

Поиск факторов, влияющих на активность эндонуклеазы Cas9, в дрожжевой модели *Saccharomyces cerevisiae***Научный руководитель – Степченкова Елена Игоревна***Девяткин Д.М.¹, Кравцова Е.В.²*

1 - Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Saint Petersburg, Россия, *E-mail: dimi02121@gmail.com*; 2 - Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Saint Petersburg, Россия, *E-mail: pharmabs@mail.ru*

Система CRISPR/Cas9 является удобной платформой для создания молекулярно-генетических инструментов редактирования генома. Используемые на практике редактирующие комплексы состоят из эндонуклеазы Cas9 и направляющей РНК (sgRNA). За счет комплементарного взаимодействия с геномной ДНК sgRNA узнает целевой сайт (20 п.н.), ограниченный с 3'-конца последовательностью NGG, называемой PAM (Protospacer adjacent motif), и таким образом направляет Cas9 к месту редактирования. Сайт редактирования. Cas9 вносит двуниевый разрыв в пределах целевой последовательности на расстоянии 3 п.н. от PAM. Редактирование происходит в ходе последующей репарации ДНК. Несмотря на относительно высокую специфичность, sgRNA/Cas9 может связываться с сайтами, не полностью комплементарными sgRNA. Это приводит к появлению мутаций в нецелевых сайтах. Вследствие этого, исследование причин и механизмов неспецифической активности редактирующих систем является актуальной задачей. Ранее было показано, что позиции оснований sgRNA, некомплементарных целевому сайту, имеют разную степень влияния на активность белка Cas9 [3]. Однако на данный момент остается спорным вопрос о влиянии последовательности PAM на эффективность эндонуклеазы Cas9 *in vivo*. Целью данной работы является изучение эффективности комплекса sgRNA/Cas9, а также его мутагенной активности в присутствии различных сайтов PAM: GGG, CGG, AGG и TGG на модели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

На основе штамма LAN201 [1] мы получили изогенные штаммы с одним из четырех сайтов PAM в репортерном гене *URA3*. В качестве вектора для доставки генов Cas9 и sgRNA использовали плазмиду pML107-GAL1, сконструированную нами на основе плазмиды pML107 [2] и содержащую ген Cas9 под индуцируемым галактозой промотором *GAL1*. Штаммы, несущие один из альтернативных вариантов PAM, трансформировали плазмидой pML107-GAL1, содержащей последовательность sgRNA. Эффективность Cas9 оценивали по снижению выживаемости трансформантов из-за токсичного влияния вносимых двуниевых разрывов. Степень влияния последовательности PAM оценивали как относительную выживаемость трансформантов по сравнению с трансформантами, несущими контрольную плазмиду без *Cas9* и последовательности sgRNA. Было показано, что совместная экспрессия *Cas9* и sgRNA, полностью комплементарной целевому сайту, значительно снижает выживаемость трансформантов (55 колонии против 710 в контрольном эксперименте). По предварительным данным последовательность PAM не влияет на эффективность Cas9. Из 55 колоний, выживших при экспрессии *Cas9* и sgRNA, только 2 имели фенотип Ura⁻ и имели однонуклеотидную вставку на расстоянии 3 п.н. от PAM.

Поддержано грантом РФФ 20-15-00081. Выражаем благодарность за научное руководство Степченковой Е.И.

Источники и литература

- 1) Lada et al. // PLoS genetics. 2013. Т. 9. №. 9. e1003736.

- 2) Laughery, Wyrick // Current protocols in molecular biology. 2019. Т. 129. № 1. e110.
- 3) Zheng et al. // Scientific reports. 2017. Т. 7. №. 1. С. 40638.