

Регулируемое редактирование генома системой CRISPR/Cas9 с использованием фоточувствительных олигорибонуклеотидов

Научный руководитель – Новопашина Дарья Сергеевна

Хабардина Елизавета Анатольевна

Студент (магистр)

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия

E-mail: liza.khabardina@mail.ru

Актуальной задачей современной синтетической биологии является создание контролируемых молекулярно-биологических систем. Одним из вариантов «контроля» за активностью олигонуклеотидных конструкций в клетках является использование фотоактивируемых структур в их составе [1]. На сегодняшний день продемонстрирована возможность фоторегуляции активности siРНК, микроРНК, антисенс-олигонуклеотидов *in vitro* и *in vivo*. Для фотоактивации системы CRISPR/Cas предложен подход с использованием фоторасщепляемых олигонуклеотидов, блокирующих комплементарную sgРНК [2], а также подход с использованием белков, связанных с доменами Cas9 [3]. Основной идеей данной работы является создание направляющих РНК, содержащих фоточувствительные модификации, позволяющие в определенный момент инактивировать эту РНК облучением. Разрабатываемый нетривиальный подход к контролируемому редактированию генома может стать новым способом лечения генетических заболеваний, вызванных увеличением копий определенных генов.

Целью данной работы является дизайн, синтез и исследование в системе *in vitro* модифицированных синтетических направляющих РНК, содержащих фоторасщепляемые линкеры, для контролируемого редактирования генов в составе CRISPR/Cas9 системы. Такой вариант направляющих РНК позволяет выключить систему редактирования генома в определенный момент времени и достичь желаемого уровня редактирования фрагмента ДНК, нивелируя возможность взаимодействия с другими ДНК последовательностями.

С использованием специально синтезированного амидофосфитного синтона на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола были получены различные направляющие sgРНК и crРНК/tracrРНК, содержащие один или несколько фоторасщепляемых линкеров в различных положениях олигонуклеотидной цепи. Продемонстрирована возможность расщепления фоточувствительной направляющей РНК в растворе под действием УФ-облучения. Для полученных модифицированных РНК в комплексе с белком Cas9 исследована эффективность расщепления плазмидной дцДНК и 38-звенного флуоресцентно меченого дуплекса до и после облучения. Показана возможность выключения CRISPR/Cas9 системы путем облучения.

Полученные в работе результаты подтверждают перспективность предложенной стратегии создания фотоконтролируемой системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Фотоконтролируемая система может быть использована в дальнейшем для разработки новых подходов к лечению генетических заболеваний, в том числе, вызванных увеличением копий определенных генов.

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

Источники и литература

- 1) Ankenbruck N. et al. Optochemical control of biological processes in cells and animals // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018. №11(57). p. 2768-2798.

- 2) Jain P. K. et al. Development of light activated CRISPR using guide RNAs with photocleavable protectors // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016. №40(55). p. 12440-12444.
- 3) Nihongaki Y. et al. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing // *Nat. Biotechnol.* 2015. №7(33). p. 755-760.