

УДК 577.218

Редактирование жизненно важных генов с помощью системы CRISPR/Cas9 на модели дрозофилы

И. С. Осадчий, С. О. Камалян, К. Ю. Тумашова, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*E-mail: maksog@mail.ru

Поступила в редакцию 08.12.2022

Принята к печати 04.04.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11874

РЕФЕРАТ Система редактирования на основе CRISPR/Cas9 в последние годы стала основным инструментом манипуляций с геномами разных организмов. Однако при использовании данного метода исследователи часто сталкиваются с низкой эффективностью внесения изменений и с разрезами в нецелевых участках генома (off-target). Более того, редактирование жизненно важных генов часто заканчивается неудачей вследствие повышенной летальности при эффективном разрезании обоих аллелей гена интереса (ГИ). В статье предложена новая стратегия геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9-системы, основанная на том, что чем более важен ген для выживания организма, тем с меньшей эффективностью детектируются успешные случаи его редактирования и параллельно наблюдается все большее число разрезания нецелевых участков, что по сути является «ошибкой выжившего». В представленном методе в геном редактируемого организма предварительно вносят дополнительную копию ГИ, способную обеспечить уровень экспрессии гена, достаточный для выживания организма. Последующее применение CRISPR/Cas9-системы на фоне избыточной экспрессии ГИ позволило получить успешно отредактированные линии дрозофилы с делециями трех жизненно важных генов – *trf2*, *top1* и *top2*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА CRISPR/Cas9, редактирование генома, редактирование жизненно важных генов, гены домашнего хозяйства.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ гРНК – гидовая РНК; Xp – хромосома; TRF2 – родственный ТВР фактор 2 (ТВР related factor 2); Top2 – топоизомераза 2 (Topoisomerase 2); MEP-1 – взаимодействующие с MOG и эктопические P-гранулы (MOG interacting and ectopic P-granules).

ВВЕДЕНИЕ

Развитие системы CRISPR/Cas9 в качестве программируемого инструмента для внесения двухцепочечных разрывов в ДНК существенно расширило возможности исследования функций генов и регуляторных элементов генома. Наиболее широко CRISPR/Cas9-система используется для получения нокаута гена интереса (ГИ) за счет внесения разрывов, приводящих к сдвигу рамки считывания. Стоит отметить, что ГИ может быть жизненно важным и попытки получить его нокаут при помощи CRISPR/Cas9-системы часто оказываются безуспешными либо из-за летальности успешно отредактированных эмбрионов, либо за счет биологической пластичности – появления альтернативного старт-кодона, пропуска дефектного экзона и т.д. [1]. В представленной работе CRISPR/Cas9-система редактирования применена на фоне избыточной экс-

прессии ГИ, что позволило достаточно эффективно получить нокауты трех жизненно важных генов у дрозофилы. Похожий подход был недавно протестирован на клеточной линии человека НЕК293Т [2]. В настоящей работе нами осуществлено внесение достаточно протяженных делеций в кодирующие участки ГИ с сопутствующим встраиванием посадочной платформы, содержащей в своем составе участок для сайт-специфической рекомбинации, позволяющий быстро и эффективно встраивать модифицированные производные ГИ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Представленная стратегия дополняет методы, описанные в статьях [3–5], и подходит для повсеместно экспрессирующихся жизненно важных генов. Предложенный подход состоит из трех этапов (рис. 1):

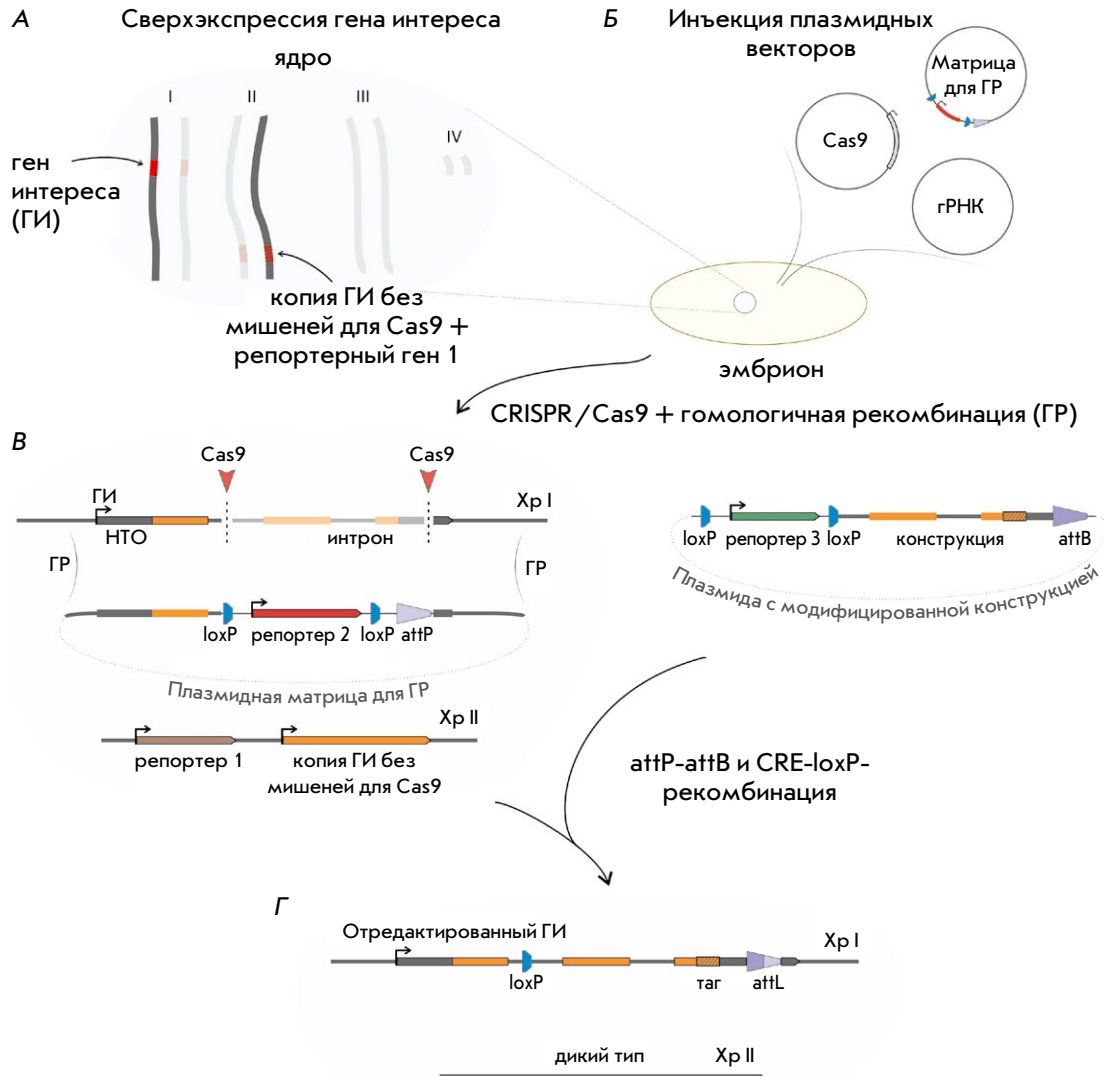


Рис. 1. Общая схема редактирования. А – вставка репортерного гена 1 (yellow) и копии гена интереса (ГИ), которая не содержит мишеней для CRISPR/Cas9-системы, в локус типа «тихая гавань» с помощью сайт-специфической рекомбинации. Б – микроинъекция эмбрионов матрицей для гомологичной рекомбинации (ГР) и плазмидами, экспрессирующими Cas9 и гРНК. В – внесение двухцепочечных разрывов в геномный участок интереса с помощью CRISPR/Cas9 и гомологичная рекомбинация с плазмидной матрицей, содержащей репортерный ген 2 (*mCherry*), окруженный loxP-сайтами, и attP-сайт. Г – интеграция модифицированной последовательности гена интереса с последующим CRE-опосредованным вырезанием репортерных генов 2 (*mCherry*) и 3 (*white*) и скрещивание для замены хромосомы с копией ГИ (Хр II) на хромосому дикого типа

1. Встраивание копии ГИ без узнаваемых системой CRISPR/Cas9 последовательностей вместе с репортерным геном 1 в локус без жизненно важных генов («тихая гавань») и находящийся на хромосоме, на которой не представлен нативный ГИ. На данном этапе получается спасающая линия с гетерологичной экспрессией копии ГИ. В настоящей работе для данного этапа созданы конструкции, содержащие последовательности, кодирующие белки TRF2, Top2 и MEP-1, под контролем промотора гена *Ubi-p63E* и гена *yellow* в качестве репортерного гена 1. Нокаут данных генов приводит к эмбриональ-

ной летальности. Конструкции встроены с помощью ФС31-опосредованной сайт-специфической рекомбинации в локусы 86Fb (TRF2, Top2) и 38D (MEP-1).

2. Замена протяженного участка кодирующей области нативного ГИ сайтом *attP* путем коинъекции трех плазмид, кодирующих белок Cas9 и гРНК, а также с матрицей для гомологичной рекомбинации, которая содержит сайт узнавания ФС31-интегразы *attP* и репортерный ген 2 (*mCherry*), окруженный сайтами loxP. На данном этапе получается линия с нокаутом ГИ на фоне экспрессии его копии. Для CRISPR/Cas9-опосредованного редакти-

рования ГИ использовали экспрессирующие Cas9 линии мух, полученные из депозитария Bloomington в Университете Индианы: BL54591 (Cas9 под контролем промотора *nanos*) и BL58492 (Cas9 под контролем промотора *Actin5C*). В альтернативном варианте в смесь для инъекции добавляли вектор, экспрессирующий Cas9 (Addgene #62209). CRISPR-мишени были выбраны с помощью инструмента fly CRISPR Optimal Target Finder (Университет Висконсина) [4] и клонированы в вектор на основе плазмиды pCFD4-U6:1_U6:3tandemgRNAs (Addgene #49411). Для делеции *trf2* использовали участки: гРНК1 (tctctgtagcactactcttagc), гРНК2 (tgcttttcgcttcgggtgtcc) и гРНК3 (accaagtagctagagactta); пара гРНК1/гРНК2 приводит к делеции геномного фрагмента размером 6.7 т.п.н., гРНК1/гРНК3 – 1.1 т.п.н. Для *mer-1* использовали гРНК1м (acgaacagcagggcgcgcgcg), гРНК2м (cagcaagtgcgctggcttg) и гРНК3м (aggggatcttcggcctcgca), приводящие к делеции 5.6 т.п.н. (гРНК1м/гРНК2м) и 2 т.п.н. (гРНК1м/гРНК3м). Для делеции *top2* использовали гРНК1т (gttcccagtagtagcacc) и гРНК2т (tctacggcgtgtcccgtt), приводящие к делеции 2 т.п.н.

Мух, полученных после инъекции (F0), индивидуально скрещивали с мухами линии y^1w^{1118} , и потенциальные события редактирования генома в потомстве (F1) выявляли с помощью флуоресценции mCherry. Правильность встраивания посадочной платформы (*attP*-mCherry) в геном проверяли с помощью ПЦР и секвенирования отредактированных участков генома.

3. Встройка в посадочную платформу модифицированных вариантов ГИ вместе с окруженным loxP-сайтами репортерным геном 3 (ген *white*). Встройка осуществляется за счет коинъекции содержащей *attB*-сайт конструкции и вспомогательной плазмиды с геном интегразы ϕ C31 (Addgene #26290). Репортерные гены 2 и 3 удаляли при помощи CRE-опосредованной сайт-специфической рекомбинации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

TRF2 – это паралог базального фактора транскрипции TBP, инактивация которого ассоциирована с эмбриональной летальностью [6, 7].

Ранее, несмотря на использование разных источников Cas9 (экспрессия с инъекированного в эмбрион плазмидного вектора или использование линии мух с конститутивной экспрессией Cas9) и двух комбинаций гРНК, нам не удалось заменить ген *trf2* на посадочную платформу для последующей сайт-специфической встройки мутантных вариантов гена [8]. Последовательность всего гена *trf2* составляет около 25 т.п.н., в то время как его кодирующая часть укладывается в 7 т.п.н. Используемые комбинации

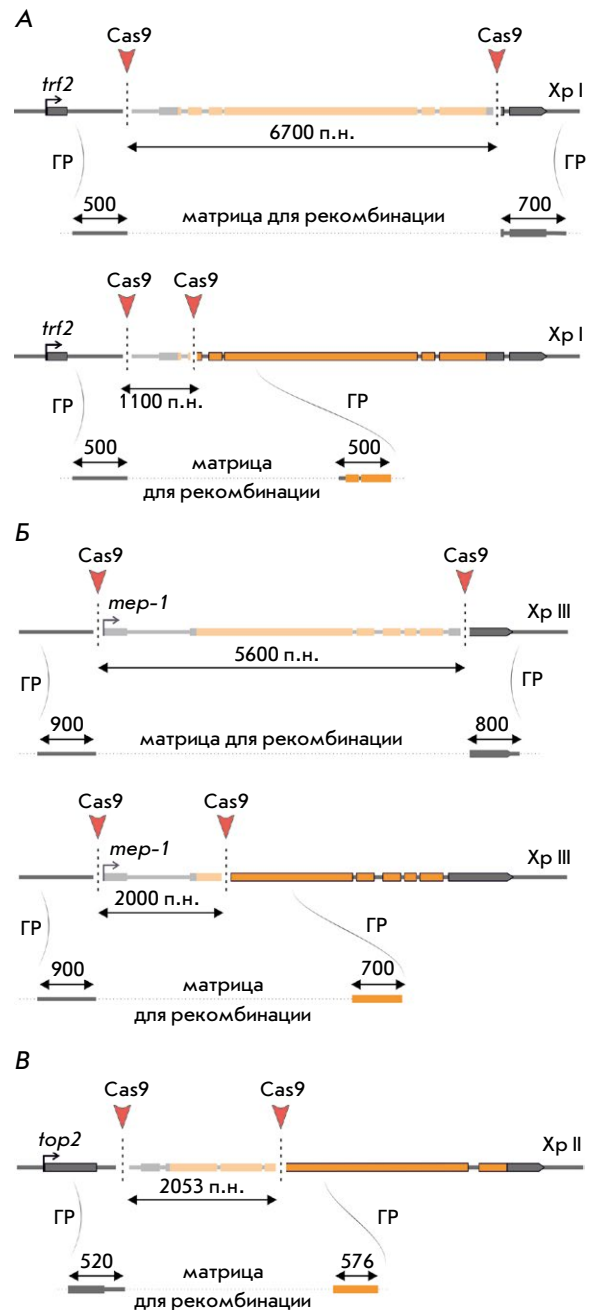


Рис. 2. Схемы замены ГИ – *trf2* (А), *mer-1* (Б), *top2* (В) – на посадочную платформу (*attP*-сайт и репортерный ген *mCherry*) при частичной или полноразмерной делеции

гРНК приводят к образованию двух двухцепочечных разрывов ДНК на расстоянии 6.7 или 1.1 т.п.н. для того, чтобы заменить всю кодирующую часть гена или участок, содержащий только старт-кодон, на платформу (рис. 2А).

Результаты, полученные при использовании разных схем замены гена *trf2* с помощью CRISPR/Cas9, показаны в табл. 1.

Таблица 1. Результаты микроинъекций смеси плазмид для замены гена на посадочную платформу для генов *trf2*, *mer-1* или *top2*

Линия мух	Источник Cas9	Делеция, п.н.	Инъецировано эмбрионов	Вылетело из куколок, F0	Линии F1 mCherry+	Нецелевые встройки	
TRF2	y ¹ w ¹¹¹⁸	Инъекция Cas9 вектора	6700	200	100	–	–
	54591	Cas9 под промотором <i>nanos</i>	6700	250	140	1	+
	58492	Cas9 под промотором <i>Actin5C</i>	6700	200	80	–	–
			1100	250	120	–	–
	y ¹ w ¹¹¹⁸ + сверхэкспрессия TRF2	Инъекция Cas9 вектора	6700	100	80	5	2
		1100	100	80	5	2	
MER-1	Инъекция Cas9 вектора	y ¹ w ¹¹¹⁸	2000	300	160	–	–
		y ¹ w ¹¹¹⁸ + сверхэкспрессия MER-1	5600	150	90	1	–
		5600	240	175	4	–	
TOP2	Инъекция Cas9 вектора	y ¹ w ¹¹¹⁸	2053	150	100	–	–
		y ¹ w ¹¹¹⁸ + сверхэкспрессия Top2	2053	150	80	3	–

Полученные после инъекции эмбрионы F0 без сверхэкспрессии *trf2* имели низкий уровень выживаемости. При этом экспрессия репортера *mCherry* в развивающихся особях варьировала по интенсивности от места инъекции по всему телу. Эмбрионы с наиболее ярким свечением *mCherry* погибали на последующих стадиях развития. В результате после скрещивания F0 с мухами дикого типа нами была получена только одна линия, которая имела вставку *attP*-сайта и репортерного гена *mCherry* по 5'-разрыву без удаления кодирующей части *trf2*.

Для того чтобы нивелировать эффект, связанный с высокой летальностью при делеции *trf2*, мы создали линию со сверхэкспрессией *trf2* посредством сайт-специфической встройки его короткой изоформы в линию мух, содержащую *attP*-сайт в локусе 86Fb.

Инъекция смеси плазмид для редактирования не приводила к снижению выживаемости эмбрионов со сверхэкспрессией *trf2*. В результате нами получено по пять линий со встройкой репортерного гена *mCherry* как для делеции размером 6.7 т.п.н., так и 1.1 т.п.н.

Дополнительно мы протестировали данный подход на двух других генах, *mer-1* и *top2*.

Белок MER-1 способствует привлечению комплекса ремоделирования хроматина и деацетилирования гистонов (dNuRD) к значительному числу промоторов [9, 10]. Белок MER-1 является важным регулятором раннего развития дрозофилы, и инак-

тивация гена *mer-1* приводит к эмбриональной летальности.

Как и в случае *trf2*, мы использовали две пары гРНК, производящих разрывы на расстоянии 5.6 и 2 т.п.н., для полноразмерной делеции и делеции только участка, содержащего старт-кодон, соответственно (рис. 2Б). Результаты, полученные при использовании разных схем замены гена *mer-1* с помощью CRISPR/Cas9, представлены в табл. 1.

При инъекции смеси плазмид для редактирования мухи без сверхэкспрессии *mer-1* имеют средний уровень летальности в течение развития. После индивидуальных скрещиваний мух F0 получена одна линия для полноразмерной делеции при использовании эмбрионов мух дикого типа и четыре линии на фоне сверхэкспрессии MER-1. Таким образом, делеция *mer-1* не является полностью летальной, однако, поскольку его сверхэкспрессия при делеции увеличивает выживаемость инъецированных эмбрионов, наблюдается увеличение эффективности редактирования.

Топоизомераза 2 (Top2) – фермент, снимающий топологическое напряжение с молекулы ДНК и способствующий поддержанию стабильности генома, участвует в ключевых клеточных процессах, таких, как репликация, транскрипция, рекомбинация [11].

Для замены участка гена *top2* на посадочную платформу были выбраны гРНК на расстоянии 2 т.п.н. в интроне 5'-нетранслируемой области и экзоне 3. Смесь векторов для замены гена на платформу инъецировали в эмбрионы линии y¹w¹¹¹⁸.

В потомстве от индивидуальных скрещиваний мух F0 с мухами дикого типа трансформантов не обнаружено. Однако при редактировании после встройки последовательности, кодирующей Top2, в локус 86Fb получены три линии (табл. 1).

Использование Cas9 для редактирования генома часто приводит к возникновению дополнительных мутаций в других генах. В этом случае экспрессия ГИ на другой хромосоме позволяет оценить наличие дополнительных нецелевых мутаций в линии, гомозиготной по делеции ГИ. С помощью такого скрининга можно отобрать линии дрозофилы, которые не содержат дополнительных нецелевых мутаций.

Полученные линии $\Delta trf2$, $\Delta mer-1$ или $\Delta top2$ летальны в гомозиготном состоянии без дополнитель-

ной введенной копии ГИ, что свидетельствует о необходимости продуктов этих генов для выживания и дает первичное подтверждение успешной замены гена на *attP*-платформу. Встройка восстанавливающих конструкций (кодирующих нативные варианты генов) в линии с соответствующими посадочными платформами с дальнейшим удалением репортерных генов приводила к восстановлению жизнеспособности мух в гомозиготном состоянии. Таким образом, получены платформы для трех генов дрозофилы, которые позволяют детально исследовать ключевые белки TRF2, Top2 и MEP-1. ●

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 19-74-30026.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smits A.H., Ziebell F., Joberty G., Zinn N., Mueller W.F., Clauder-Münster S., Eberhard D., Fälth Savitski M., Grandi P., Jakob P., et al. // *Nat. Methods*. 2019. V. 16. № 11. P. 1087–1093.
2. Wang B., Wang Z., Wang D., Zhang B., Ong S.G., Li M., Yu W., Wang Y. // *J. Biol. Eng. BioMed Central*. 2019. V. 13. № 1. P. 35.
3. Gratz S.J., Ukken F.P., Rubinstein C.D., Thiede G., Donohue L.K., Cummings A.M., O'Connor-Giles K.M. // *Genetics*. 2014. V. 196. № 4. P. 961–971.
4. Zolotarev N., Georgiev P., Maksimenko O. // *Biotechniques. Future Science*. 2019. V. 66. № 4. P. 198–201.
5. Bischof J., Maeda R.K., Hediger M., Karch F., Basler K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 9. P. 3312–3317.
6. Kedmi A., Zehavi Y., Glick Y., Orenstein Y., Ideses D., Wachtel C., Doniger T., Waldman Ben-Asher H., Muster N., Thompson J., et al. // *Genes Dev*. 2014. V. 28. № 19. P. 2163–2174.
7. Duttke S.H.C. // *Trends Biochem. Sci*. 2015. V. 40. № 3. P. 127–129.
8. Osadchiy I.S., Georgiev P.G., Maksimenko O.G. // *Dokl. Biochem. Biophys*. 2019. V. 486. № 1. P. 224–228.
9. Reddy B.A., Bajpe P.K., Bassett A., Moshkin Y.M., Kozhevnikova E., Bezstarosti K., Demmers J.A., Travers A.A., Verrijzer C.P. // *Mol. Cell. Biol. Am. Soc. Microbiol*. 2010. V. 30. № 21. P. 5234–5244.
10. Kunert N., Wagner E., Murawska M., Klinker H., Kremmer E., Brehm A. // *EMBO J*. 2009. V. 28. № 5. P. 533–544.
11. Sutormin D.A., Galivondzhyan A.K., Polkhovskiy A.V., Kamalyan S.O., Severinov K.V., Dubiley S.A. // *Acta Naturae*. 2021. V. 13. № 1. P. 59–75.