

Получение варианта SpyCas9 сочетающего высокую эффективность и специфичность редактирования ДНК в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*

Научный руководитель – Гарбуз Давид Григорьевич

Давлетшин Артем Игоревич

Аспирант

Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва, Россия

E-mail: artem.dav7@yandex.ru

Технология редактирования генома, обеспечивающая целенаправленное встраивание или удаление определенных последовательностей ДНК в геноме, является важным инструментом для научных исследований и перспективным подходом в лечении генетических заболеваний человека. В настоящее время наиболее широко используемым молекулярным инструментом технологии редактирования генома является удобная в использовании система CRISPR/Cas9 (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats - короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR associated protein - CRISPR-ассоциированный белок) из *Streptococcus pyogenes*. Однако система имеет ряд недостатков, ограничивающих ее применение в терапии наследственных заболеваний. Один из ключевых недостатков - это довольно высокая неспецифичная активность. В ходе многочисленных исследований созданы более точные варианты SpyCas9, однако они в целом проявляют более низкую активность на целевых сайтах.

Цель нашей работы - получить варианты SpyCas9, обладающие как высокой специфичностью, так и активностью. Для оценки активности и специфичности SpyCas9 вариантов нами создана тест-система на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и гена биосинтеза аденина *ADE2* (Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase). В данной тест-системе активность вариантов SpyCas9 можно легко оценить по соотношению дрожжевых колоний, окрашенных в красный цвет вследствие SpyCas9-опосредуемого повреждения гена *ADE2*. На первом этапе работ нами получен высокоточный вариант НураCas9-DE, сочетающий мутации N692A, M694A, Q695A, H698A (Нура-Cas9) и D1135E (Cas9-DE) [1, 2]. Однако его активность оказалась минимум в 2 - 2.5 раза меньше активности белка дикого типа. Далее с помощью метода «эволюции в пробирке» получен производный вариант, обозначенный нами как НураCas9-DE-LP, активность которого оказалась сопоставимой с таковой у белка дикого типа, однако сохранилась очень высокая специфичность редактирования ДНК. Полученный нами высокоспецифичный и активный вариант SpyCas9 может служить перспективным кандидатом для дальнейшего улучшения технологии редактирования генома.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-07015.

Автор выражает особую благодарность своему научному руководителю Гарбузу Давиду Григорьевичу, доктору биологических наук, вед. науч. сотр. лаборатории молекулярных механизмов биологической адаптации ИМБ РАН за значимые замечания и важнейшие советы при проведении и оформлении данной работы.

Источники и литература

- 1) Chen J.S., Dagdas Y.S., Kleinstiver B.P., Welch M.M., Sousa A.A., Harrington L.B., Sternberg S.H., Joung J.K., Yildiz A., Doudna J.A. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy// Nature. 2017. Vol. 550. p. 407-410.
- 2) Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V.V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.R., Aryee M.J., Joung J.K. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities// Nature. 2015. Vol. 523. p. 481-485.

Иллюстрации

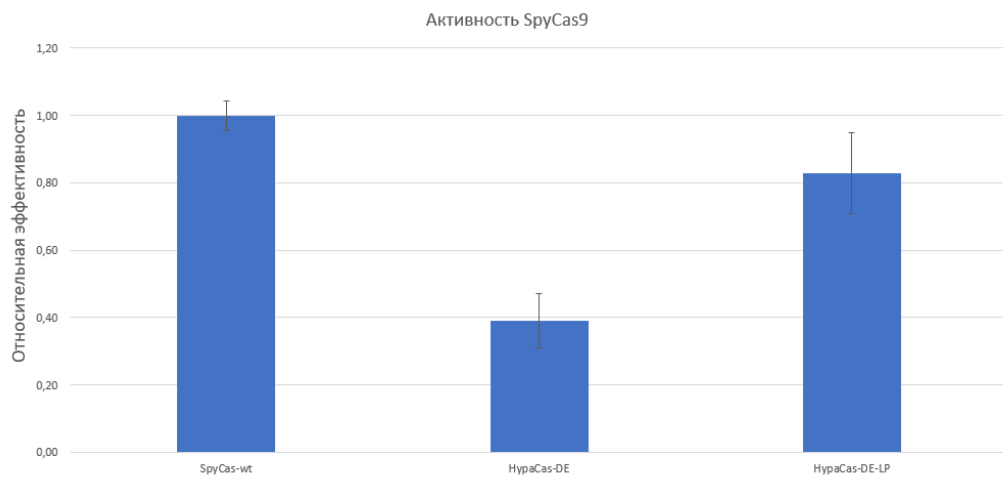


Рис. 1. SpyCas-wt - Cas9 дикого типа, HуpaCas-DE - высокоточный вариант Cas9, сочетающий мутации N692A, M694A, Q695A, H698A (Hуpa-Cas9) и D1135E (Cas9-DE), HуpaCas-DE-LP - полученный производный вариант Cas9