

Создание и генетическая характеристика трансгенной линии НЕК293 для оценки CRISPR/Cas9-индуцированной репарации.

Сафин А.Р.¹, Пустогаров Н.А.²

1 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: artur-safin-96@mail.ru*; 2 - Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва, Россия, *E-mail: pustogarov@gmail.com*

Геномное редактирование с помощью CRISPR/Cas9 системы позволяет создавать сайт-специфичные двухцепочечные разрывы, которые могут быть репарированы клетками с помощью гомологичной рекомбинации (HDR) или с помощью негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ). Причем репарация по пути NHEJ, в отличие от HDR, происходит наиболее часто (~99%) и приводит к появлению неспецифических инсерций или делеций, что является препятствием для таргетного редактирования генома. В связи с этим, усилия многих исследовательских групп направлены на увеличение процента репарации по пути HDR. В связи с этим актуальной является задача создания удобной модельной клеточной системы, позволяющей провести оценку уровня HDR и уровня NHEJ. [1,2]

В нашей лаборатории была воссоздана описанная в литературе клеточная система на основе встроенной в геном клеточной линии НЕК293 генетической кассеты, экспрессирующей GFP. При котрансфекции клеток плазмидой, кодирующей Cas9 и gRNA к гену GFP, совместно с ssODN в качестве донора, GFP конвертируется в BFP в случае репарации по пути HDR, а в случае репарации по пути NHEJ наблюдается утрата клетками флуоресценции. [3]

В данной работе, кассета, кодирующая белок GFP была встроена в геном клеток НЕК293 с помощью липофекции с дальнейшей селекцией флюоропозитивных клеток. Однако, для адекватной оценки процента HDR-репарации при использовании данной системы критически важным является получение информации о следующих характеристиках: число геномных инсерций, расположение инсерций и их/её генетическое окружение.

Для решения данной задачи были использованы данные секвенирования Oxford Nanopore с использованием кита SQK-CS9109. При биоинформатическом анализе данных были использованы de-novo сборщики Canu и Flye, с помощью которых была идентифицирована одиночная геномная инсерция в 6 хромосоме. Полученные данные о инсерции была верифицирована с помощью ПЦР-анализа. Данная тест-система была также апробирована для оценки уровня HDR-репарации с использованием проточной цитометрии.

Источники и литература

- 1) Yang H. et al. Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks //International journal of molecular sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 18. – С. 6461.
- 2) Pawelczak K. S. et al. Modulating DNA repair pathways to improve precision genome engineering //ACS chemical biology. – 2018. – Т. 13. – №. 2. – С. 389-396.
- 3) Glaser A., McColl B., Vadolas J. GFP to BFP conversion: a versatile assay for the quantification of CRISPR/Cas9-mediated genome editing //Molecular Therapy-Nucleic Acids. – 2016. – Т. 5.