

**Влияние неполной комплементарности между направляющей РНК и целевой последовательностью в геноме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на работу редактирующего комплекса sgRNA/Cas9**

**Научный руководитель – Степченкова Елена Игоревна**

*Девяткин Дмитрий Михайлович*

*Аспирант*

Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет,  
Санкт-Петербург, Россия  
*E-mail: dimi02121@gmail.com*

Методы геномного редактирования на основе CRISPR/Cas9 перспективны для медицины и биологии, но несут риски, поскольку комплекс sgRNA/Cas9 может вызывать нежелательные мутации в нецелевых участках генома, провоцируя серьезные негативные эффекты. Причина заключается в наличии в геноме последовательностей, частично или полностью идентичных целевому сайту. При этом вклад неспаренностей в каждой из 20 позиций в нецелевую активность в одинаковых физиологических условиях ранее детально не изучался.

Целью работы является изучение влияния неполного соответствия спейсерной последовательности sgRNA и целевого сайта генома на активность Cas9 в дрожжевой модели *Saccharomyces cerevisiae*. В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Создать библиотеку плазмид, кодирующих sgRNA с одиночными заменами в спейсерном участке.

2. Количественно оценить влияние неспаренностей в различных позициях sgRNA на активность внесения комплексом sgRNA/Cas9 двуцепочечного разрыва, а также на частоту его мутагенной репарации.

В работе использовали штамм дрожжей *S. cerevisiae* LAN201 [1]. В качестве мишени для редактирования был выбран сайт в гене *URA3*. Для доставки редактирующего комплекса в клетки дрожжей использовали плазмиду pML107-GAL1 [2], экспрессирующую ген *Cas9* под контролем промотора, индуцируемого галактозой. Эту плазмиду (сокращённо Cas9) использовали для создания библиотеки плазмид, кодирующих sgRNA с одиночными заменами в спейсерном участке (G20C, A19T и т.д.), а также sgRNA, полностью комплементарную целевому сайту (PC).

Активность редактирующего комплекса оценивали по токсичности эндонуклеазы Cas9 для дрожжевых клеток: чем выше частота двуцепочечных разрывов в целевом сайте, тем ниже выживаемость трансформантов плазмидой с CRISPR/Cas9. Частоту мутагенной репарации оценивали по доле мутантов с фенотипом  $Ura^-$  среди трансформантов.

Оценка влияния неспаренностей в различных позициях sgRNA на эффективность Cas9 показала, что замены нуклеотидов в позициях 19 и 20 практически не оказывают влияния на активность Cas9, в то время как замены в позициях 7, 9 и 16 приводят к максимальному снижению активности фермента. В то же время, частота мутагенной репарации для некоторых позиций, неспаренности в которых похожим образом влияют на активность, значительно отличалась. По все видимости, на итоговую эффективность редактирования оказывают дополнительное влияние другие факторы, такие как точность репарации.

Таким образом, проведённое исследование является важным шагом в решении проблемы нецелевой активности CRISPR/Cas9 и открывает перспективы для совершенствования инструментов геномного редактирования.

**Источники и литература**

- 1) Lada AG, et al. Genome-wide mutation avalanches induced in diploid yeast cells by a base analog or an APOBEC deaminase. PLoS genetics. 2013. Т. 9. №. 9. С. e1003736
- 2) Laughery MF, Wyrick JJ. Simple CRISPR/Cas9 genome editing in Saccharomyces cerevisiae. Current protocols in molecular biology. 2019. Т. 129. №. 1. С. e110.