

# Анализ взаимодействий dCas9-белков с ДНК в *in vitro* системах для создания усовершенствованных методов управления работой геномов на основе CRISPR/(d)Cas-систем

Мамаева Н.Ю.<sup>1\*</sup>, Глухов Г.С.<sup>1, 2</sup>, Фескин П.Г.<sup>1</sup>, Кристовский Н.В.<sup>1</sup>, Шайтан А.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Шэньчжэнь, Китай

\* tataeva19n@gmail.com

**Ключевые слова:** Cas-белки; CRISPR-(d)Cas системы; связывание с ДНК; генетические схемы; регуляция транскрипции; редактирование генома

**Мотивация и цель:** Система CRISPR/Cas9, широко используемая в качестве инструмента редактирования генома, может быть адаптирована для регуляции экспрессии генов путем активации или репрессии транскрипции, изменения эпигенома, визуализации динамики геномных локусов и построения генетических сетей [1]. Однако наличие неспецифического связывания является серьезной проблемой, ограничивающей применение системы [2]. В частности, рациональный дизайн генетических схем требует точных значений параметров взаимодействий комплексов dCas9 с целевыми сайтами ДНК. Целью работы было изучение взаимодействия dCas9-белков с ДНК *in vitro* в зависимости от ряда факторов (последовательность ДНК, РНК, состав растворителя) и разработка подходов к оптимизации связывания dCas9-белков с ДНК для создания функциональных генетических элементов.

**Методы и алгоритмы:** Эксперименты проводились на очищенном в ходе данной работы белке SpdCas9. Параметры взаимодействия комплексов вычислялись путем измерения поляризации флуоресценции в 384-луночных планшетах на планшетном сканере. Возможность сборки модифицированных комплексов проверяли методом просвечивающей электронной микроскопии с негативным контрастом. Для изучения конформационной подвижности apo-dCas9 использовали криоэлектронную микроскопию.

**Результаты:** Разработан метод характеристики параметров связывания на основе измерения поляризации флуоресценции, оптимизированный для изучения dCas9-белков и их комплексов с ДНК. На основе разработанного метода были измерены константы связывания комплексов dCas9-гРНК с ДНК в условиях различных концентраций одно- и двухвалентных ионов. Так, показано, что присутствие ионов марганца в небольших концентрациях способствует улучшению сборки комплексов dCas9-гРНК с ДНК, поскольку вызывает локальное раскручивание ДНК в РАМ-области. Однако повышение концентрации значительно ухудшает связывание, что объясняется изменением конформации ДНК, препятствующей связыванию с комплексом dCas9-гРНК. Также было охарактеризовано влияние последовательности ДНК на неспецифическое связывание данных комплексов и показана прямая зависимость от количества РАМ-сайтов. В случае комплексов apo-dCas9 с ДНК показано, что взаимодействие носит электростатический

характер и зависит от соотношения концентрации положительных зарядов в РАМ-взаимодействующем домене белка dCas9 и отрицательных зарядов ДНК. Так, при соотношении зарядов 1:1 происходит образование нерастворимых агрегатов, состоящих из dCas9 и ДНК, что важно учитывать в анализах *in vitro*. Также получена структура белка dCas9 с улучшенным разрешением в области РІ домена. Анализ структуры, полученной методом CryoЕМ, показывает наличие подвижных доменов (RECIII), что согласуется с механизмом связывания белка. Однако наличие электронной плотности в области РІ-домена говорит о его конформационной стабильности по сравнению с доменом RECIII. На основе литературных данных о нецелевом связывании предложен подход к повышению специфичности связывания путем введения дополнительного димеризационного домена в последовательность гРНК [3] и рассчитана эффективность сборки различных модифицированных конструкций *in vitro*.

**Выводы:** Применение и разработка различных методов как физико-химической, так и структурной характеристики системы CRISPR/Cas позволяют разобраться в механизмах нецелевого связывания Cas-белков с ДНК.

**Финансирование:** Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-539).

## Modulation of dCas9-protein-DNA interactions by variation of solvent ionic composition and guide RNA functionalization

Mamaeva N.Y.<sup>1\*</sup>, Glukhov G.S.<sup>1,2</sup>, Feskin P.G.<sup>1</sup>, Kristovskiy N.V.<sup>1</sup>, Shaytan A.K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen, China

\* mamaeva19n@gmail.com

**Key words:** Cas proteins; CRISPR-(d)Cas systems; DNA binding; genetic circuits; transcriptional regulation; genome editing

**Motivation and Aim:** The CRISPR/Cas9 system, widely used as a genome editing tool, can be adapted for gene expression regulation by activating or repressing transcription, modifying the epigenome, visualizing the dynamics of genomic loci, and constructing genetic circuits designing genetic circuits [1]. However, off-target activity and non-specific binding are significant issues that limit the application of the system. Specifically, the rational design of genetic circuits requires precise values of the interaction parameters of dCas9 complexes with target DNA sites [2]. The aim of this work was to study the interaction of dCas9 proteins with DNA *in vitro* depending on several factors (DNA sequence, RNA, solvent composition) and to develop approaches to optimize the binding of dCas9 proteins to DNA for the creation of functional genetic elements.

**Methods and Algorithms:** Experiments were conducted on the SpdCas9 protein purified during this work. Interaction parameters of the complexes were calculated by measuring fluorescence polarization in 384-well plates using a plate reader. The assembly of modified complexes was checked using negative-stain TEM. Cryo-EM was used to study the conformational mobility of apo-dCas9.

**Results:** A method for characterizing binding parameters based on fluorescence polarization measurements was developed and optimized for studying dCas9 proteins and their complexes with DNA. Using this method, the  $K_d$  of dCas9-RNA complexes with DNA were measured under varying concentrations of mono- and divalent ions. It was shown that the presence of manganese ions in low concentrations facilitates the assembly of dCas9-RNA complexes with DNA by causing local unwinding of DNA in the PAM region. However, increasing the concentration significantly impairs binding due to DNA conformational changes that hinder interaction with the dCas9-RNA complex. Additionally, the influence of DNA sequence on the non-specific binding of these complexes was characterized, showing a direct dependence on the number of PAM sites. For apo-dCas9 complexes with DNA, it was shown that the interaction is electrostatic and depends on the ratio of positive charges in the PAM-interacting domain of the dCas9 protein to the negative charges of DNA. At a charge ratio of 1:1, insoluble aggregates consisting of dCas9 and DNA form, which is important to consider in *in vitro* analyses. The structure of the dCas9 protein with improved resolution in the PI domain was also obtained. Analysis of the structure obtained by CryoEM shows the presence of mobile domains (RECIII), which is consistent with the protein's binding mechanism. However, the presence of electron density in the PI domain region indicates its conformational stability compared to the RECIII domain.

Based on literature data on off-target binding, an approach to enhance binding specificity was proposed by introducing an additional dimerization domain into the RNA sequence, and the efficiency of assembling various modified constructs *in vitro* was calculated [3].

**Conclusion:** The application and development of various methods for both physicochemical and structural characterization of the CRISPR/Cas system allow for a better understanding of the mechanisms of off-target binding of Cas proteins to DNA.

**Funding:** The study is supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education (grant No. 075-15-2024-539).

#### *Список литературы/References*

1. Fadul S.M., Arshad A., Mehmood R. CRISPR-based epigenome editing: mechanisms and applications. *Epigenomics*. 2023;15(21):1137-1155
2. Lazzarotto C.R. et al. CHANGE-seq reveals genetic and epigenetic effects on CRISPR–Cas9 genome-wide activity. *Nat Biotechnol*. 2020;38(11):1317-1327
3. Cho S.W. et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*. 2014;24(1):132-141