

Пути повышения эффективности редактирования генома человека с помощью CRISPR-Cas9

Научный руководитель – Мазуров Дмитрий Вячеславович

Лопатухина Е.В.¹, Зотова А.А.²

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия

CRISPR-Cas9 представляет собой бактериальную систему защиты против вирусов, успешно адаптированную для редактирования генома других организмов. Она состоит из РНК-зависимой нуклеазы Cas9 и гидовой РНК, комплементарной к одной из цепей ДНК (sgRNA). Нуклеаза Cas9 производит двуспиральный разрыв ДНК (DSB), который репарируется по механизму негомологичного соединения концов (NHEJ), что приводит к случайным вставкам и делециям и выключению гена. При наличии донорской ДНК происходит репарация по механизму гомологичной рекомбинации (HDR), при которой область разрыва замещается точной последовательностью, заложенной в репарирующей донорской ДНК.

Несмотря на высокую эффективность мутагенеза по механизму NHEJ, часть образующихся мутаций оказывается нелетальной для гена, что снижает вероятность его нокаутирования. Мы предположили, что решить эту проблему можно с помощью ДНК-экзонуклеазы, в частности, TREX2, которая будет расщеплять концы ДНК в месте разрыва и усиливать делеционный мутагенез. Для этого мы котрансфицировали экспрессионную плазмиду TREX2 с компонентами CRISPR-Cas9 в клетки 293T-GFPt и показали, что количество клеток, теряющих GFPt свечение, не увеличивается ни при образовании тупых концов (дикий тип Cas9), ни при формировании 3'-выступающих концов (никазный вариант Cas9). Нашей следующей задачей является слияние Cas9 с TREX2, исходя из предположения, что локальная концентрация TREX2 может существенно повысить ее активность.

Другой проблемой редактирования генома является крайне низкая эффективность HDR в большинстве типов соматических клеток. Для изучения способов повышения HDR ранее нами была создана модель репарации мутантного GFPt в клетках 293T. Для поиска способов усиления HDR было протестировано три различных подхода: 1) ингибирование ключевых участников процесса NHEJ различными химическими агентами (Nu7441, Ku0060648, Scr7); 2) стимулирование HDR различными химическими агентами (RS-1, L755507); 3) увеличение доступности донорской ДНК путем искусственного слияния нуклеазы Cas9 с «цинковым пальцем» (ZF), специфически связывающим ДНК-последовательность донора. На модели 293T-GFPt-mut мы показали, что среди указанных выше химических агентов только ингибиторы ДНК-зависимой протеинкиназы Nu7441 (1 мкМ) и Ku0060648 (0,1 мкМ) статистически значимо усиливали уровень HDR в 1,93 и 1,2 раза соответственно. Использование «химерной» нуклеазы Cas9-ZF в комбинации с донорской ДНК, в которую введена последовательность для связывания с ZF, существенно не влияли на уровень репарации GFPt. Таким образом, ингибиторы Nu7441 и Ku0060648 по отдельности или в комбинации могут быть рекомендованы для редактирования генома человека, когда требуется репарация DSB в присутствии донорской ДНК.