Секция «Молекулярная биология»

Увеличение эффективности HDR для CRISPR-опосредованного редактирования генома

Научный руководитель – Иваненко Александр Вячеславович

Бережная Милана Александровна

Студент (специалист)

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

E-mail: milamila03@icloud.com

Аннотация:

Эффективностью редактирования генома с использованием CRISPR системы была увеличена за счёт привлечения к месту двухцепочечного разрыва белков, участвующих в процессах репарации ДНК. В работе использовались PALB2, i53 и CtIP белки, которые привлекались к месту разрыва с помощью λN22-BoxB адаптерной системы.

Редактирование генома с использованием spCas9 белка CRISPR системы происходит за счёт направленного внесения в геном двухцепочечного разрыва и последующей его репарации. Специфичность разрыва задаётся короткой последовательностью гидовой РНК. Наибольший контроль над исходом репарации дает HDR путь. Эффективность прохождения HDR может быть увеличена за счёт экспрессии белков, участвующих в процессах репарации. В нашей лаборатории было показано, что наибольший эффект достигается при доставке белков к месту разрыва с помощью λN22-BoxB адаптерной системы. В данной работе мы используем эту адаптерную систему для доставки PALB2, i53 и CtIP эффекторных белков.

Считывание эффективности редактирования проводилось за счёт встраивания в геном флуоресцентных конструкций и подсчёта клеток с флуоресцентным сигналом методом проточной цитофлуориметрии. Для этого с помощью лентивирусной вставки была получена моноклональная клеточная линия Hela Kyoto, стабильно экспрессирующая spCas9 белок. Были получены плазмиды, кодирующие эффекторные белки PALB2, i53, CtIP, и плазмиды без эффекторного белка в качестве контроля, которые были направленны к шести участкам генома (AAVS1, LMNB1, ACTB, SEC61B, TUBA1B, GAPDH). Плазмиды, кодирующие эффекторные белки, содержат две кассеты. Кассету с эффекторным и mRuby флуоресцентным белком для контроля экспрессии под CMV промотором и кассету с гидовой РНК под U6 промотором. Для оценки эффективности редактирования полученнная линия Hela Kyoto трансфецируется плазмидой, кодирующей эффекторный белок и гидовую РНК, и соответствующей донорной плазмидой с EGFP белком. Через два дня после трансфекции с помощью клеточного сортера по зелено-красному флуоресцентному сигналу отбираются клетки, несущие донорную и эффекторную плазмиды. Через 10 дней после исчезновения фонового флуоресцентного сигнала считывается процент клеток с EGFP вставкой, который соответствует проценту клеток успешно прошедших HDR с использованием донорной конструкции.

Были проведены первые эксперименты по считыванию эффективности редактирования, часть клеток была отобрана для проверки локализации EGFP сигнала методом конфокальной микроскопии. Для AAVS1 локуса было показано увеличение эффективности редактирования в 3-6 раз при использовании CtIP белка. Для LMNB1, ACTB, SEC61B, TUBA1B и GAPDH локусов была показана правильная локализация EGFP белка при использовании CtIP белка, что демонстрирует редактирование без сдвига рамки считывания

и случайного встраивания донорной последовательности в геном. В данный момент проводятся эксперименты для оценки эффективности редактирования при использовании i53 и PALB2 белков.

Иллюстрации

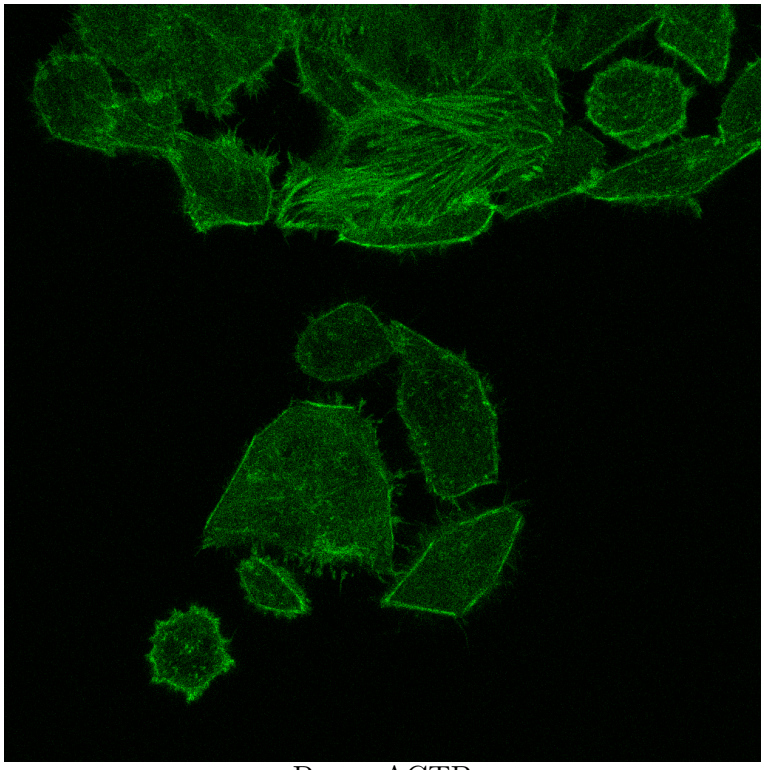

Рис. : ACTB

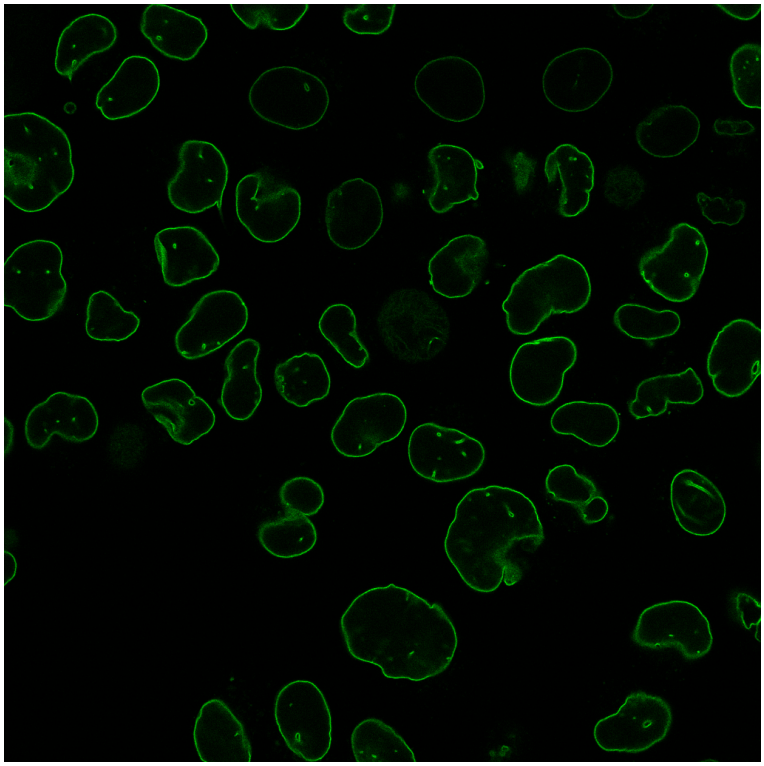

Рис. : LMNB1

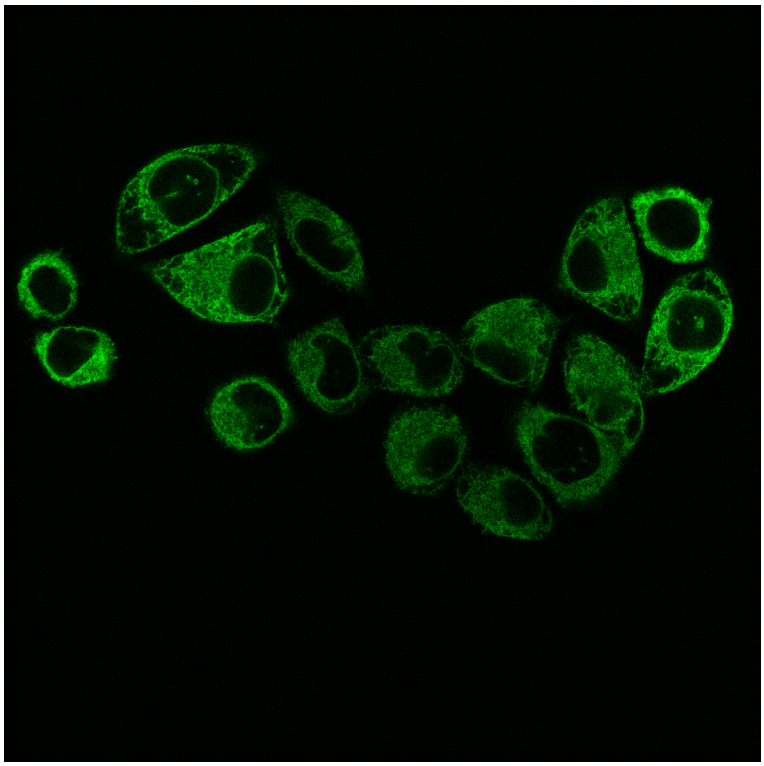

Рис. : SEC61B

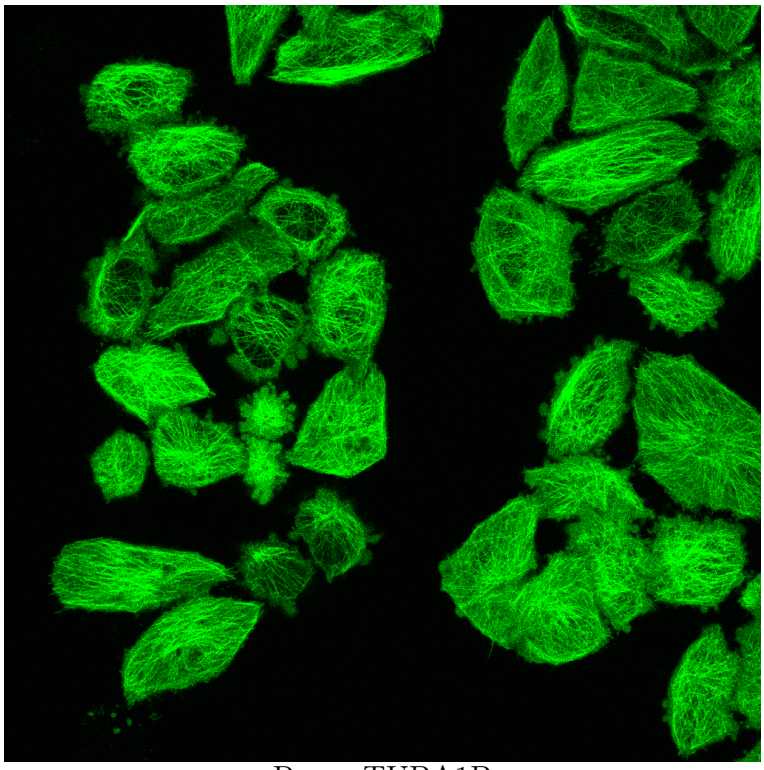

Рис. : TUBA1B

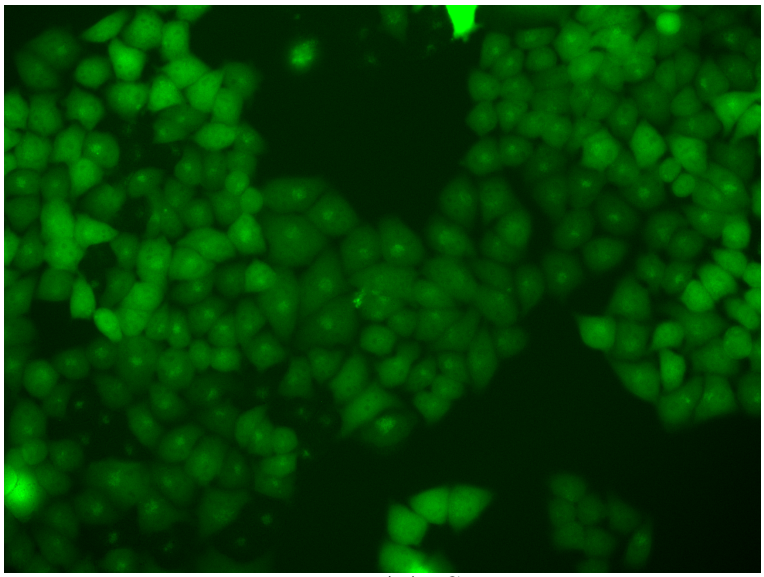

Рис. : AAVS1

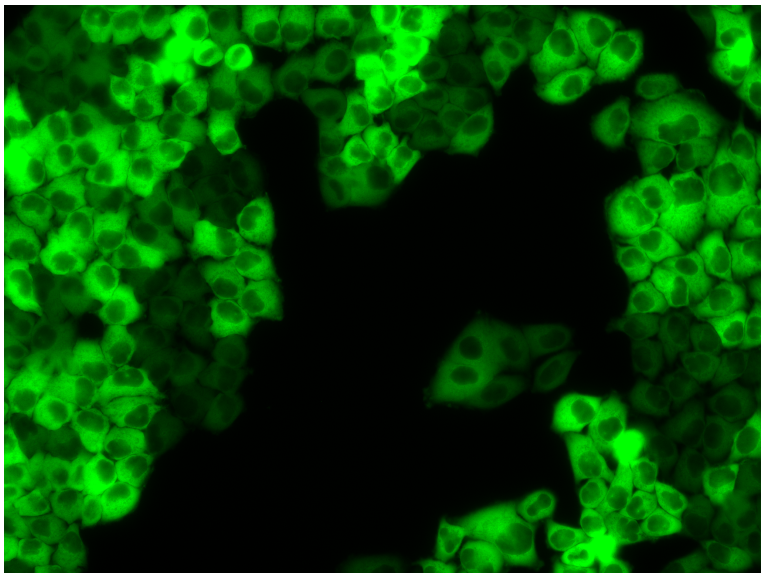

Рис. : GAPDH

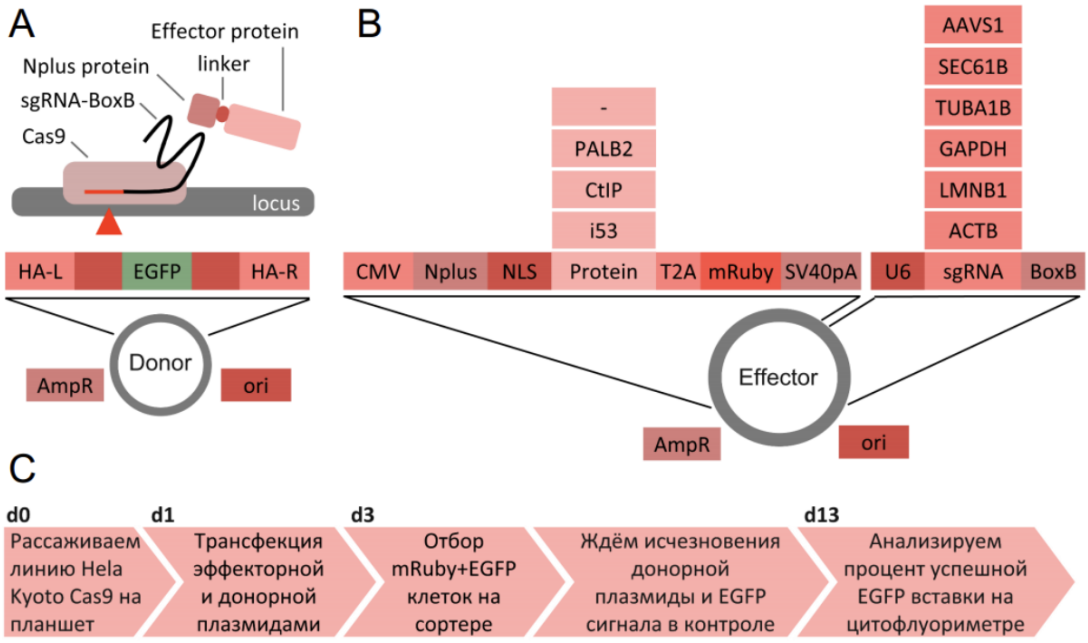

Рис. 2 Дизайн эксперимента по считыванию эффективности HDR.

Рис. : Дизайн эксперимента по считывания эффективности HDR.

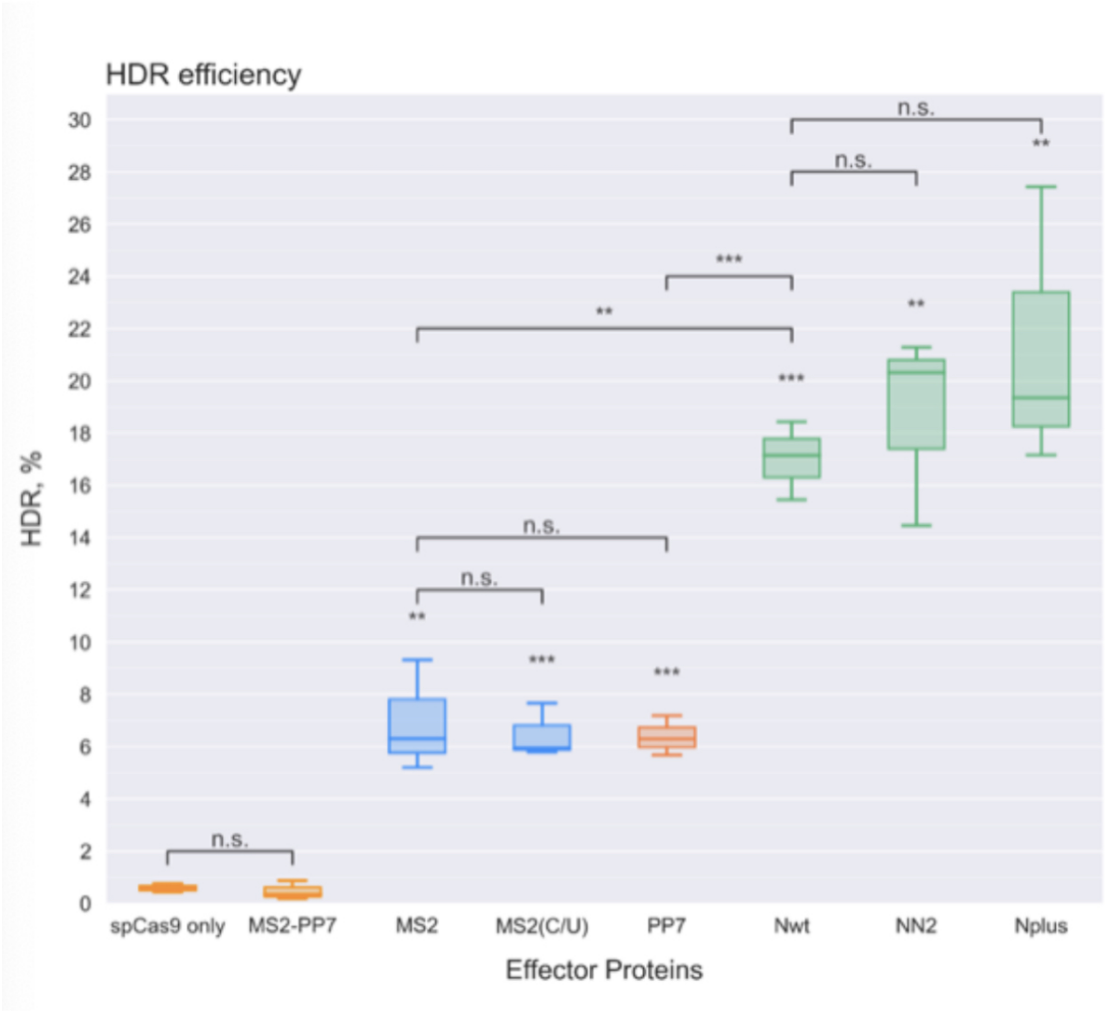

Рис. : Эффективность редактирования при использовании различных адаптерных систем для привлечения CtIP белка к месту разрыва.