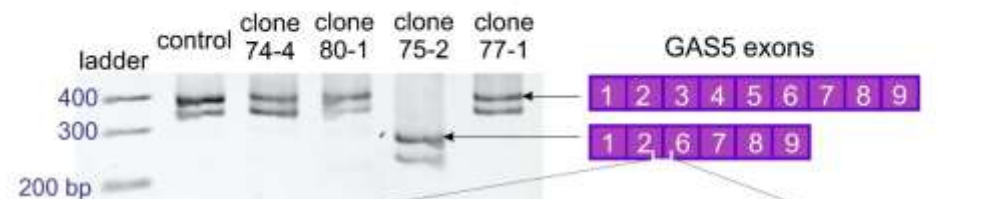
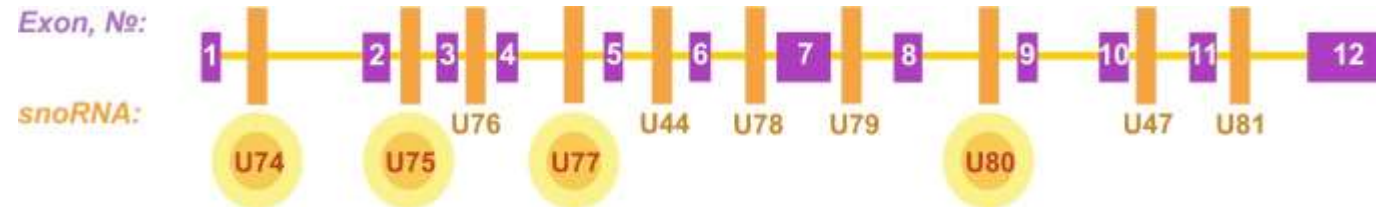
ДНК мономеры отмечены черным

Данные получены и подготовлены м.н.с. Прохоровой Д.В.

Разработка новых систем регуляции активности генов в клетках человека

Ген-мишень:
GAS5

Метод:
CRISPR/Cas9

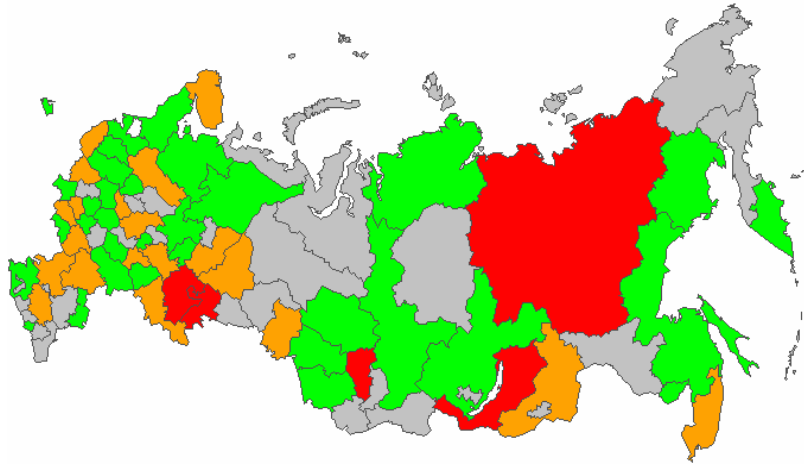


Данные получены и подготовлены м.н.с. Матвеевой А.М.

- **Разработка стратегии создания высокопермиссивных к вирусу гриппа клеточных линий для получения вакцинных препаратов**



Influenza epidemics and pandemics



Influenza activity in Russia. 2016, week 6
Morbidity level (125.2 per 10 000 of population)
exceeded the national baseline by 80.1%

WHO

3-5 million cases of severe forms of the disease
and approximately 250,000 to 500,000 deaths.

Russia

hospitalization of 8.5 to 23% of cases.

Influenza pandemics

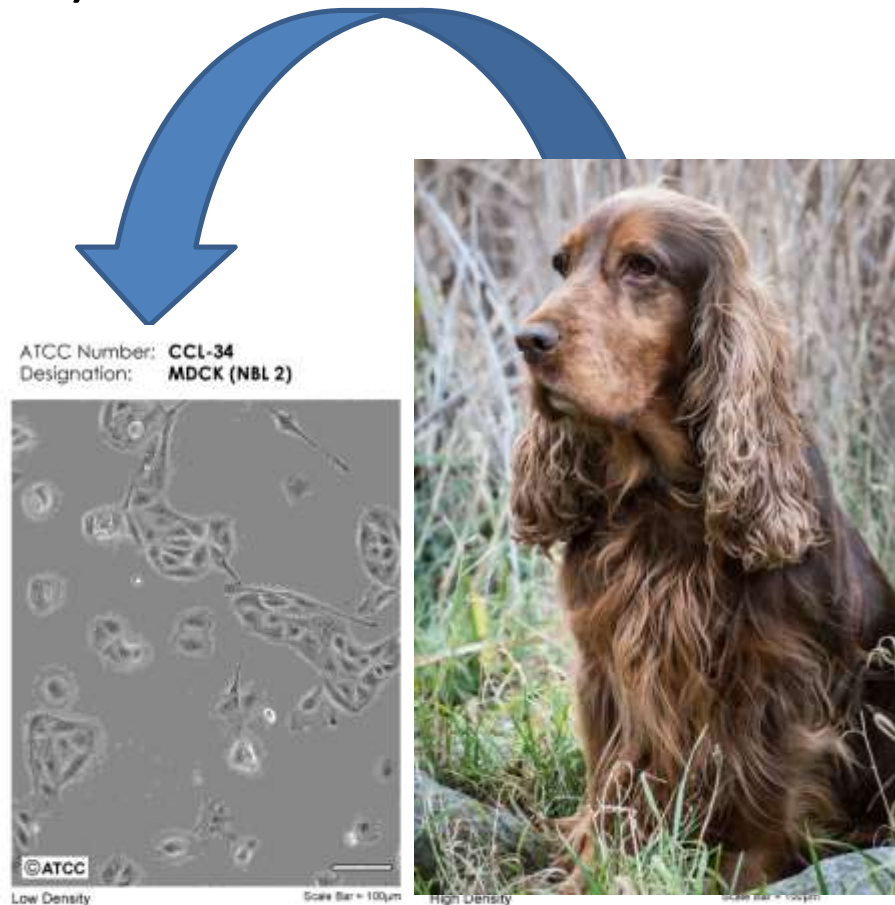
Pandemics	Year	Virus subtype	Number of fatal cases, millions	Mortality rate
"Spanish flu"	1918	H1N1	>50	>2,5%
"Asian flu"	1957	H2N2	1-2	<0,2%
"Hong Kong flu"	1968	H3N2	>1	<0,1%
"Swine flu"	2009	H1N1 pdm09	<0,5	0,03%

Pandemics of influenza of the XX century
according to minimal estimates killed more
than **53 million people**.

Isolation and propagation of influenza viruses

- Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells

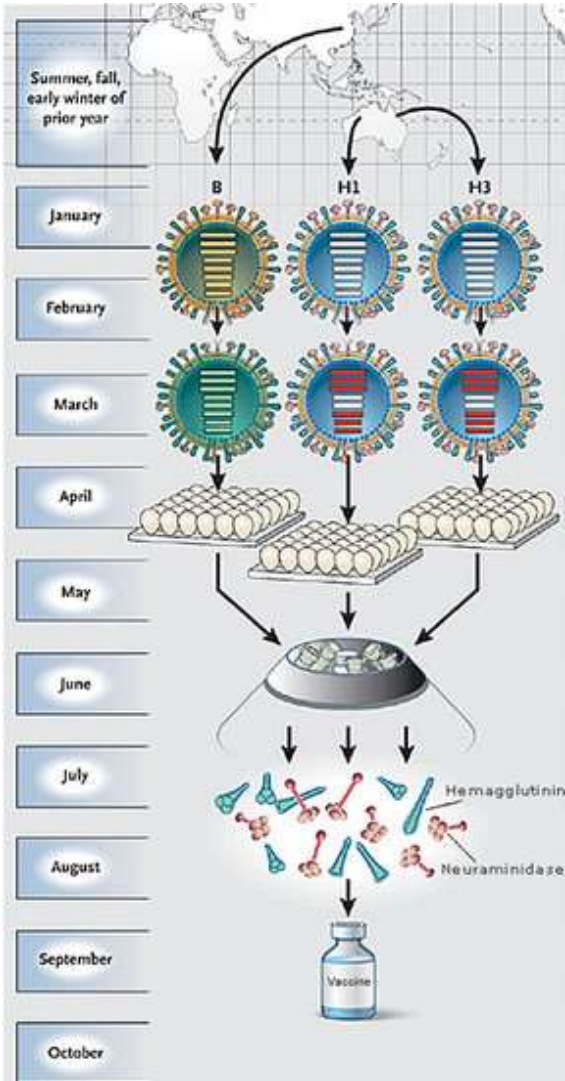
- Embryonated chicken eggs (ECE)



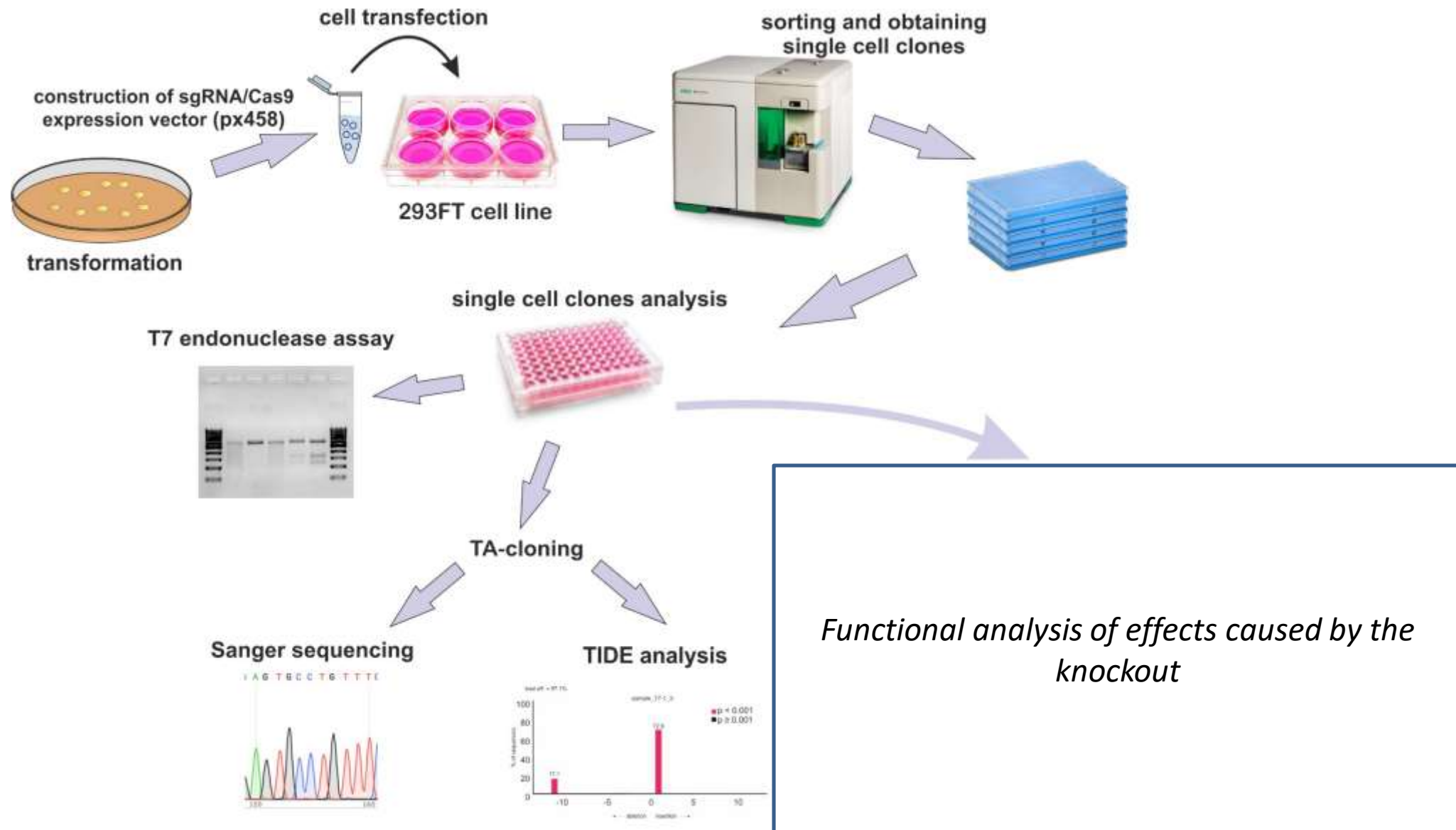
Disadvantages of existing systems for influenza virus isolation and propagation

- 1. Virus propagation in chicken eggs leads to accumulation of adaptive mutations altering influenza virus antigenicity.**
- 2. Virus isolation rate differs significantly for different influenza A virus subtypes.**
- 3. Propagated human influenza viruses have non-human (canine, chicken) glycosylation profile.**
- 4. Egg-based propagation is very laborious.**
- 5. Human cell culture-based technology represent a fast alternative technology, which overcome many problems caused by virus propagation in eggs.**

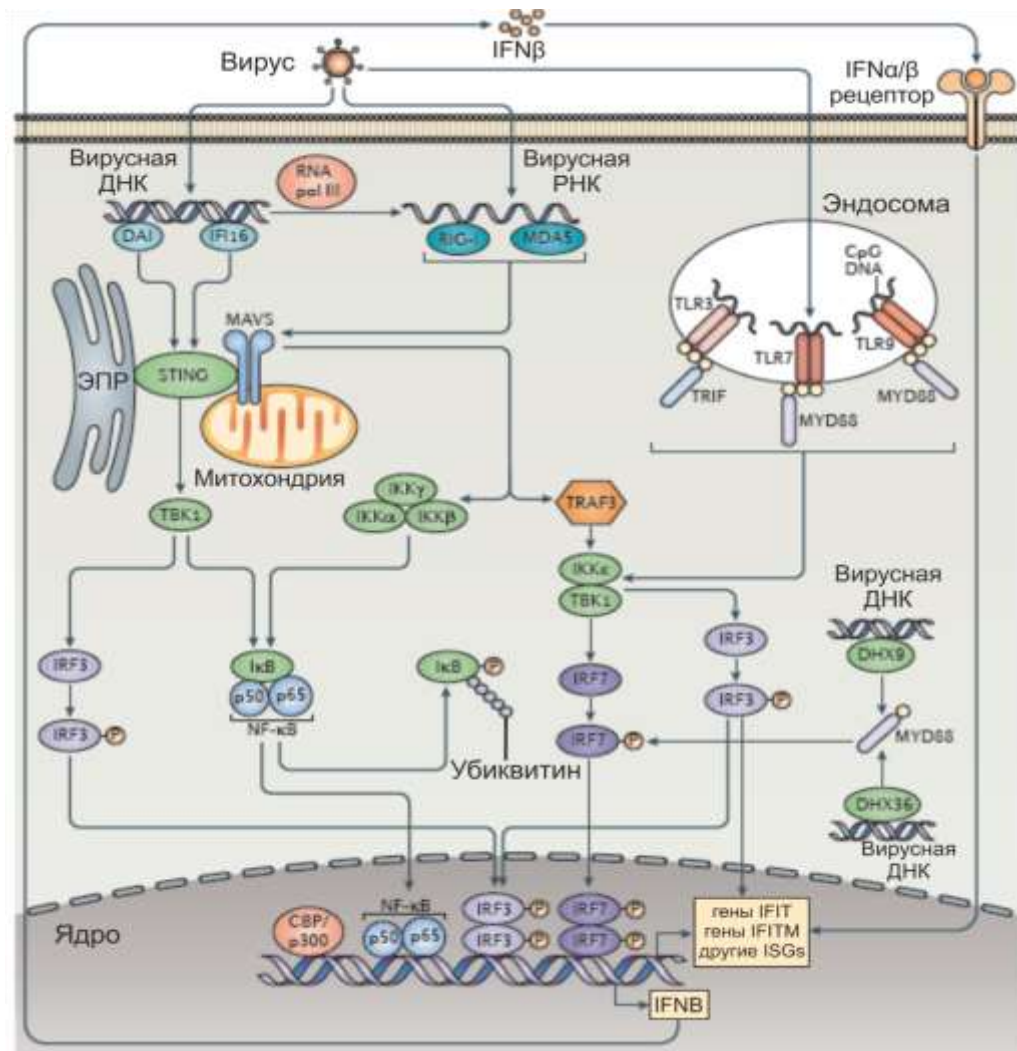
Influenza vaccine strain selection and vaccine production



Experimental workflow



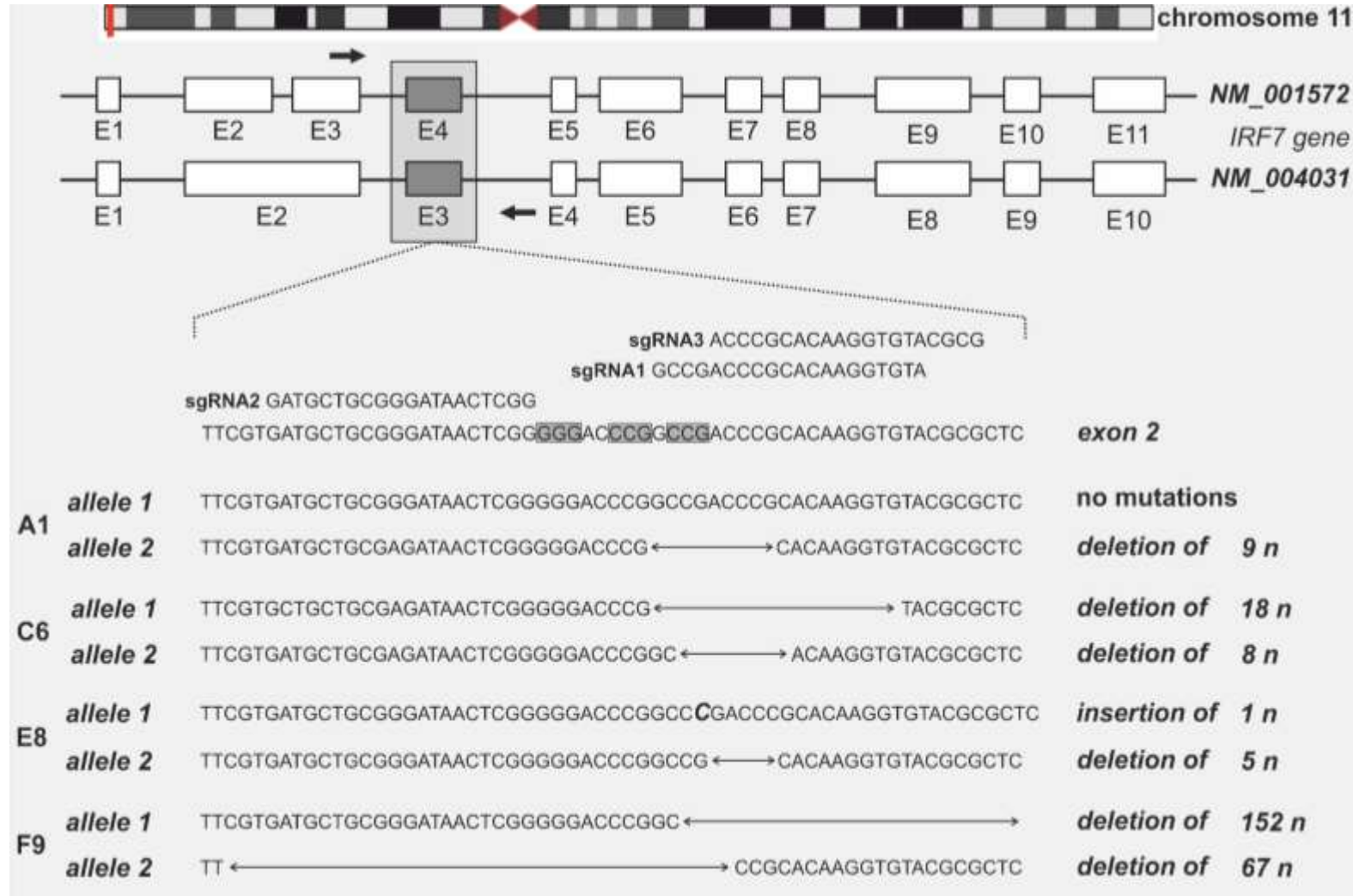
Influenza virus life cycle and host restriction factors



IRFs - interferon regulatory factors

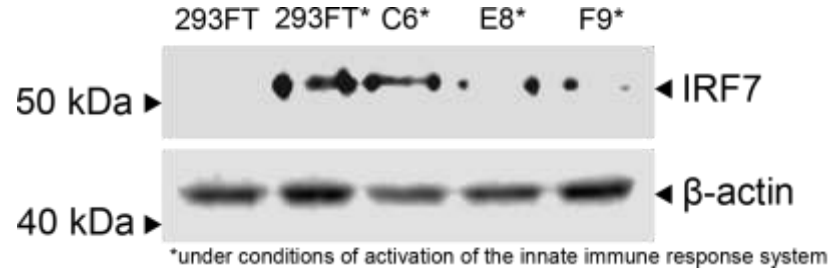
Diamond M.S., Farzan M.
Nat. Immunol. – 2013.

Target events in *IRF7* gene

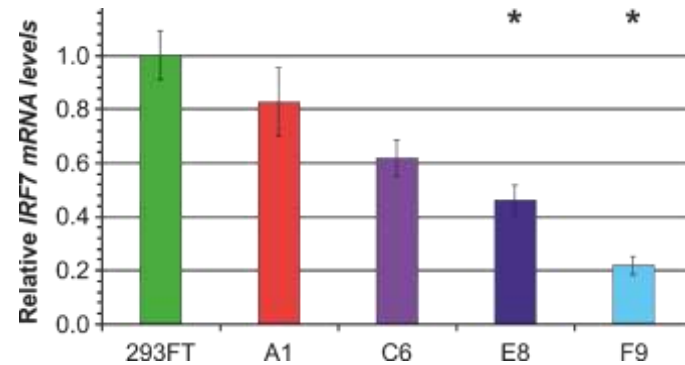


IRF7 expression in the original and mutant cells

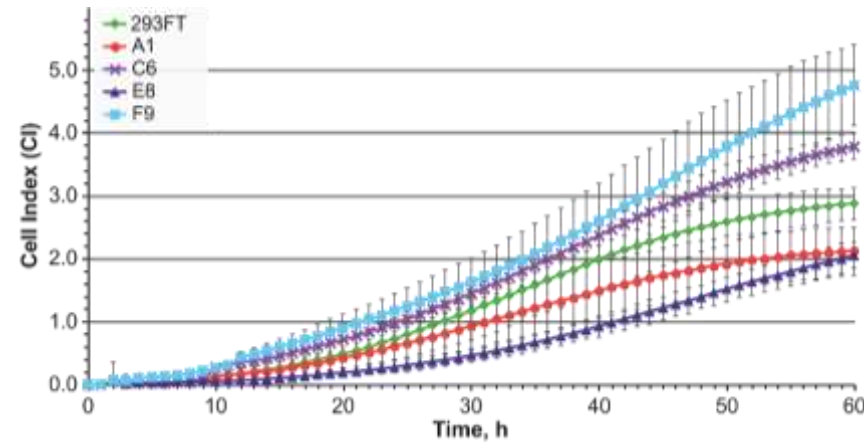
Western-blot analysis of IRF7



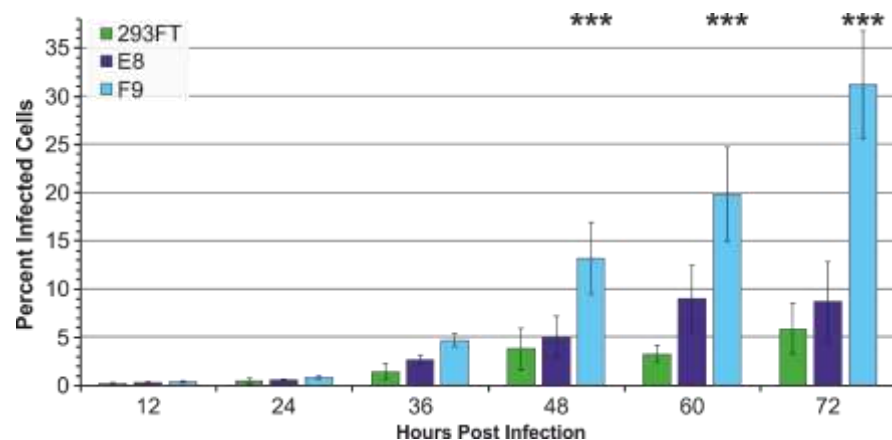
RT-PCR analysis of *IRF7* mRNA level



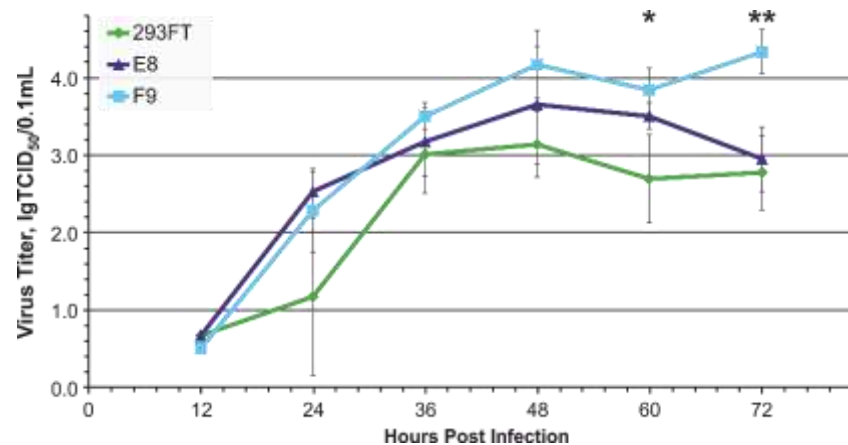
Real-time analysis of growth rate of intact and modified 293FT cells



Assessment of permissiveness of the modified cell lines to influenza viruses



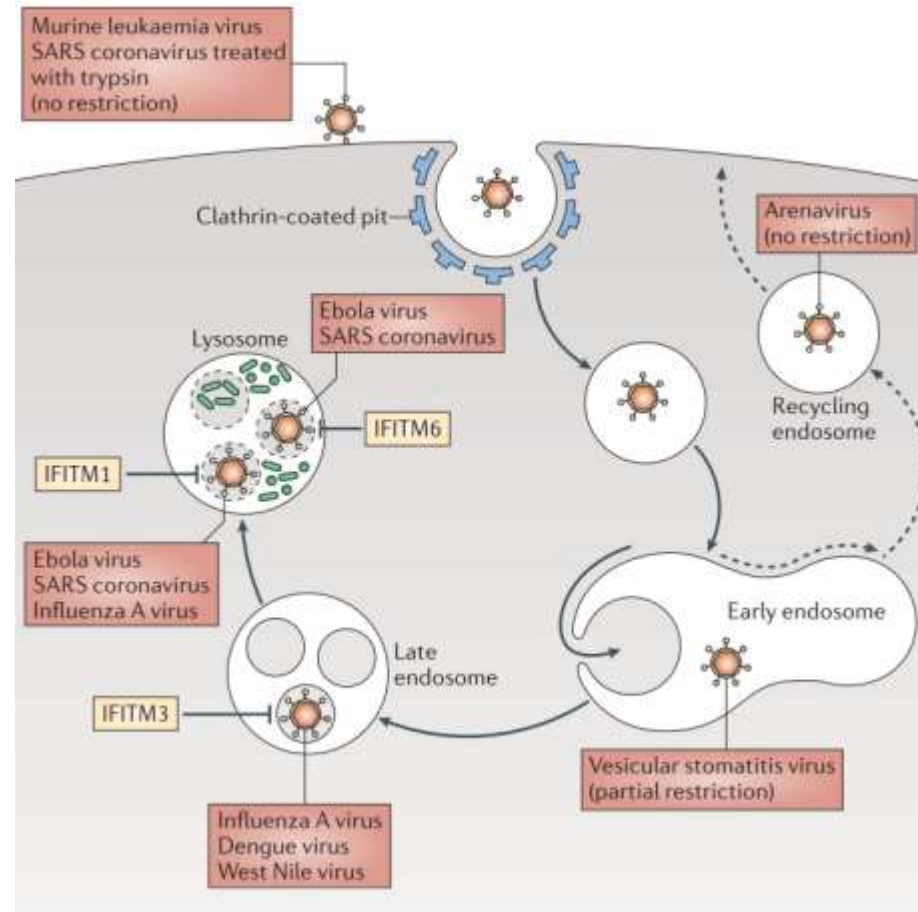
Flow cytometry analysis of influenza A virus NP protein accumulation in the original IRF7^{wt/wt} (green) and mutant IRF7^{-/-} 293FT cells



Influenza virus growth in the IRF7^{wt/wt} and mutant IRF7^{-/-} 293FT cells.

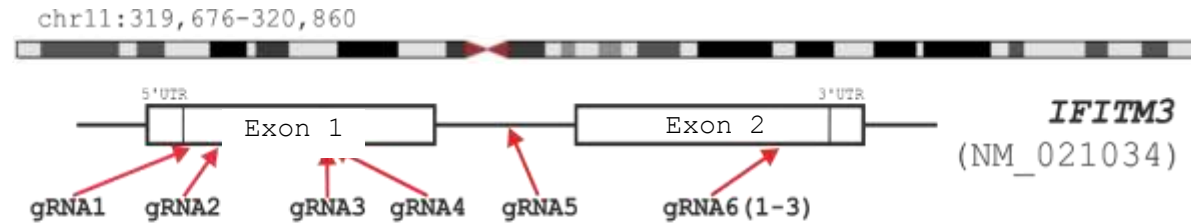
Data were obtained by Dr. Maria Sergeeva from Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Healthcare of Russian Federation, Saint-Petersburg

Proteins of the IFITM family in the antiviral response



Diamond M., Farzan M. et al. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins, Nature Reviews Immunology, 2013, Vol. 13, p 46-57

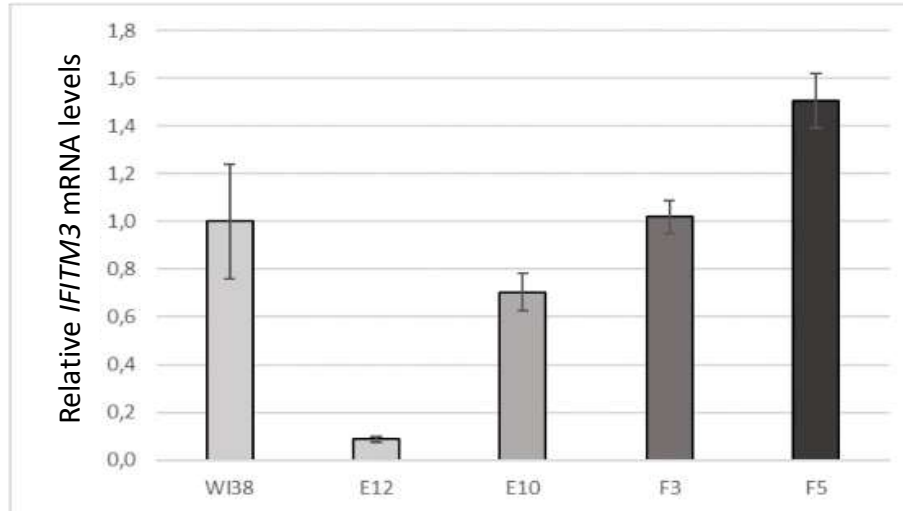
Target events in WI-38 va13 cells



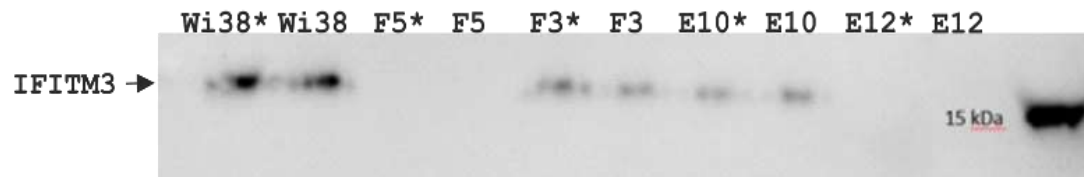
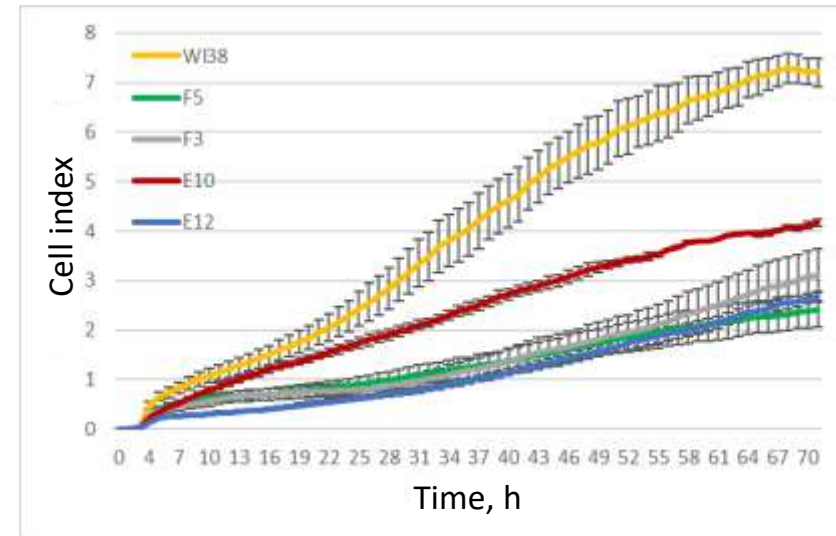
	protospacer sequence	PAM:		protospacer sequence	PAM:
gRNA1	TGAATCACACTGTCCAAACC	TGG	gRNA5	TGGATCACGGTGGACGTCGG	GGG
gRNA2	GTCAACAGTGGCCAGCCCCC	AGG	gRNA6-1	GTGCTGATCTTCCAGGCCTA	TGG
gRNA3	ACGTCAGTGGCTTTGTCTGT	GGG	gRNA6-2	TAGGCCTGGAAGATCAGCAC	TGG
gRNA4	TGTGGATCACGGTGGACGTC	GGG	gRNA6-3	AGGCCTGGAAGATCAGCACT	GGG

F5	CGAGGTGGCTGTGCTGGGGGCGCCCCACAACCCTGCTCCCCCGACGTCCACCGTGATCCACATCCGCAGCC CGAGGTGGCTGTGCTGGGGG-----ATCCACATCCGCAGCC	no mutations deletion 35 bp
F3	AGGAGCACGAGGTGGCTGTGCTGGGGGCG}} CCCCCGACGTCCACCGTGATCCACATCCGCAGCGAGACCT AGGAGCAC-----}}-----AGCGAGACCT	no mutations deletion 67 bp
E12	GGGAATC-----}}-----AGGAGGCATC GGGAATC-----}}-----AGGAGGCATC	deletion 543 bp deletion 543 bp

IFITM3 expression in the original and mutant cells



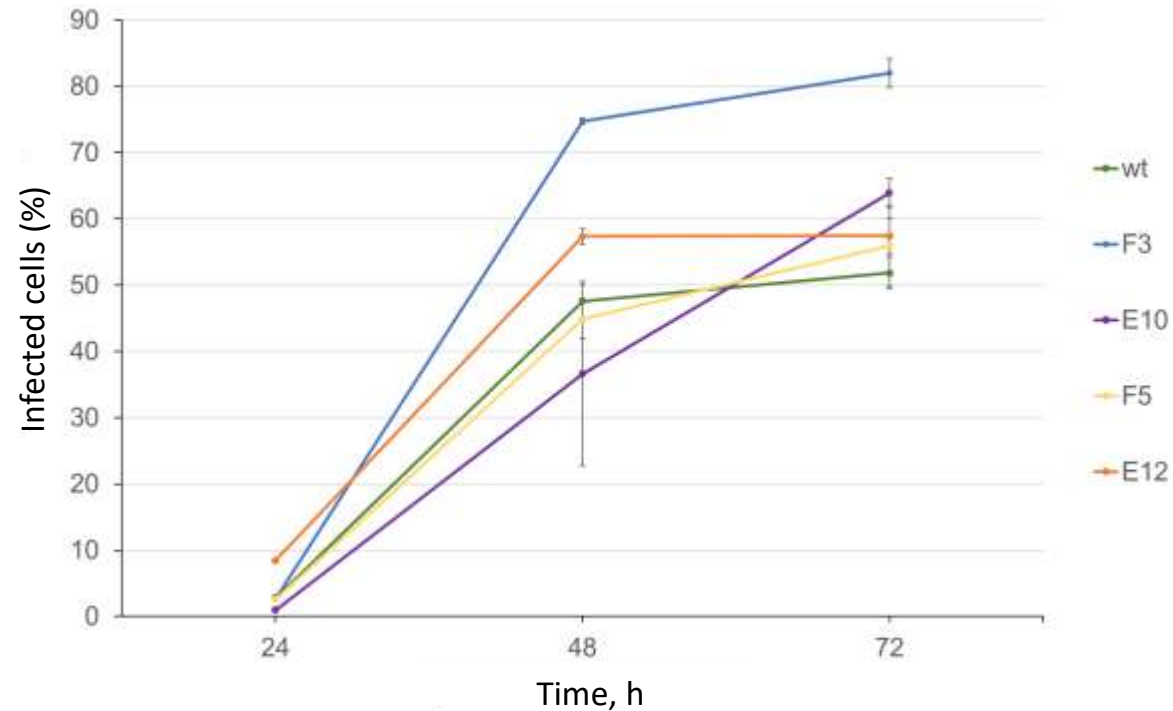
Real-time analysis of growth rate of intact and modified WI-38 va13 cells



* - cells with an activated immune response

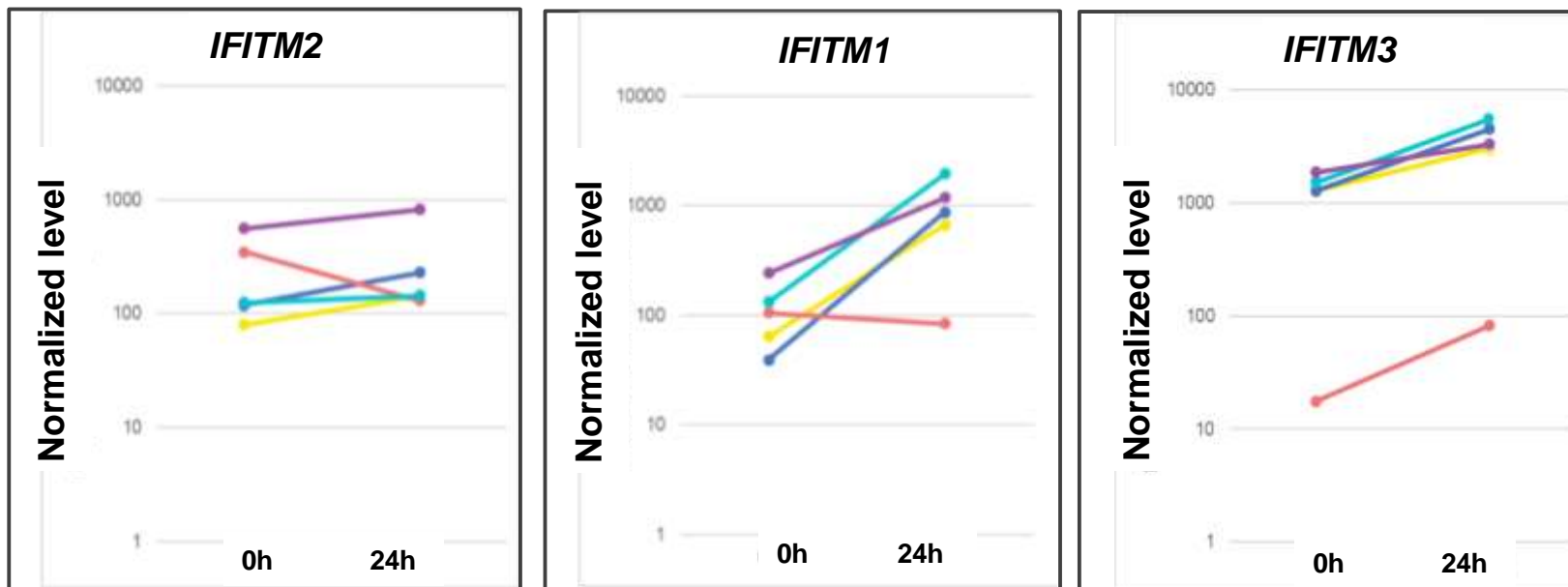


Influenza A virus NP protein accumulation in the original IFITM3wt/wt and mutant WI-38 va13 cells



Data were obtained by Dr. Maria Sergeeva from Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Healthcare of Russian Federation, Saint-Petersburg

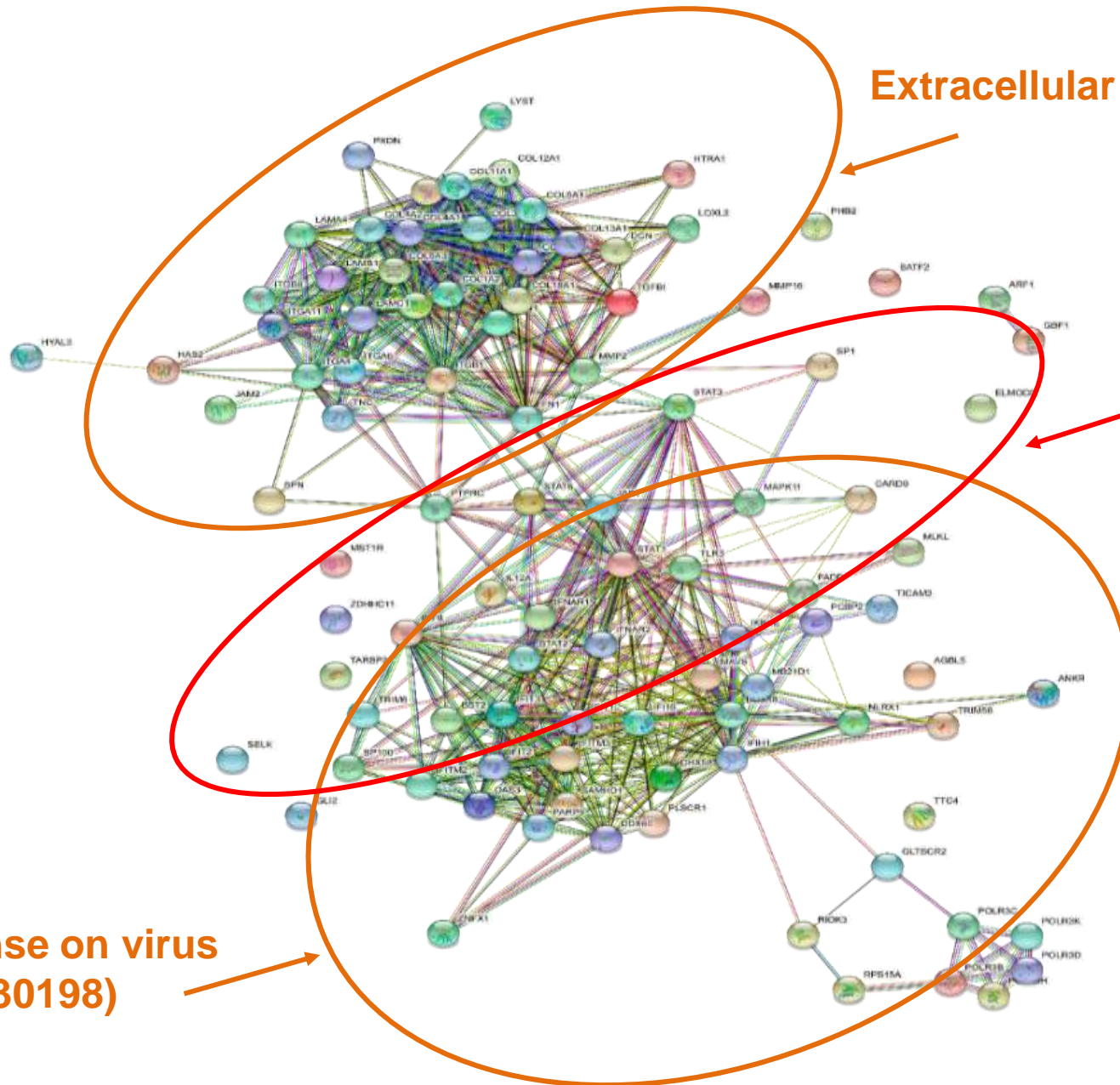
IFITM genes expression level under influenza A infection in modified cells



■ WI-38 → *Intact/control cells*

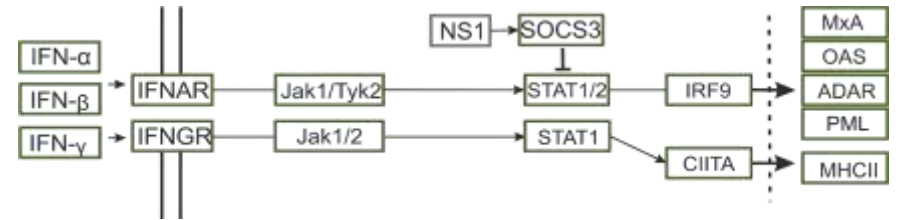
■ E10 ■ E12 ■ F3 ■ F5 *Modified cells, mutations in IFITM3*

Protein-protein interactions in DEG groups in obtained monoclonal cells



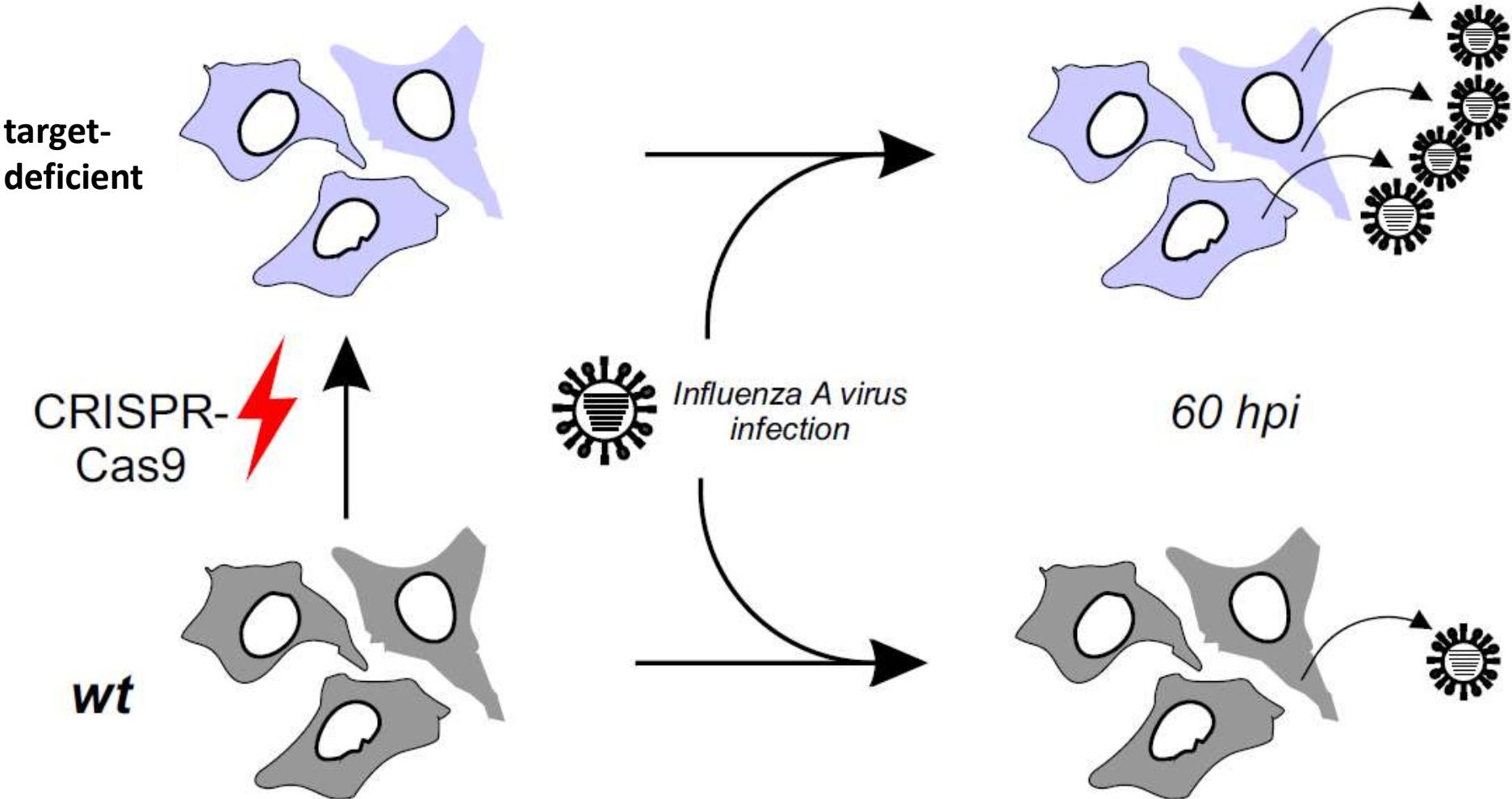
Extracellular matrix organization
(GO:0030198)

Jak-STAT
pathway



Response on virus
(GO:0030198)

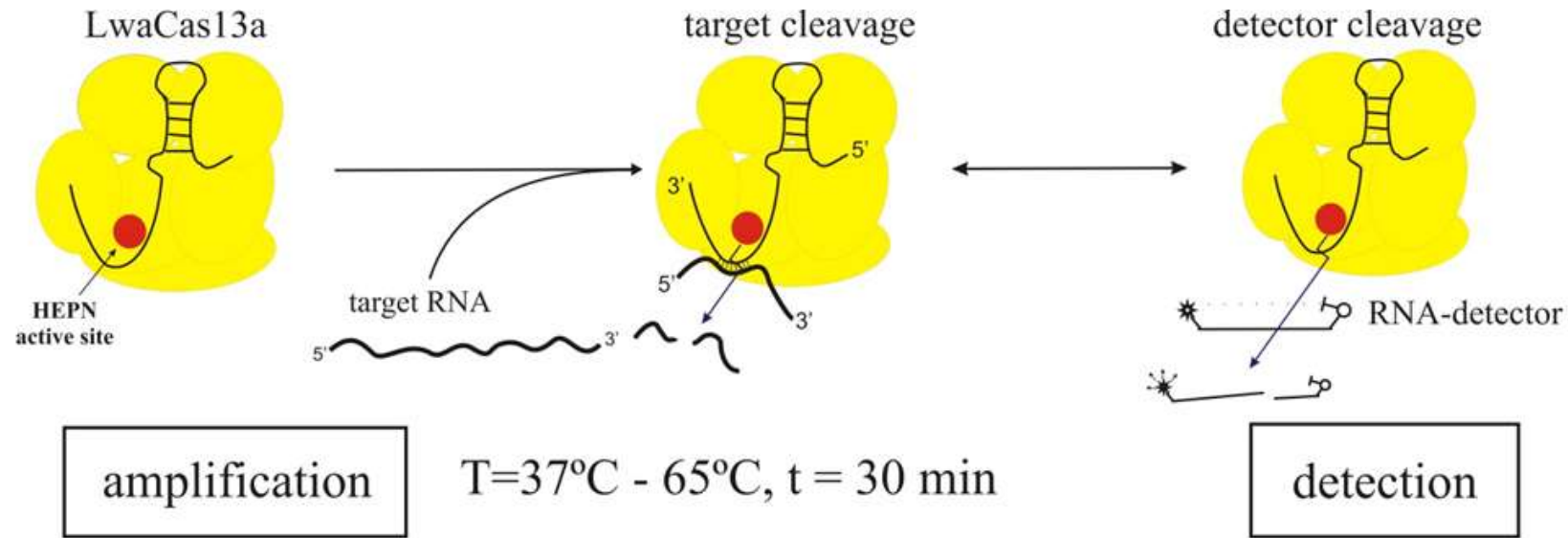
Conclusions



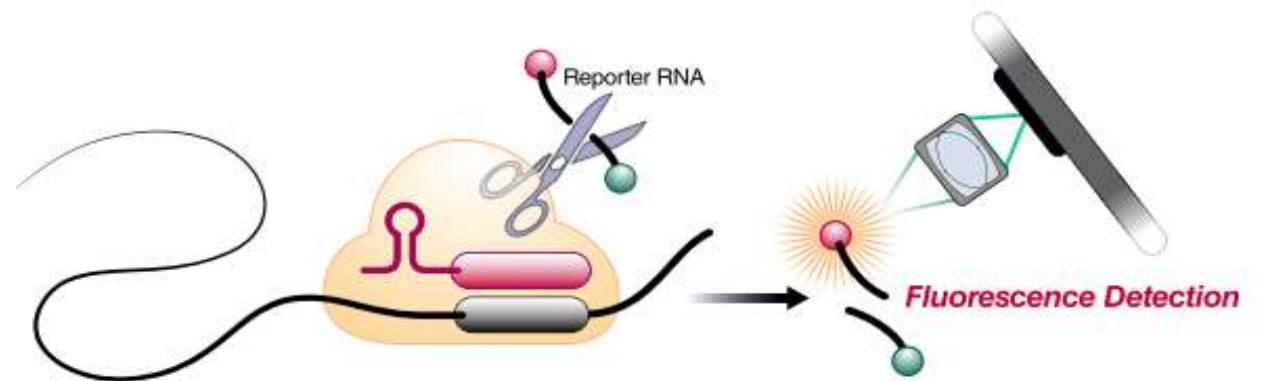
- Разработка новых методов диагностики с использованием белков Cas



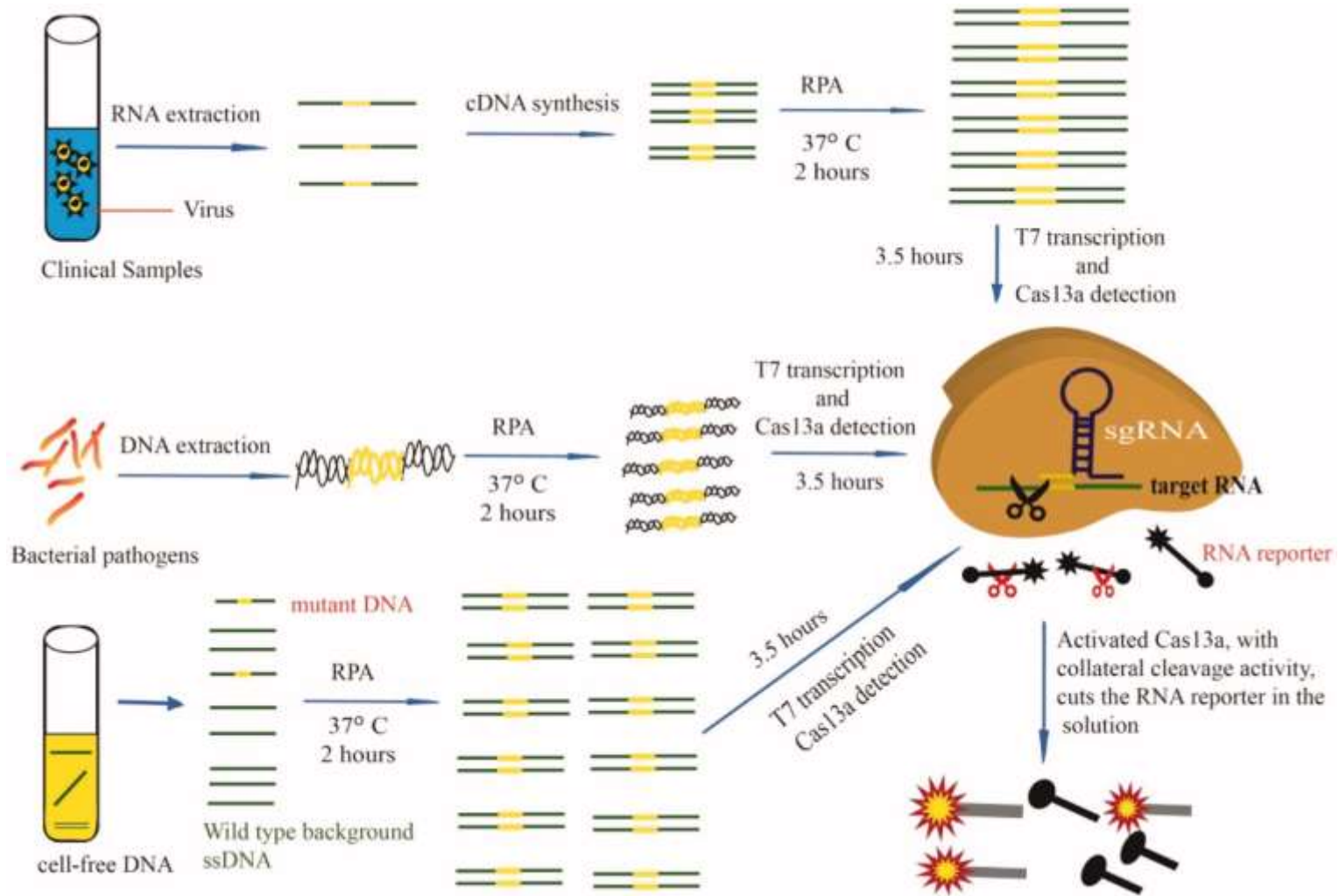
Cas13-based nucleic acid detection systems



Fozouni et al., Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy, Cell (2021)

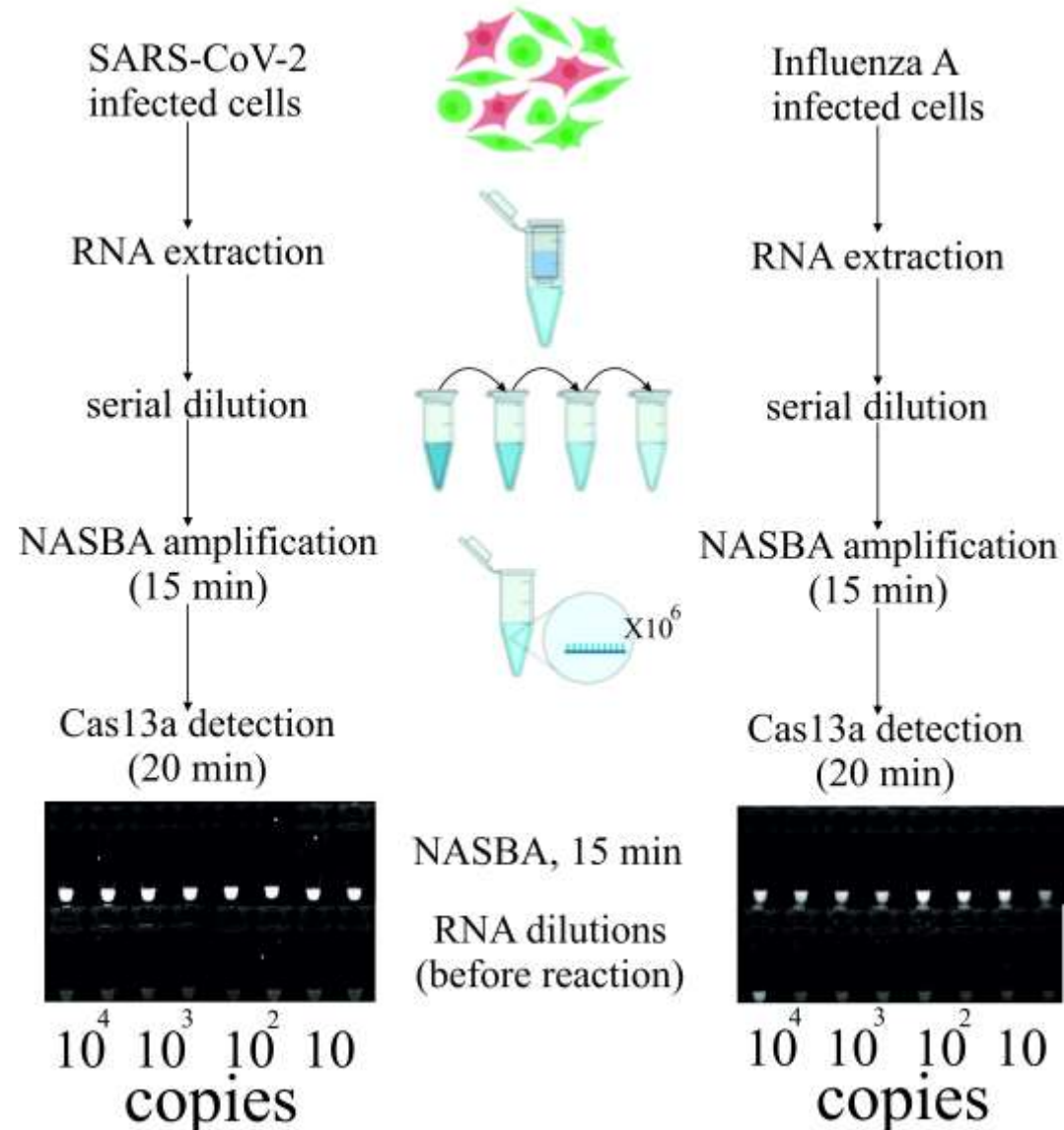


SHERLOCK method



Vatankhah M. et al. (2020): CRISPR-based biosensing systems: a way to rapidly diagnose COVID-19, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*

Cas13a-dependent RNA detection systems



Партнеры лаборатории

ФГБУ НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России (г. Санкт-Петербург)

ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА (г. Москва)

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет (г. Казань)



*Реагенты для ПЦР и анализа всех
этапов геномного редактирования*
www.biolabmix.ru
г. Новосибирск

Лаборатория геномного редактирования ИХБФМ СО РАН



Acknowledgments

**Institute of Chemical Biology and
Fundamental Medicine (ICBFM SB RAS)**
Laboratory of Genome Editing



Laboratory of Biotechnology

Laboratory of RNA Chemistry

Dr. Daria Novopashina

***This work was supported by
the RSF grant [18-75-10069].***



***Studies on sgRNA modifications and Cas13a-based detection methods were
partially supported by State Budget Program (0245-2019-0001).***

Smorodintsev Research

**Institute of Influenza, Ministry of Healthcare of
Russian Federation, Saint Petersburg**

Andrey Komissarov

Dr. Mariia Sergeeva

Mariia Timofeeva



**Institute of Fundamental Medicine and Biology,
Kazan.**

Sergey Malanin,

Dr. Tatiana Grigoryeva

**Institute of Biomedical Chemistry (IBMC),
Moscow**

Dr. Leonid Kurbatov

Спасибо за внимание!

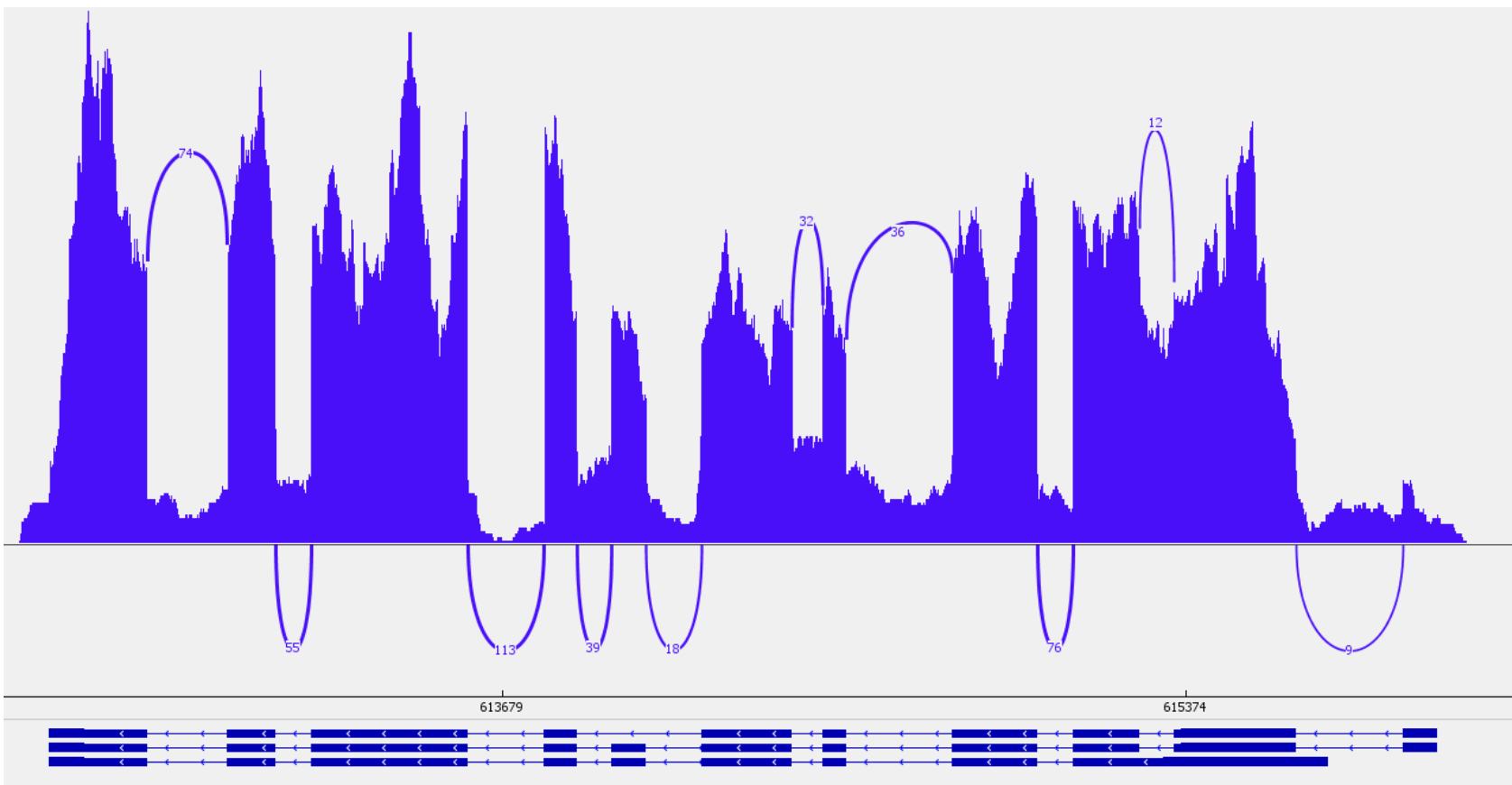


Заведующий лабораторией геномного редактирования ИХБФМ СО РАН:
к.х.н. Степанов Григорий Александрович
stepanovga@niboch.nsc.ru
+7-923-181-59-38

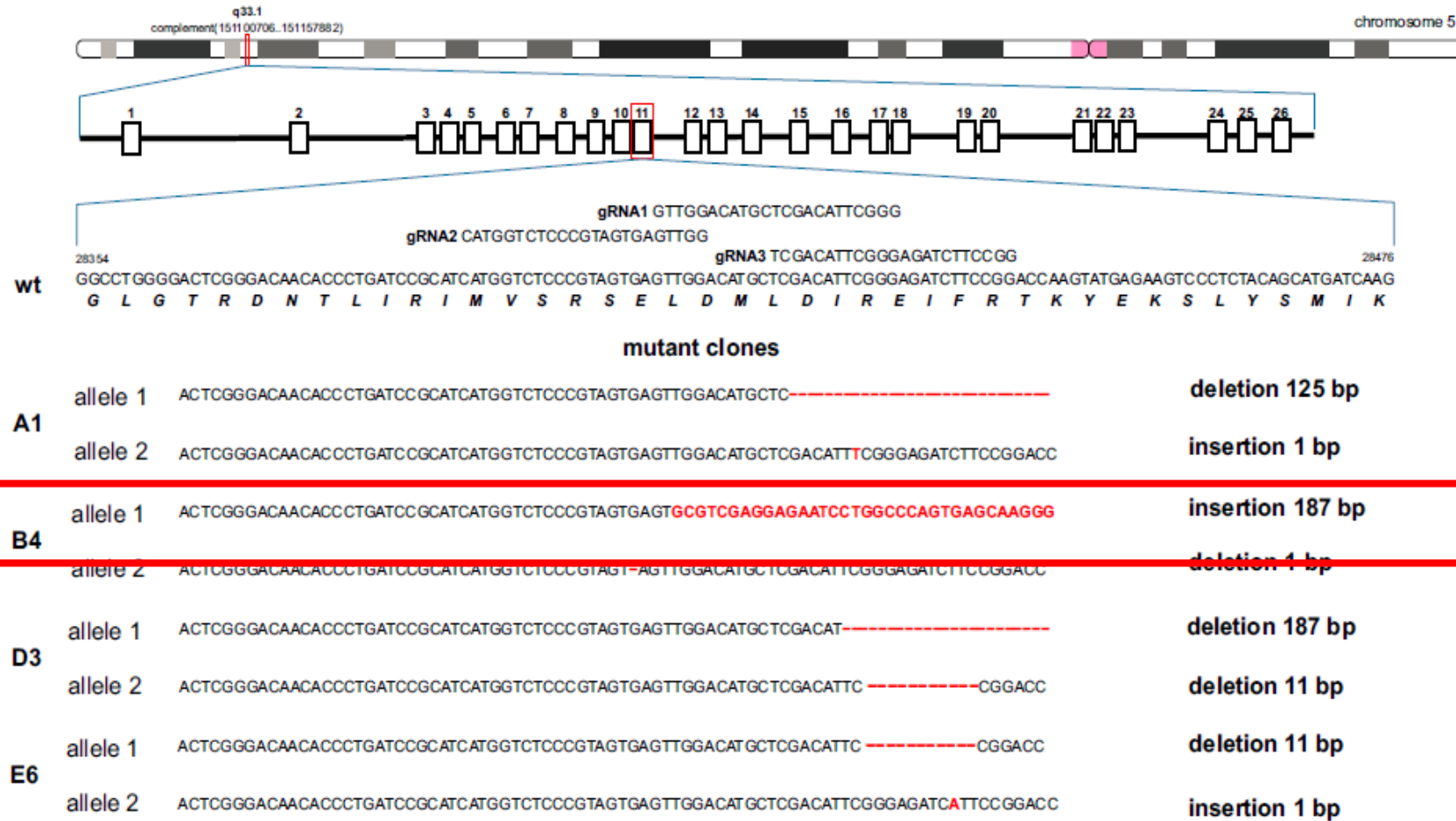
Изоформы мРНК при выборе мишени?

Картирование реальных прочтений в клетках человека 293FT

Вывод: преобладают изоформы a (NM_001572) и d (NM_004031) мРНК гена IRF7

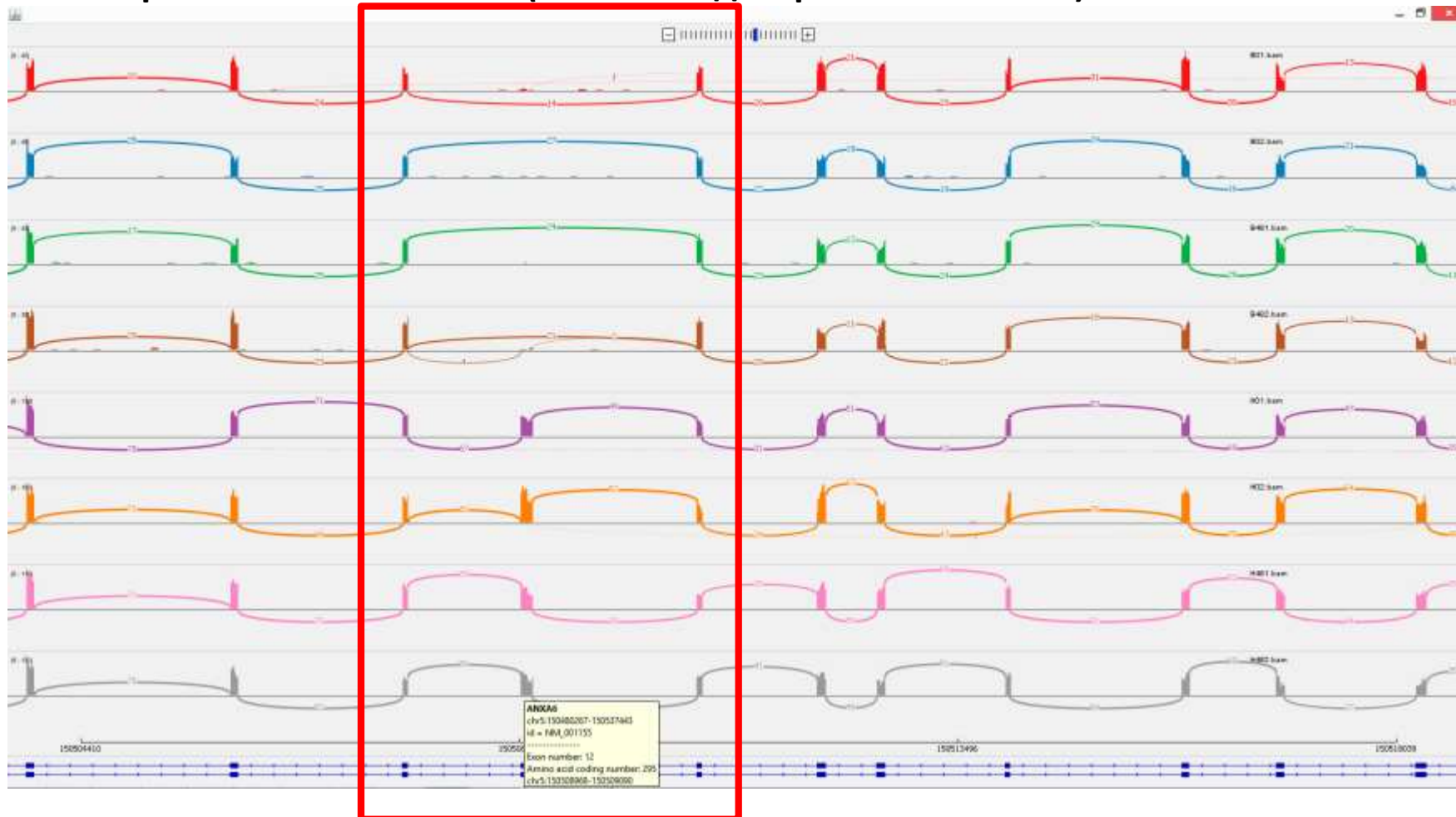


Протяженные инсерции



Пропуск экзона с мутациями?

Картирование реальных прочтений на мРНК гена AnxA6
в модифицированной моноклональной линии (4 верхние диаграммы)
в контрольной линии 293FT (4 нижние диаграммы Сашими)



Этапы и решения:



Биолабмикс

Выделение плазмидной ДНК

Набор для выделения плазмидной ДНК

Plasmid-mini, ООО «Биолабмикс»

Выделение геномной ДНК

Набор для выделения геномной ДНК **DUplus**

(**DU** – для тех, кто работает с **цельной кровью**)

Выявление и анализ мутаций
(в т.ч. электрофорез)

Наборы для ПЦР – **Color MHC010** (в том числе LR)

ДНК маркеры (**Step50plus-100Long; Sky-High**)

Очистка ПЦР-продуктов для
смесей **DR-10, 50, 250**.

Наборы для выделения ДНК из реакционных секвенирования по Сэнгеру

Анализ бактериальных колоний
после ТА-клонирования

Наборы для ПЦР – Color (в том числе LR)

(**подходят для Colony PCR**)

Выделение суммарной РНК для
анализа экспрессии генов (NGS)

Реагент для лизиса, хранения, выделения **ЛИРА**

Наборы для выделения РНК – **LRU, RU**

Анализ уровня мРНК методом
ОТ-ПЦР (реал-тайм)

Наборы для обратной транскрипции и ПЦР

Одношаговые наборы ОТ-ПЦР **MHC030**

(**БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue 2x**)

Персональные задачи



Биолабмикс

Выделение из одного образца РНК, ДНК и белков (для анализа методом Вестерн-блот)

Оптимизированные варианты наборов с реагентом Лира LR-100-2 и LR-100-3

Тестирование клеточных линий на контаминацию на микоплазму

**ПЦР с UTP и UDG (МН021 Биомастер UDG HS-qPCR)
Набор для выделения геномной ДНК Duplus**

Выделение фракции коротких РНК (в т.ч. микроРНК для smallRNASeq)

Набор для выделения суммарной РНК и микроРНК (LRU-100-50)

Хранение и транспортировка образцов органов

Стабилизатор РНК (St-100)

Синтез направляющих РНК и мРНК

Набор для высокоэффективного синтеза РНК

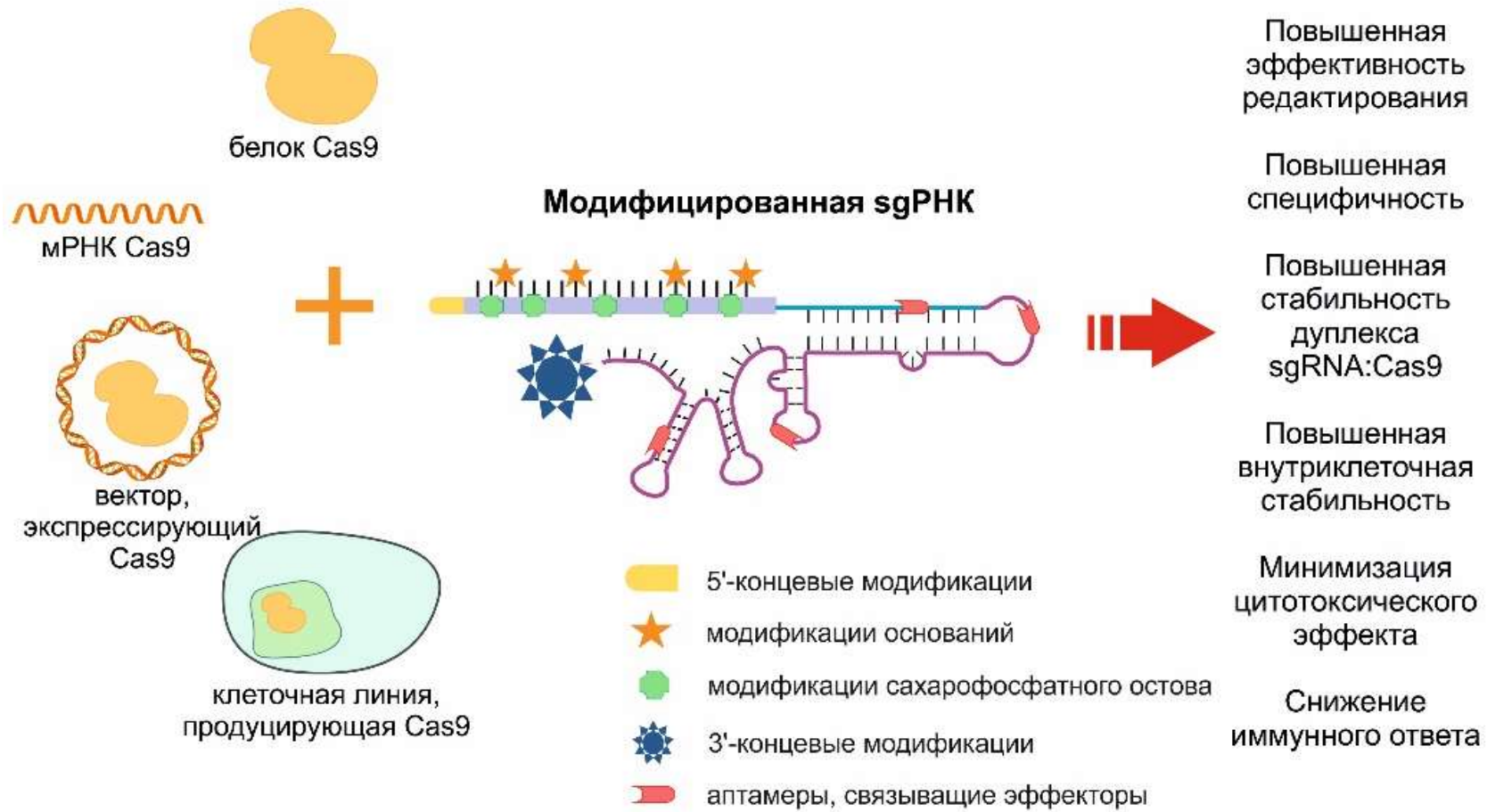
**The best is yet to come
(Scorpions, 2010, Sting in the Tail)**



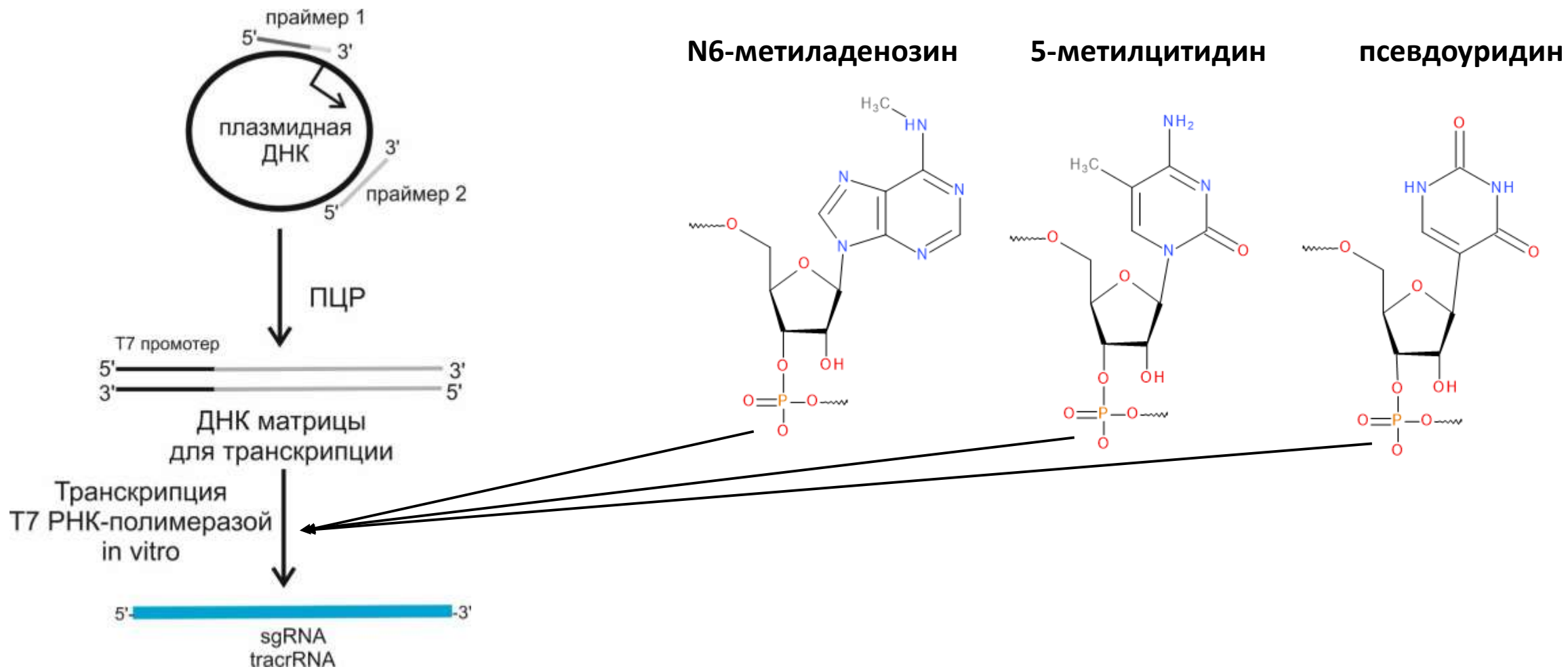
- Модификация направляющих РНК систем геномного редактирования CRISPR/Cas



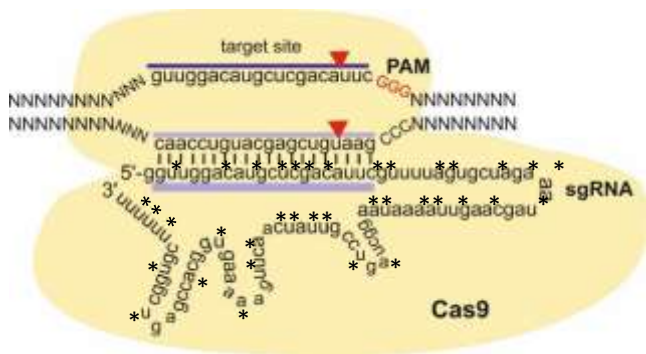
Разработка модифицированных систем геномного редактирования



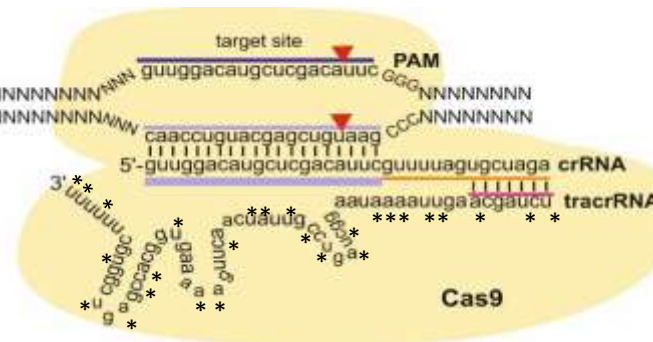
Метод синтеза направляющих РНК, содержащих природные модифицированные нуклеотиды



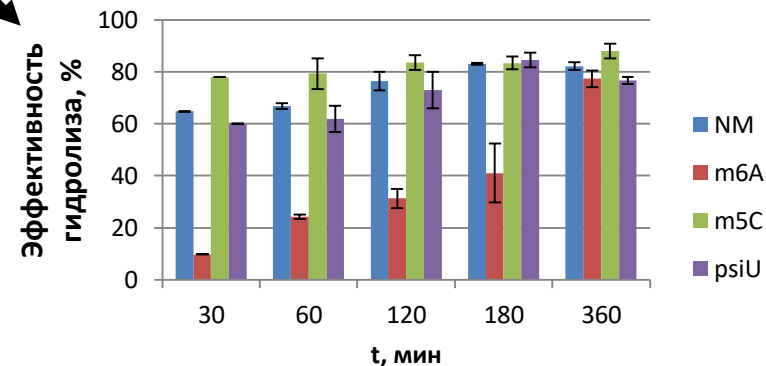
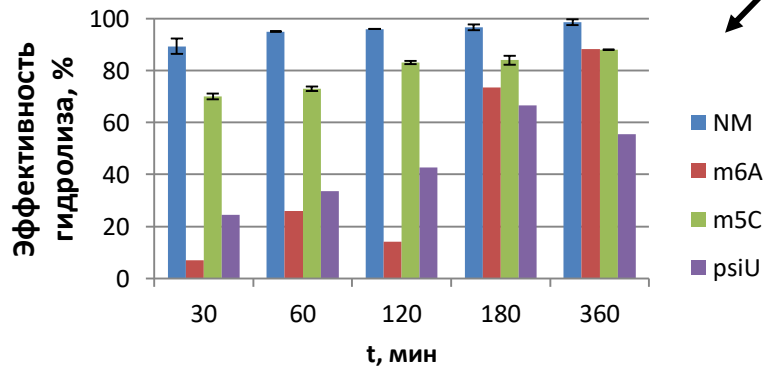
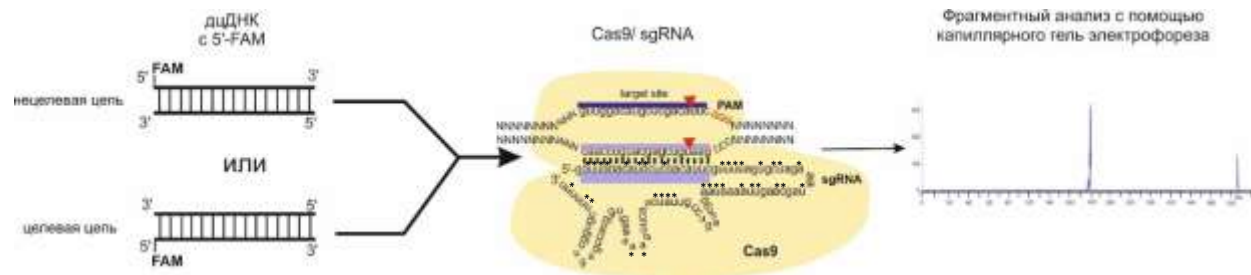
Кинетика комплексов Cas9 с направляющими и транс-активирующими РНК, содержащими природные модифицированные нуклеотиды



* - модификация

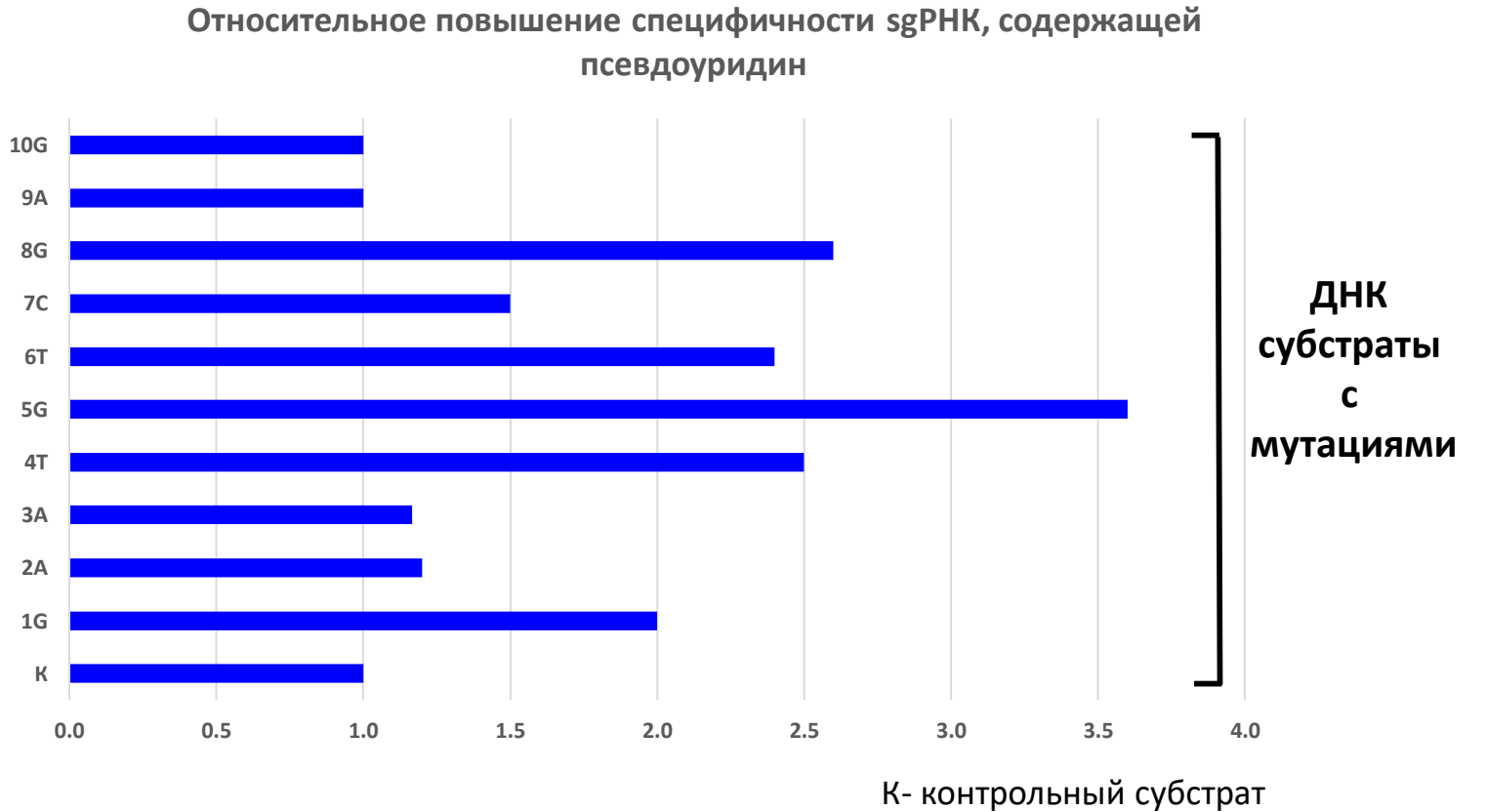


Метод



Оценка специфичности системы CRISPR/Cas9 при использовании направляющих РНК с природными модифицированными нуклеотидами *in vitro*

ДНК субстрат с мутациями	протоспейсер (5'-->3') PAM
10G	GTTGGACATGGTTCGACATTC GGG
9A	GTTGGACATGCACGACATTC GGG
8G	GTTGGACATGCTGGACATTC GGG
7C	GTTGGACATGCTCCACATTC GGG
6T	GTTGGACATGCTCGTCATTC GGG
5G	GTTGGACATGCTCGAGATTC GGG
4T	GTTGGACATGCTCGACTTTC GGG
3A	GTTGGACATGCTCGACAATC GGG
2A	GTTGGACATGCTCGACATAC GGG
1G	GTTGGACATGCTCGACATTG GGG
К-контроль	GTTGGACATGCTCGACATTC GGG



Данные получены и подготовлены м.н.с. Прохоровой Д.В.

Список основных публикаций по направлению:

1. Filippova J. A., Matveeva A. M., Zhuravlev E. S., Balakhonova E. A., Prokhorova D. V., Malanin S.J., Mahmud R. Shah, Grigoryeva T.V., Anufrieva K. S., Semenov D.V., Vlassov V. V., Stepanov G. A. Are snoRNAs “CRISPRable”? A report on box C/D snoRNA editing in human cells. **Front. Pharmacol.** **2019.** V. 10, Article 1246.
2. Filippova J.A., Matveeva A.M., Zhuravlev E.S., Stepanov G.A. Guide RNA modification as a way to improve CRISPR/Cas9-based genome-editing systems. **Biochimie.** **2019.** V. 167. P. 49-60.
3. Komissarova A. B., Sergeeva M. V., Mozhaeva E. V., Eshchenko N. V., Vasilieva A. D., Vasilyev K. A., Medvedev S. P., Malakhova A. A., Balakhonova E. A., Malanin S. Yu., Grigoryeva T. V., Zhuravlev E. S., Semenov D. V., Richter V. A., and Stepanov G. A. Increase in Sensitivity of HEK293FT Cells to Influenza Infection by CRISPR-Cas9-Mediated Knockout of IRF7 Transcription Factor. **Russ. J. Bioorg. Chem.** **2019.** 45, 749–757.
4. Amirkhanov R.N., Stepanov G.A. Systems of Delivery of CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes for Genome Editing. **Russ. J. Bioorg. Chem.** **2019.** Vol. 45. No. 6. P. 431-437.
5. Zhuravlev E.S., Sergeeva M.V., Malanin S., Amirkhanov R.N., Semenov D.V., Grigoryeva T., Komissarov A.B., Stepanov G.A. RNA-Seq transcriptome data of human cells infected with influenza A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) virus. **Data in Brief.** **2020.**

За 2019-2021 гг. – более 30 статей ИХБФМ СО РАН с участием сотрудников Лаборатории.

Проекты лаборатории

Грант РФФ № 18-75-10069

«Разработка стратегии создания высокопермиссивных к **вирусу гриппа** клеточных линий для получения вакцинных препаратов»

Грант РФФИ № 18-29-07073 «мк»

«Разработка универсальной стратегии селективного ингибирования сплайсинга с помощью редактирования генов малых ядрышковых РНК»

Грант РФФИ 19-34-90168

«Определение роли малых ядрышковых РНК в регуляции инфекции клеток человека **вирусом гриппа А**»

Грант РФФИ 18-29-17055

Разработка фотоактивных самоочищающихся тканевых материалов и исследование их антимикробных и ДНК-антиконтаминационных свойств

Грант РФФ № 18-14-00357 Исследование структурно-функциональных свойств фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов как перспективных инструментов для создания высокочувствительных систем диагностики нуклеиновых кислот. (2018 - 2020 гг.)

Грант РФФ № 20-14-00214 Система геномного редактирования на основе эндонуклеазы Cas9: структурные факторы узнавания целевых ДНК.

Партнеры лаборатории

ФГБУ НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России (г. Санкт-Петербург)

ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА (г. Москва)

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет (г. Казань)

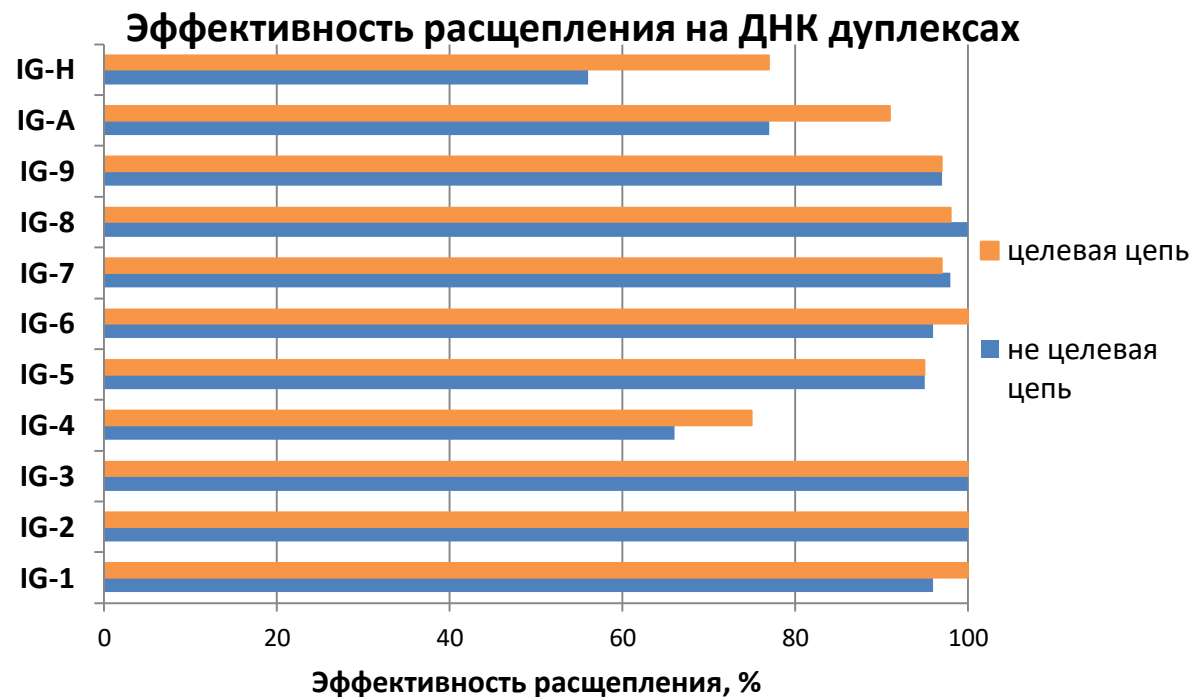
Лаборатория геномного редактирования ИХБФМ СО РАН



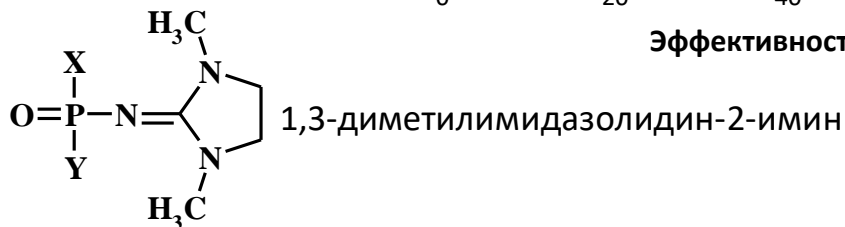
Cas9 с химерными направляющими РНК, содержащими фосфорилгуанидиновые группы

Химерные направляющие РНК (crRNA):

IGH 5'-GG*UU*GG*ACAUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'
IGA 5'-GG*UU*GGACAUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'
IG9 5'-GGUUGGACA*UGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'
IG8 5'-GGUUGGAC*AUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'
IG7 5'-GGUUGGA*CAUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'
IG6 5'-GGUUGG*ACAUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'
IG5 5'-GGUUG*GACAUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'
IG4 5'-GGUU*GGACAUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'
IG3 5'-GGU*UGGACAUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'
IG2 5'-GG*UUGGACAUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'
IG1 5'-GGUUGGACAUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'



*- фосфорилгуанидиновая группа



РНК мономеры отмечены красным
 ДНК мономеры отмечены черным

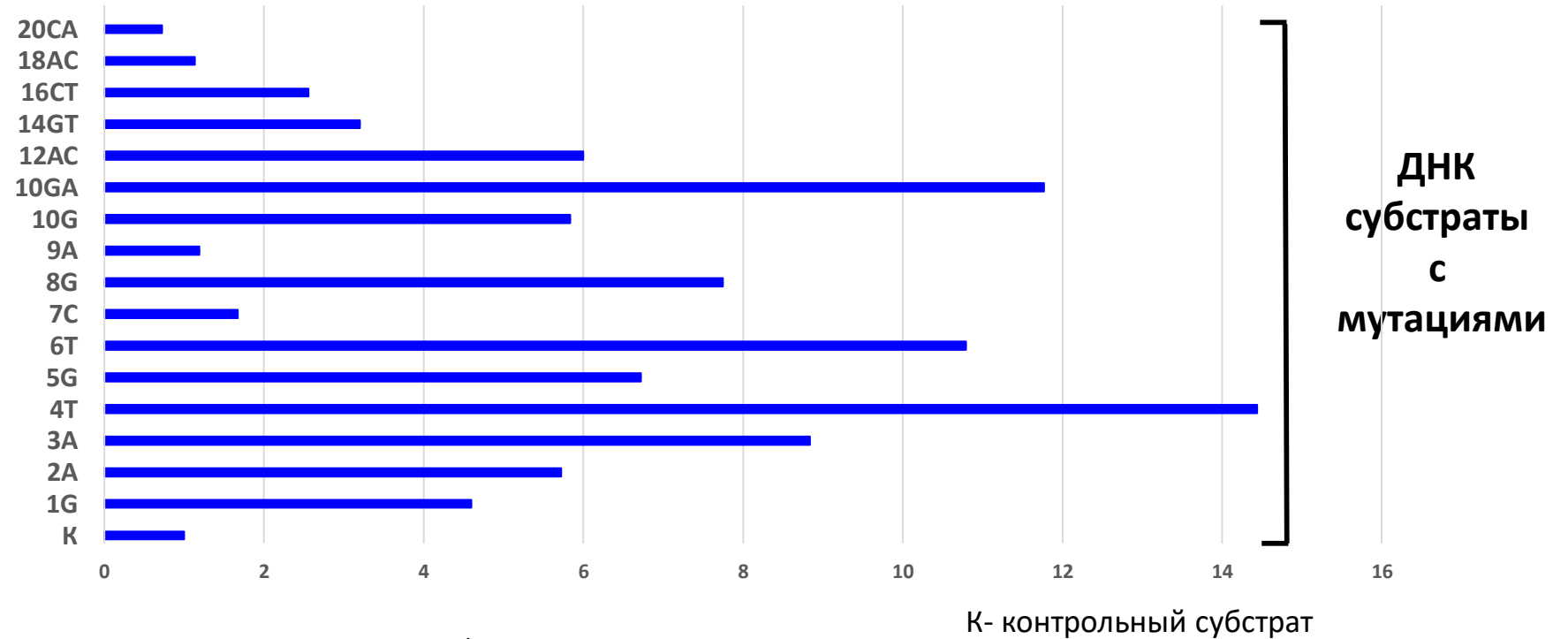
Данные получены и подготовлены м.н.с. Прохоровой Д.В.

Оценка специфичности системы CRISPR/Cas9

при использовании химерных направляющих РНК с фосфорилгуанидиновыми модификациями *in vitro*

ДНК субстрат с мутациями	протоспейсер (5'-->3') PAM
20CA	CATGGACATGCTCGACATTC GGG
18AC	GTACGACATGCTCGACATTC GGG
16CT	GTTGCTCATGCTCGACATTC GGG
14GT	GTTGGAGTTGCTCGACATTC GGG
12AC	GTTGGACAACCTCGACATTC GGG
10GA	GTTGGACATGGACGACATTC GGG
10G	GTTGGACATGGTCGACATTC GGG
9A	GTTGGACATGCACGACATTC GGG
8G	GTTGGACATGCTGGACATTC GGG
7C	GTTGGACATGCTCCACATTC GGG
6T	GTTGGACATGCTCGTCATTC GGG
5G	GTTGGACATGCTCGAGATTC GGG
4T	GTTGGACATGCTCGACTTTC GGG
3A	GTTGGACATGCTCGACAATC GGG
2A	GTTGGACATGCTCGACATAC GGG
1G	GTTGGACATGCTCGACATTG GGG
К- контроль	GTTGGACATGCTCGACATTC GGG

Относительное повышение специфичности химерной направляющей РНК, содержащей фосфорилгуанидиновую группу



Немодифицированная РНК 5'-GGUUGGACAUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'

IG8 5'-GGUUGGAC*AUGCUCGACAUUCGUUUUAGUGCUAGA -3'

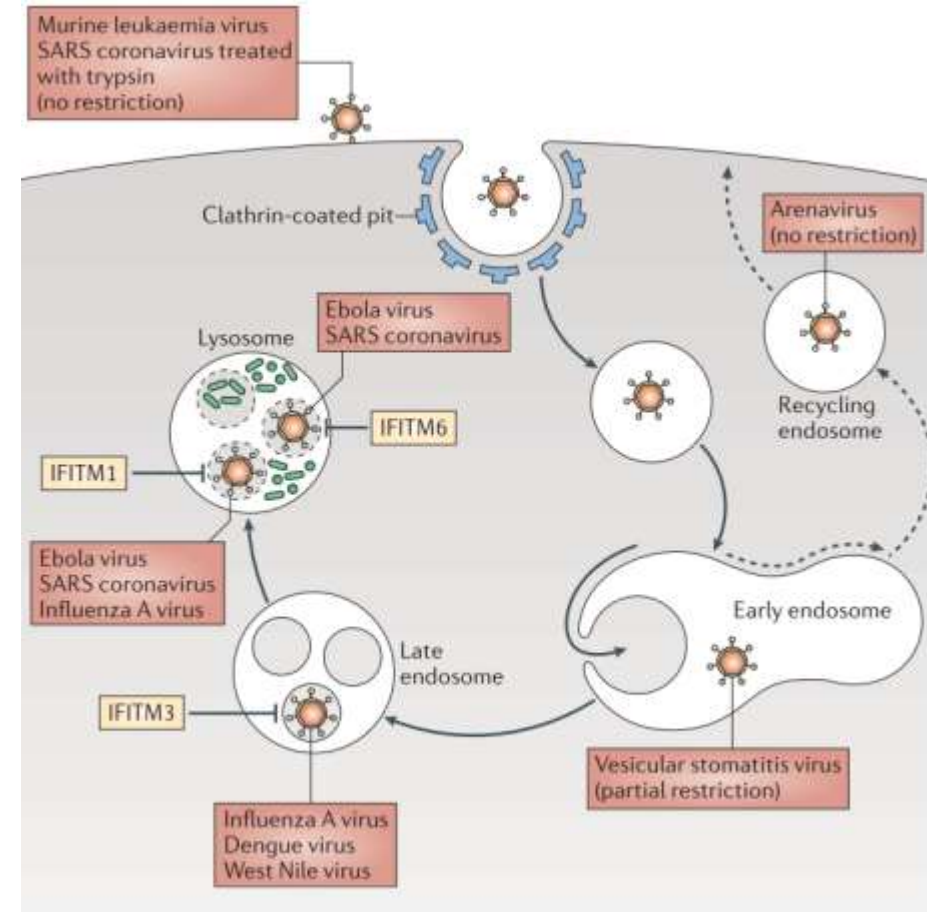
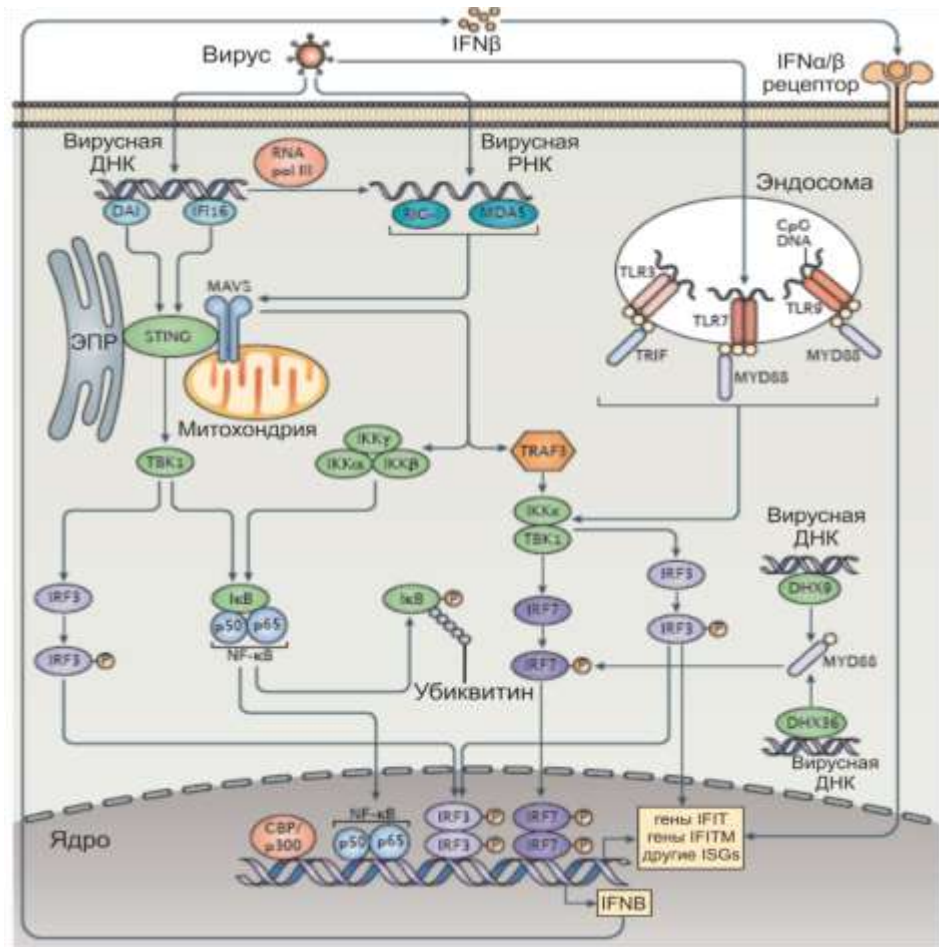
*- фосфорилгуанидиновая группа

РНК мономеры отмечены красным

ДНК мономеры отмечены черным

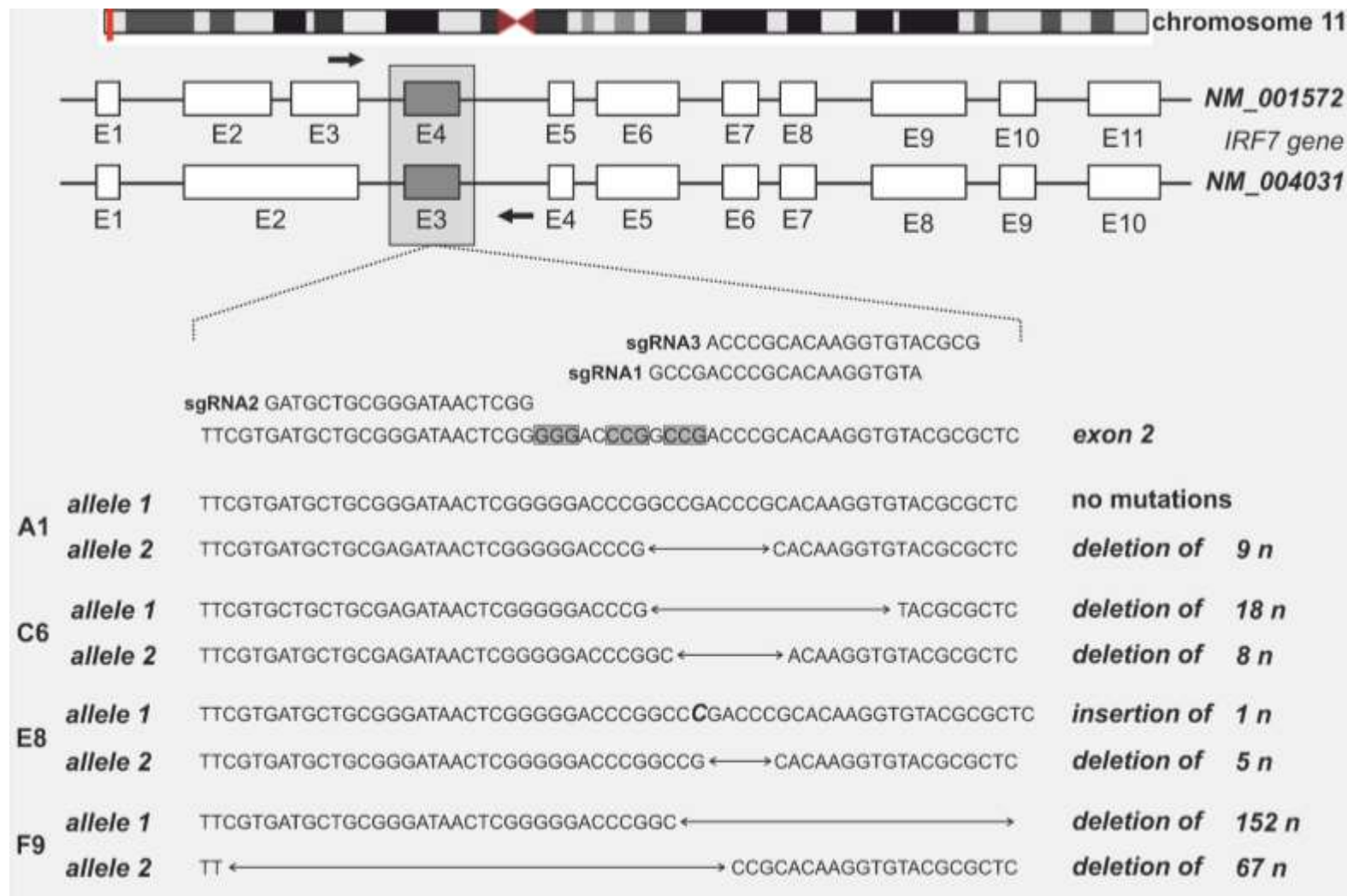
Данные получены и подготовлены м.н.с. Прохоровой Д.В.

Мишень: гены каскада врожденного иммунного ответа



Diamond M., Farzan M. et al. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins, *Nature Reviews Immunology*, 2013, Vol. 13, p 46-57

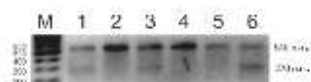
Целевые мутации в гене *IRF7*



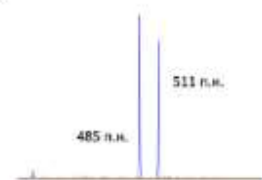
Общая схема эксперимента



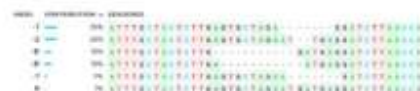
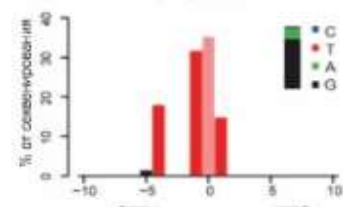
⑤ E1T7 Анализ



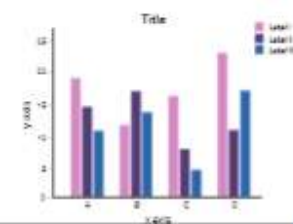
⑥ IDAA анализ



⑦ TIDE и ICE

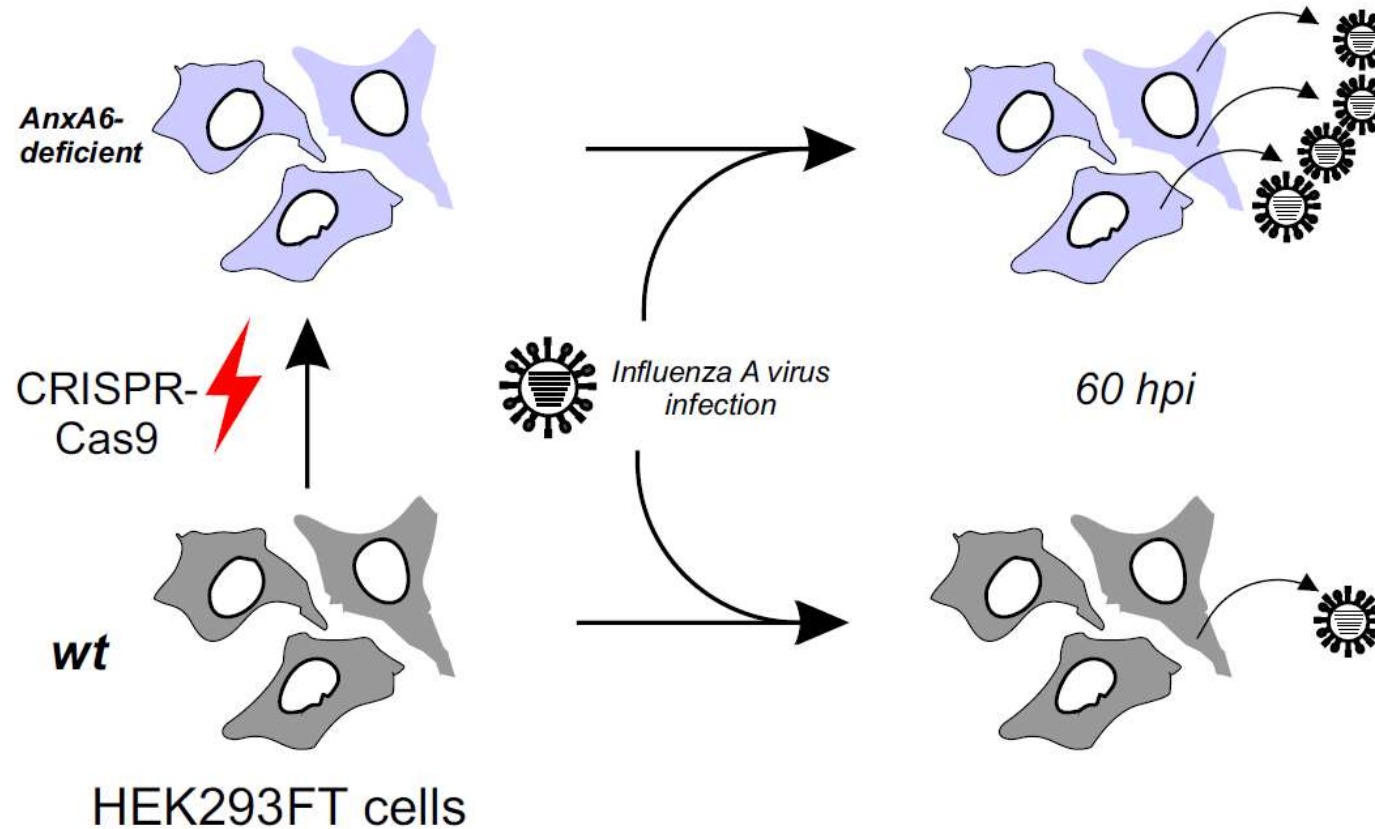


⑧ Оценка изменения уровня мяоРНК и их функциональной активности



Created in BioRender.com bio

Создание модифицированных клеточных линий для наработки вирусных препаратов



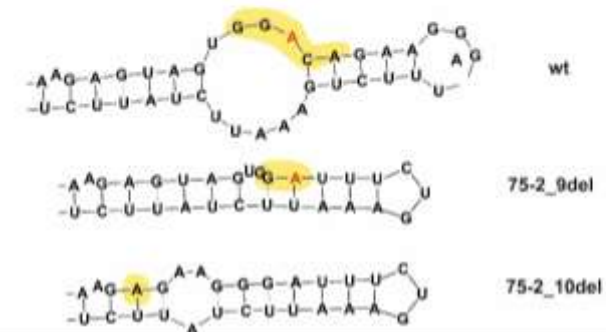
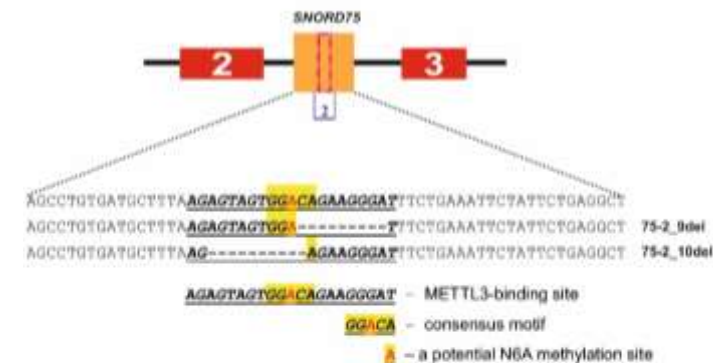
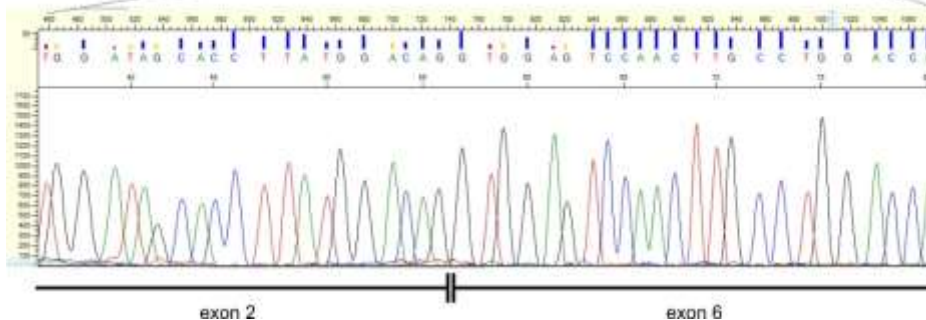
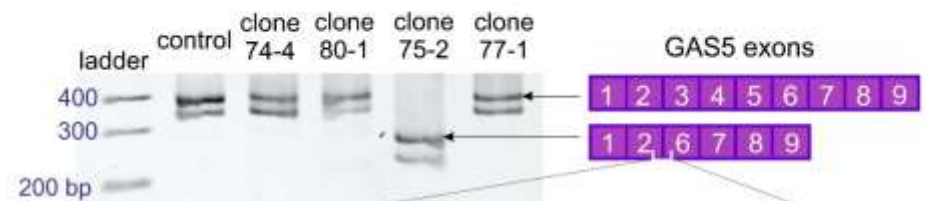
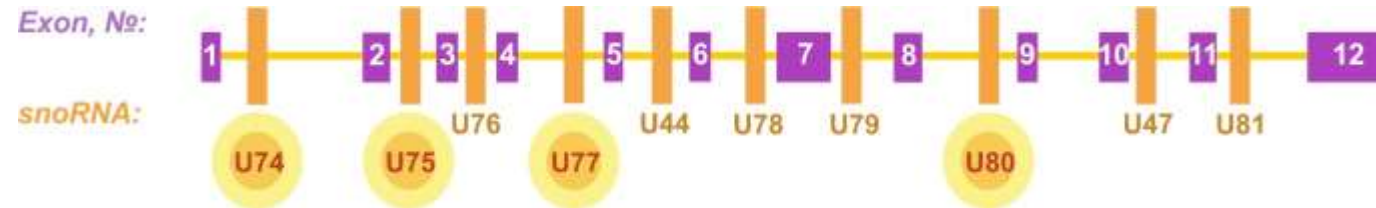
- Регуляция некодирующих РНК



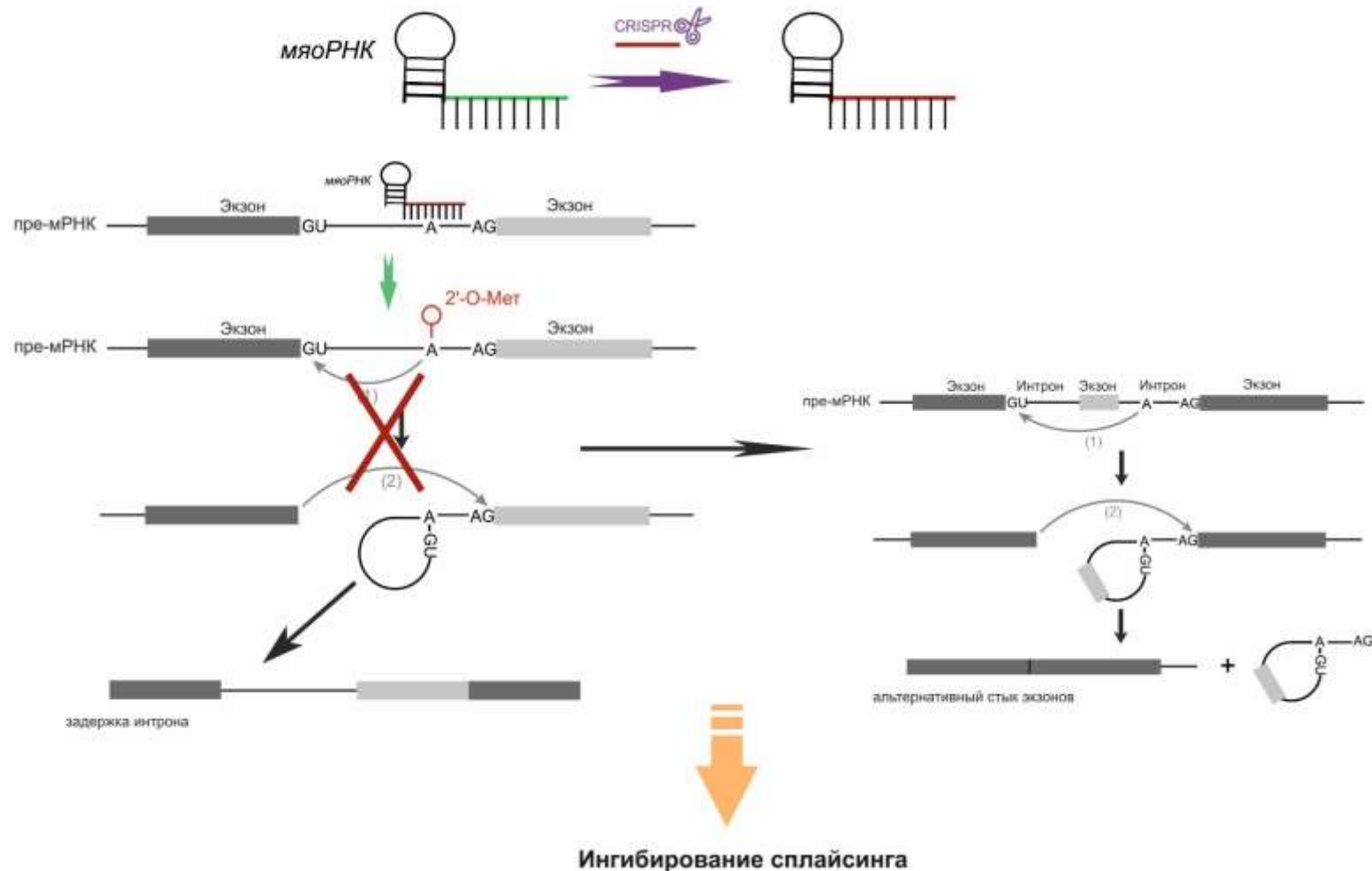
Разработка новых систем регуляции активности генов в клетках человека

Ген-мишень:
GAS5

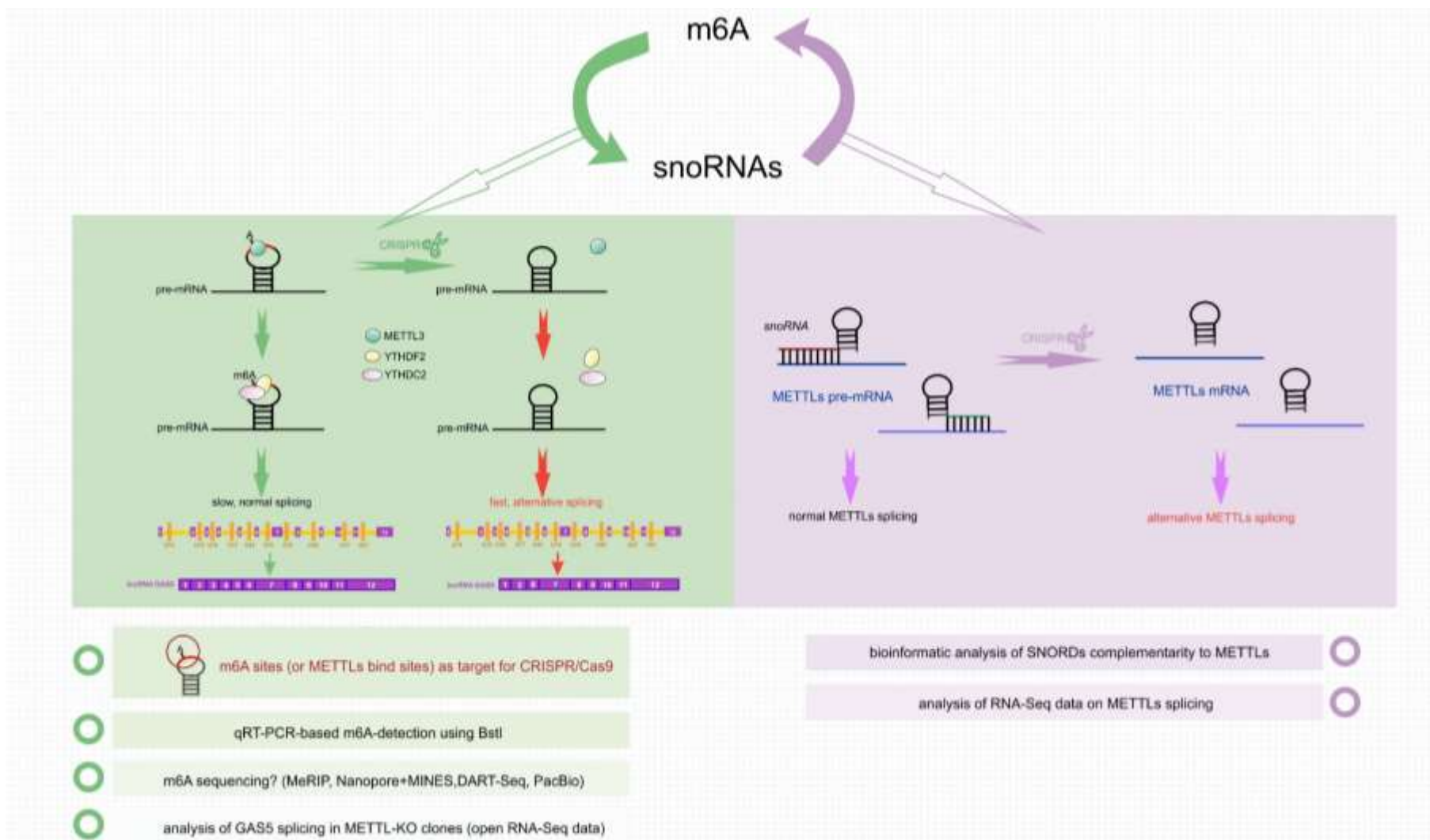
Метод:
CRISPR/Cas9



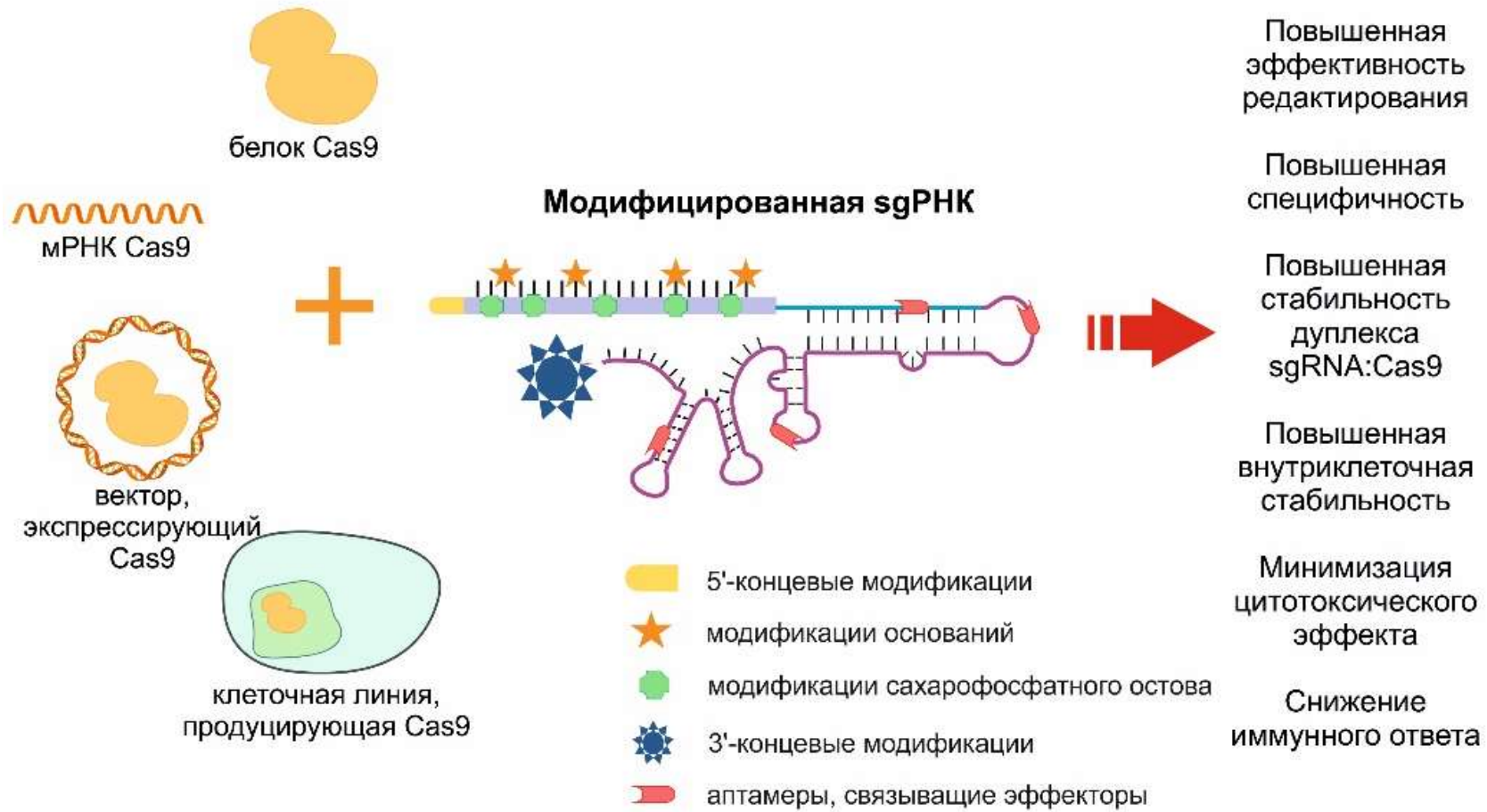
Разработка универсальной стратегии селективного ингибирования сплайсинга



Связь мяоРНК и м6А-метилирования



Разработка модифицированных систем геномного редактирования



Новые направления лаборатории

Разработка клеточных моделей заболеваний человека

Разработка средств регуляции экспрессии заданных генов с помощью систем Cas13-зависимой интерференции

Разработка платформы синтеза функциональных мРНК (РНК-вакцины)

Анализ белок-белковых взаимодействий генов, дифференциально экспрессируемых в моноклональных линиях

