

ФОТОРЕГУЛИРУЕМАЯ СИСТЕМА ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОБЛОКИРОВАННЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК

Агалакова Е.В.,^{1,2} Саковина Л.В.,² Новопашина Д.С.,^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

² Новосибирский государственный университет

Разработка подходов к контролируемому редактированию генов с использованием CRISPR/Cas9 системы, является актуальной задачей синтетической биологии и биоорганической химии. Эффекторные комплексы направляющих РНК crPHK/tracrPHK и белка Cas9 способны вносить двуцепочечные разрывы в определенные положения последовательности ДНК.

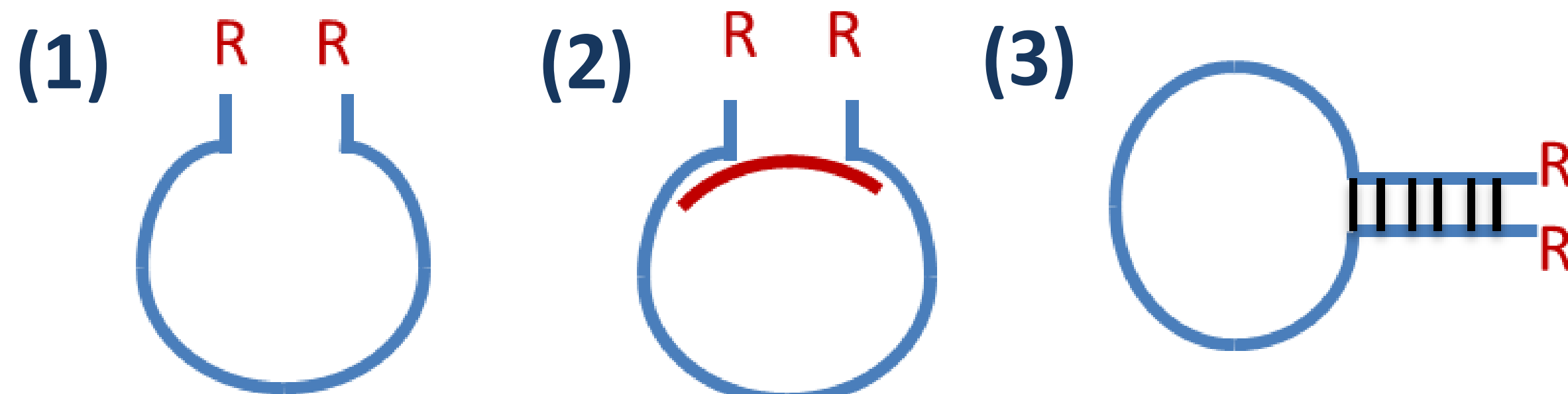
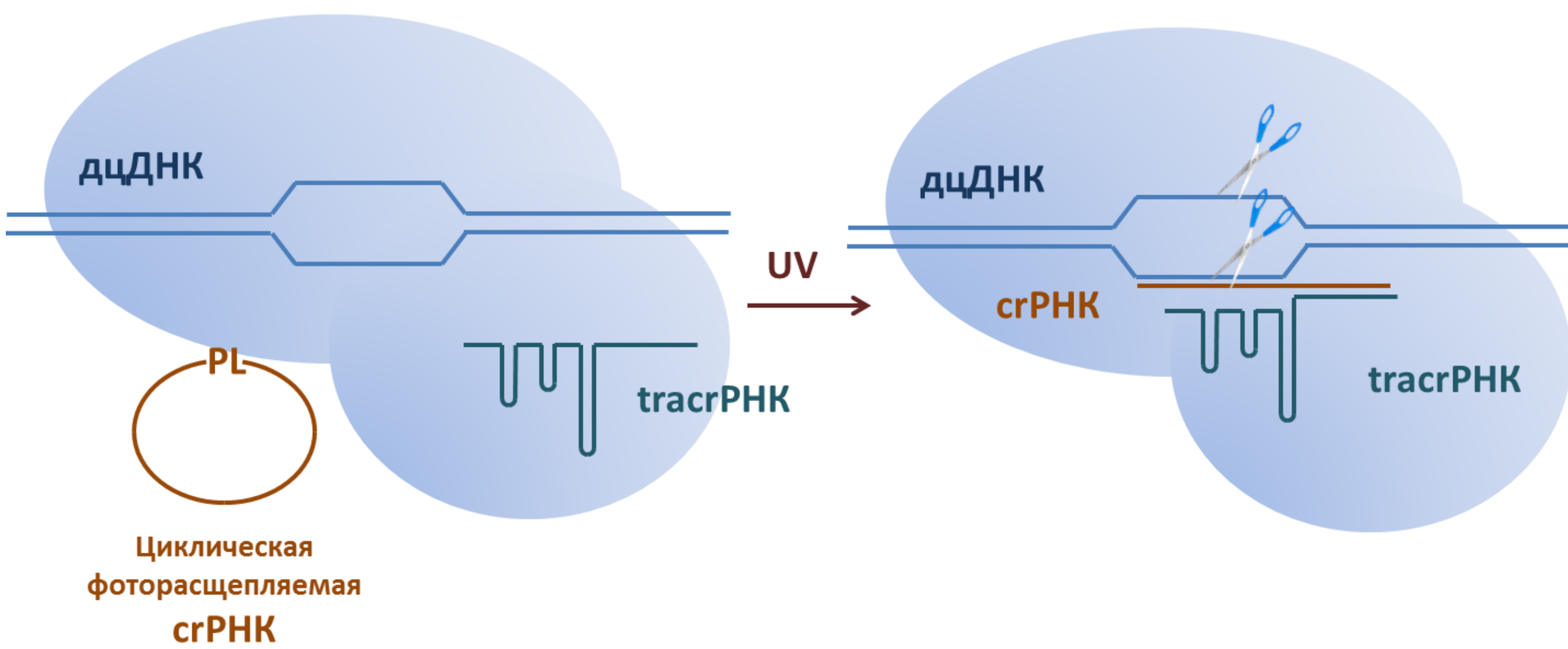
Использование фоточувствительных структур в составе олигонуклеотидных конструкций является одним из вариантов «контроля» за их активностью. Развитие химического синтеза фотомодифицированных олигонуклеотидов привело к созданию и интенсивному изучению молекулярно-биологических систем с использованием фотоблокированных конструкций, которые могут быть активированы путем облучения светом определенной длины волны [1,2].

Основной идеей данной работы является получение циклических направляющих РНК, входящих в состав системы CRISPR/Cas9 и содержащих фоторасщепляемый линкер. Такие направляющие РНК не активны вплоть до облучения, а в результате облучения фотолинкер расщепляется, направляющая РНК переходит в линейную форму, и система геномного редактирования активируется.

Была синтезирована серия crPHK, содержащих реакционноспособные группировки на 5'- и 3'-концах, а также фоторасщепляемый линкер, для получения циклических РНК.

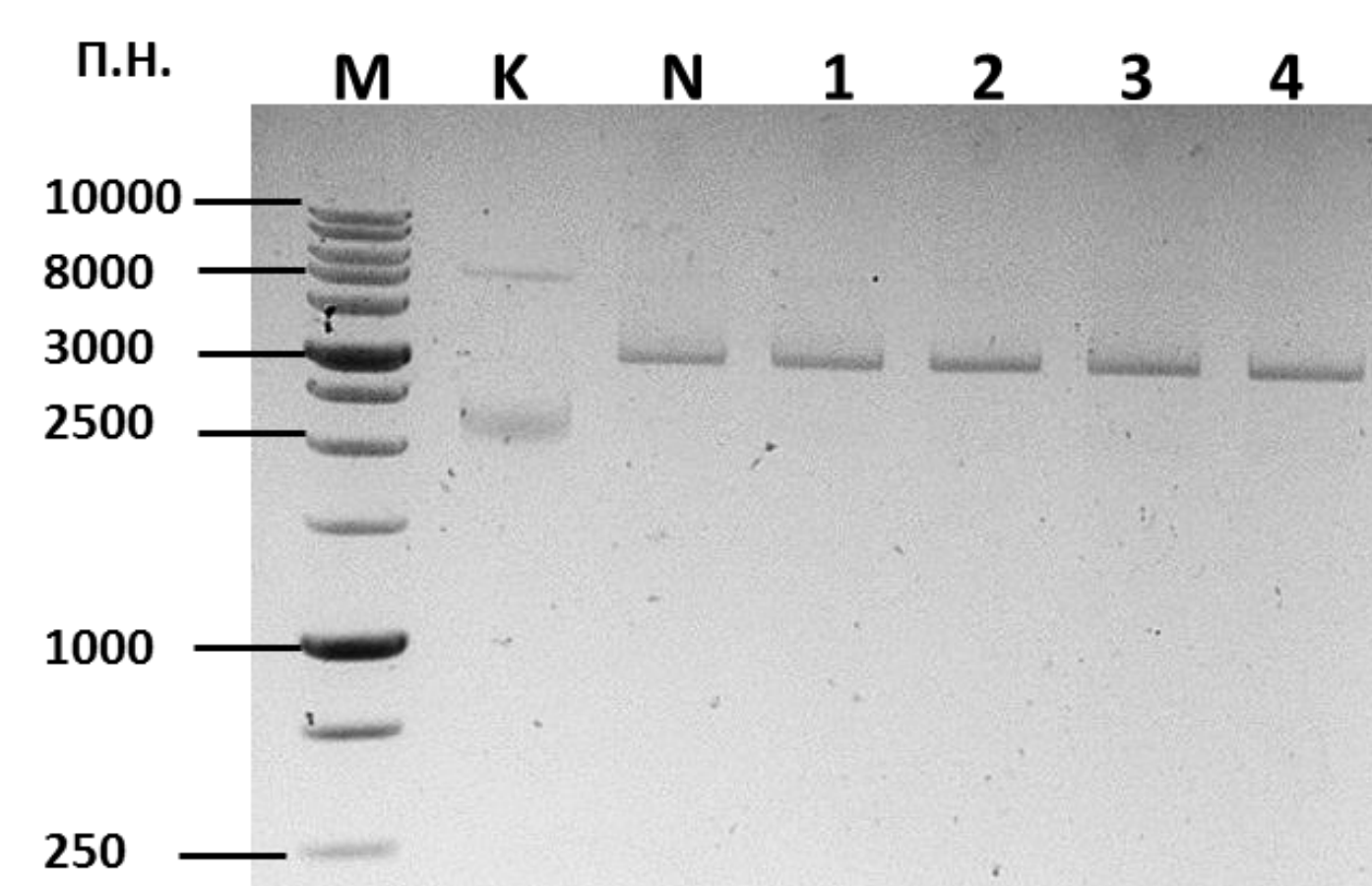
Шифр	Последовательность, 5'-3'
crRNA-NH ₂ -Alk	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -PL-AUAACUCAUUUGUAAAAAGUUUUU-GAGCUAUGCUGUUUUG-Alkine
crRNA-C6-NH ₂	5'-OH-PL-AUAACUCAUUUGUAAAAAGUUUUU-GAGCUAUGCUGUUUUG-(CH ₂) ₆ NH ₂
crRNA46	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AUAACUCAUUUGUAAAAAGUUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUGUUU-alkine
crRNA48	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AUAACUCAUUUGUAAAAAGUUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUGAGUUU-alkine

Использовали несколько стратегий для проведения реакции циклизации РНК: (1) - в отсутствие вспомогательных олигодехоксирибонуклеотидов, (2) - в присутствии вспомогательных олигодехоксирибонуклеотидов, комплементарных концам циклизуемой РНК, для сближения реакционноспособных групп в пространстве, (3) - изменение первичной последовательности crPHK с 5'-конца таким образом, чтобы 5'- и 3'- концы crPHK сближались за счет формирования дуплекса.



В результате циклизации образовывался продукт реакции с меньшей подвижностью в полиакриламидном геле, который выделяли и анализировали методом масс-спектрометрии. В первом и втором вариантах синтеза продукт циклизации содержал как моноциклические молекулы, так и цикл из двух сшитых crPHK. Варианты 2 и 3 позволяют получать в основном моноциклизированные РНК.

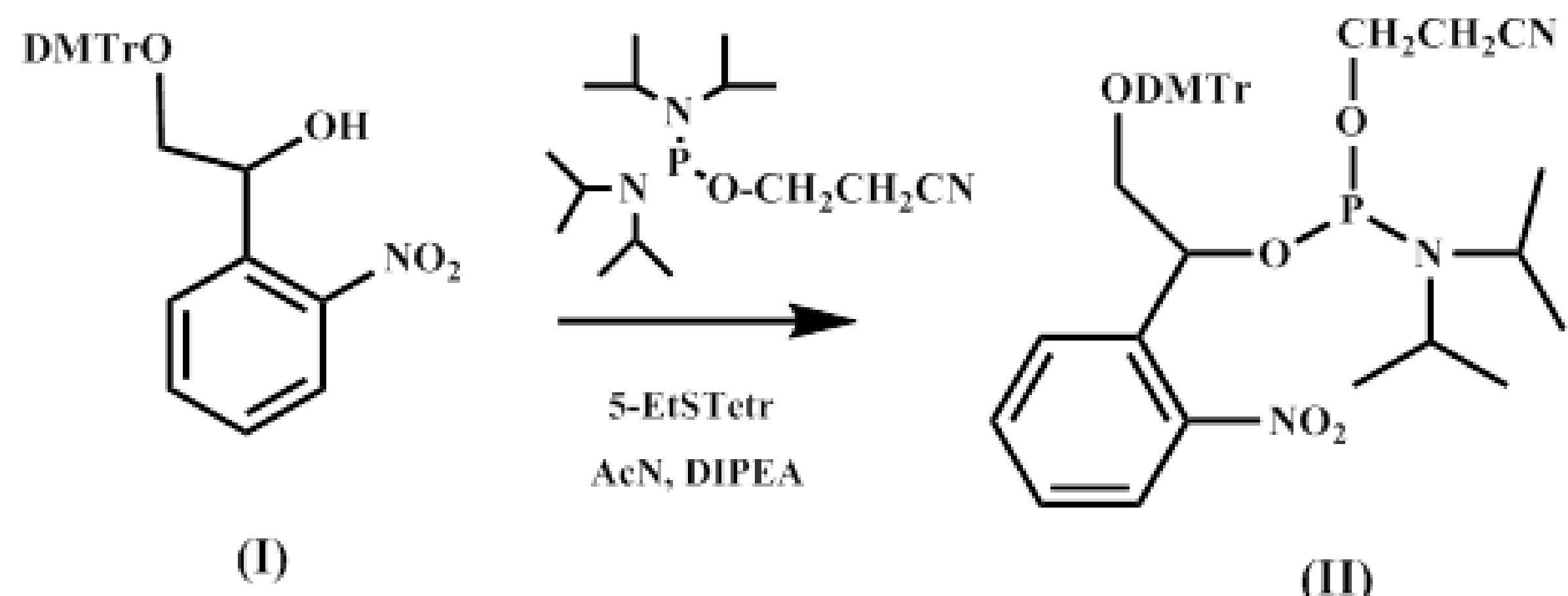
Проводили исследование эффективности работы CRISPR/Cas9 системы в модельной системе с использованием ДНК-плазмиды в качестве субстрата



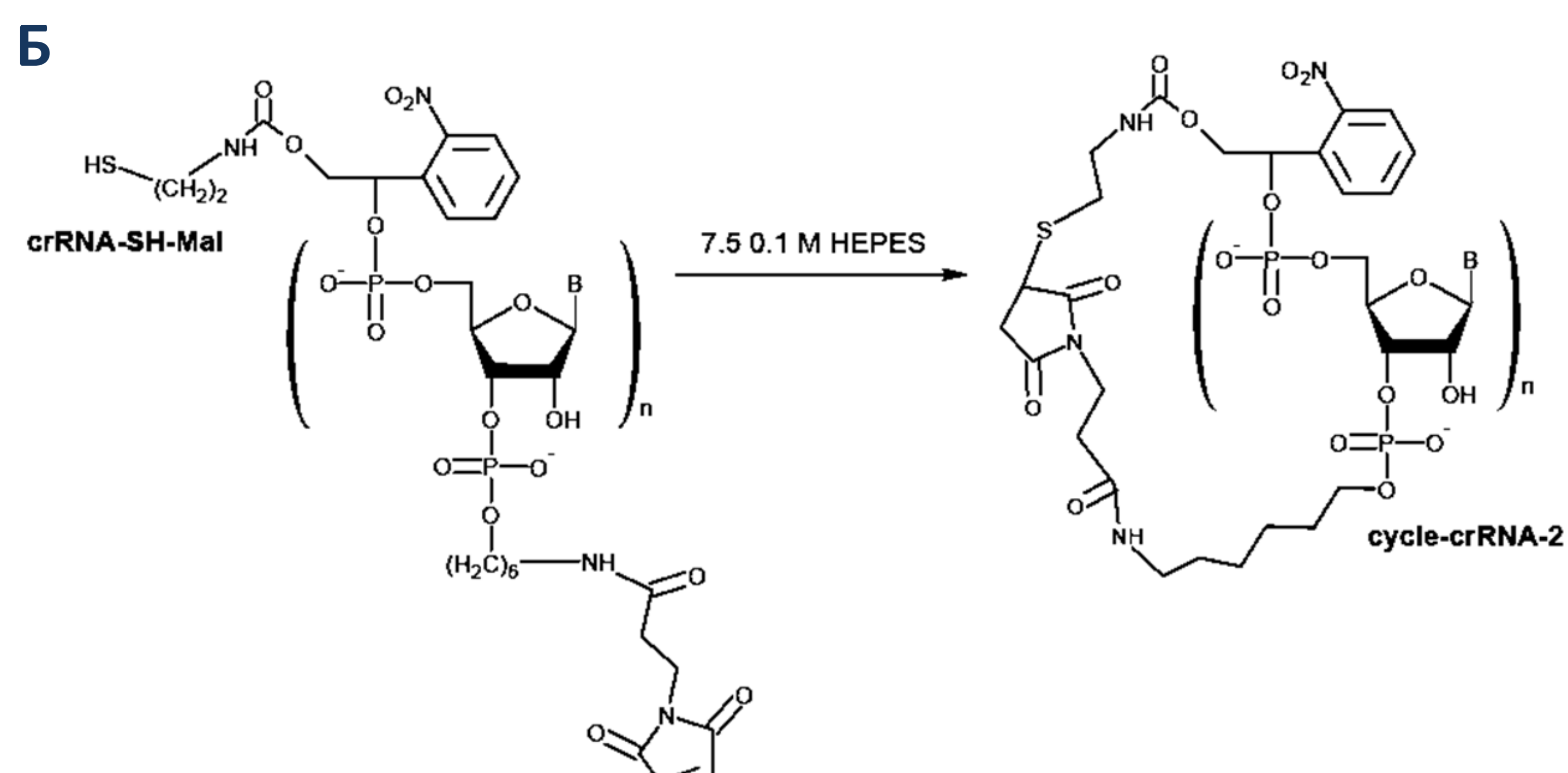
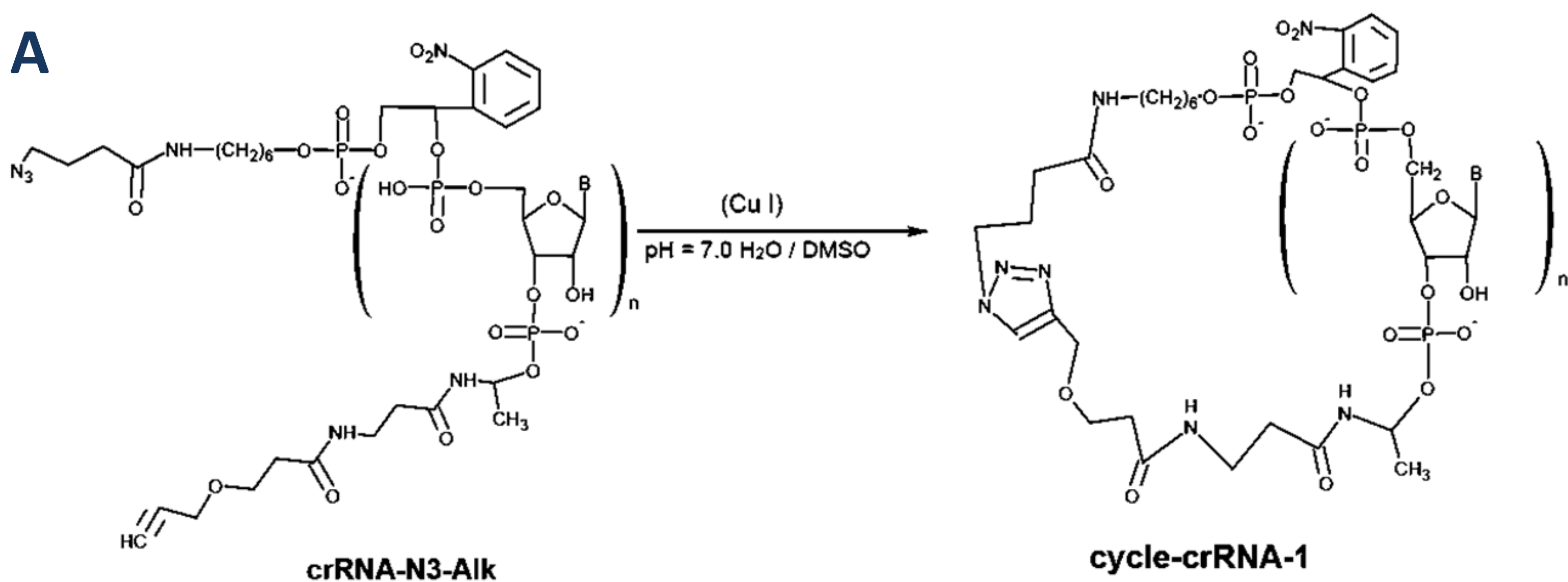
Электрофоретический анализ расщепления плазмиды. М – маркер длины дцДНК, К – контроль, содержащий исходную плазмиду, N – плазмиды после расщепления CRISPR/Cas9 системой, содержащей немодифицированную crPHK и tracrPHK, (1) – cycle-crRNA-1, полученная в присутствии дополнительного олигонуклеотида, до облучения; (2) – cycle-crRNA-1, полученная в присутствии дополнительного олигонуклеотида, после облучения на длине волны 365 нм в течение 30 мин; (3) – cycle-crRNA-1 до облучения; (4) – cycle-crRNA-1 – после облучения на длине волны 365 нм в течение 30 мин.

Агароза 1% в 20 мМ HEPES (pH 7.5), 100 мМ KCl, 1 мМ дитиотреит, 0.5 мМ Na2EDTA, 2 мМ MgCl2, 25% глицерина. Для сборки эффекторного комплекса в буфер добавляли 1.07 мкл cycle-crRNA-1 или cycle-crRNA-2 (4.2 мкМ, 4.5 пмоль) и 1.10 мкл tracrRNA (4.1 мкМ, 4.5 пмоль) и 2.01 мкл раствора белка Cas9 (2.24 мкМ, 4.5 пмоль) в 50-кратном избытке по отношению к дуплексу.

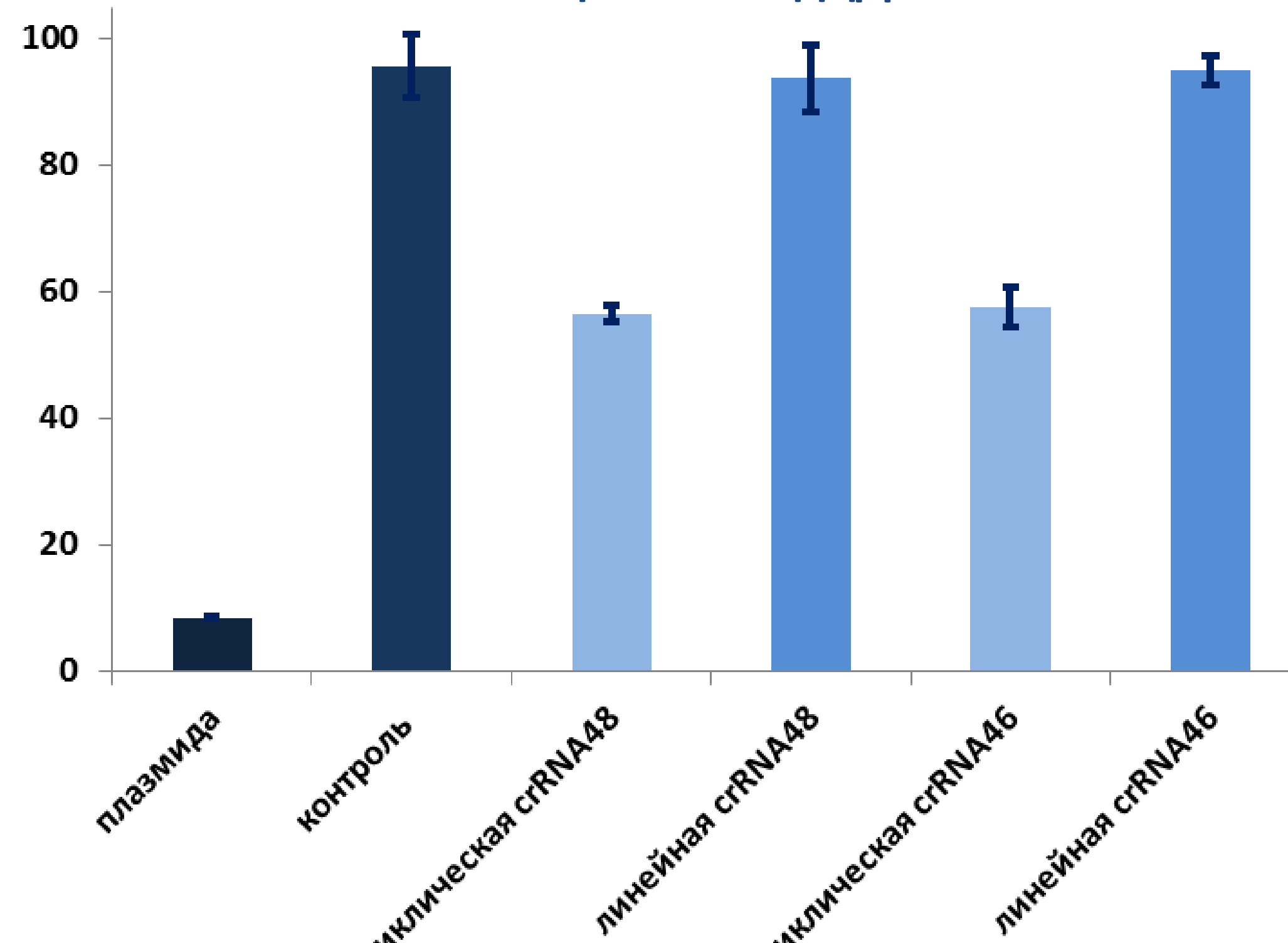
Для синтеза фотоблокированных циклических РНК были использованы фоторасщепляемые линкеры на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. Для их введения был синтезирован фосфитамидный синтон (II) на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола (PL) [1].



Для получения циклических олигорибонуклеотидов были использованы методы азид-алкинового циклоприсоединения (метод «клик»-химии) (А) и тиол-малеимидную конденсация (Б).



Расщепление дцДНК



При исследовании эффективности циклических crPHK, полученных с использованием подхода (3), в системе CRISPR/Cas9, было показано, что белок Cas9 в присутствии циклических crPHK значительно хуже расщепляет плазмидную ДНК, чем в присутствии их линейных аналогов.

Полученные результаты подтверждают перспективность предложенного подхода к созданию фотоактивируемых систем геномного редактирования с использованием фотоблокированных циклических направляющих РНК.

- Ахметова Е.А., Голышев В.М., Вохтанцев И.П., Венямина А.Г., Новопашина Д.С. Фотоактивируемая система CRISPR/CAS9. Биоорган. химия 2021. Т.47. №2. С.276-286.
- Semikolenova, O.; Sakovina, L.; Akhmetova, E.; Kim, D.; Vokhtantsev, I.; Golyshev, V.; Vorobyeva, M.; Novopashin, S.; Novopashina, D. Photoactivatable nanoCRISPR/Cas9 System Based on crRNA Reversibly Immobilized on Carbon Nanoparticles. Int. J. Mol. Sci. 2021, V.22. P.10919.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-04-00838.