

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS

Сизова Ирина Алексеевна

ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ
«Курчатовский институт»; Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Россия,
Ленинградская обл., г. Гатчина
sizova_ia@pnpi.nrcki.ru, irinasiz2012@gmail.com

Одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* (хламидомонада) – популярный модельный организм для изучения ключевых биологических процессов, включая фотосинтез, структуру и функции сенсорных фоторецепторов, фотоповедение, организацию и функционирование жгутиков, реакции на стресс. Быстрый рост, простота культивирования и безопасность для человека делают эту микроводоросль привлекательным объектом биотехнологии, пригодным для получения белково-витаминных добавок, фармакологических препаратов, биотоплива и др. Достижения последних лет в области метаболической инженерии и синтетической биологии существенно расширили возможности использования клеток хламидомонады в качестве «зеленых фабрик». Созданы эффективные системы трансформации по ядерному и хлоропластному геному, сконструированы мутантные штаммы, обеспечивающие эффективную и стабильную экспрессию трансгенов, создан метод модульной сборки, пригодный для быстрой сборки векторных конструкций из готовых генетических частей, а также адаптированы протоколы редактирования генома с использованием технологии CRISPR/Cas. По указанной технологии для получения нуль-мутантов по ядерным генам, не имеющим селективируемого фенотипа, проводится трансформация водоросли с использованием комплексов, образованных эндонуклеазой Cas9 и направляющей РНК (Cas9/gRNA), в сопровождении селективных маркерных ДНК для отбора трансформантов. Трансформация проводится посредством электропорации. Несмотря на усовершенствования, эффективность CRISPR/Cas мутагенеза у *Chlamydomonas* остается низкой. Результаты эксперимента зависят не только от эндонуклеазой активности рибонуклеопротеиновых комплексов, но и во многом определяются условиями электропорации. Ранее с использованием разработанных нами протоколов для электропоратора NEPA21, который способен создавать комплексные электрические импульсы, мы инактивировали более 30 ядерных генов, включая гены репарации ДНК. Нокаут генов был результатом генных модификации, вставок и делеций ДНК, произошедших по месту двухцепочечного разрыва ДНК (ДЦР), внесенного комплексом Cas9/gRNA. Указанные модификации наблюдались у 10–20 % клонов, отобранных на селективной среде. Для выяснения путей репарации и выбора оптимальных реципиентов для CRISPR/Cas мутагенеза, мы проанализировали сайт-направленный мутагенез у нуль-мутантов по генам репарации *KU80*, *KU70*, *POLQ* при внесении в клетку донорных ДНК различного типа и без донорной ДНК. Полученные результаты показали, что у *Chlamydomonas* ДНК полимеразы *POLQ* ответственна за сайт-направленный мутагенез и репарацию ДЦР, внесенных Cas9/gRNA. При этом нуль-мутанты *ku80* могут служить в качестве эффективных реципиентов при проведении нокаута ядерных генов, если одноцепочечные олигонуклеотиды применяются в качестве донорной ДНК. В настоящее время мы проводим адаптацию методологии Cas9/gRNA к использованию на более простой модели электропоратора Gene Pulser Xcell, которая доступна во многих лабораториях. Мы предполагаем, что наши результаты будут полезны для дальнейшего развития технологии редактирования генов у растений и биотехнологии микроводорослей.

Работа поддержана Курчатовским геномным центром – ПИЯФ по программе «Курчатовский геномный центр – ПИЯФ» (соглашение №. 075-15-2019-1663).

Ключевые слова: *Chlamydomonas*, микроводоросли, CRISPR/Cas технология, редактирование генома

GenBio2022: III Международная научно-практическая конференция

«Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений»

GENOME EDITING OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* MICROALGAE USING CRISPR/CAS TECHNOLOGY

Sizova Irina Alekseevna

Federal State Budgetary Institution "Petersburg Institute of Nuclear Physics named after A.I. B.P. Konstantinov NRC "Kurchatov Institute"; Kurchatov Genomic Center - PNPI, Russia, Leningrad region, Gatchina
sizova_ia@pnpi.nrcki.ru, irinasiz2012@gmail.com

The unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonas*) is a popular model organism for study of key biological processes, including photosynthesis, the structure and function of sensory photoreceptors, photobehavior, the organization and functioning of flagella, and reactions to stress. Rapid growth, ease of cultivation and safety for humans make this microalga an attractive object of biotechnology, suitable for obtaining protein and vitamin supplements, pharmacological preparations, biofuels, etc. The achievements of recent years in the field of metabolic engineering and synthetic biology have significantly expanded the possibilities of using *Chlamydomonas* cells as "green factories. Efficient transformation systems for the nuclear and chloroplast genomes have been created, mutant strains have been designed that provide efficient and stable expression of transgenes, a modular assembly method has been developed suitable for the rapid assembly of vector constructs from ready-made genetic parts, and CRISPR/Cas genome editing protocols have been adapted. According to CRISPR/Cas technology, to obtain null mutants for nuclear genes that do not have a selectable phenotype, *Chlamydomonas* cells are transformed with the use of complexes formed by the Cas9 endonuclease and guide RNA (Cas9/gRNA), accompanied by selective marker DNA for the selection of transformants. Transformation is carried out by electroporation. Despite improvements, the efficiency of CRISPR/Cas mutagenesis in *Chlamydomonas* remains low. The results of the transformation experiments depend not only on the endonuclease activity of ribonucleoprotein complexes, but are also largely determined by the conditions of electroporation. We have previously inactivated more than 30 nuclear genes, including DNA repair genes, using our protocols for the advanced NEPA21 electroporator, which is capable of generating complex electrical impulses. The gene knockout was the result of gene modifications, insertions and deletions of DNA that occurred at the site of a DNA double-strand break (DSB) introduced by the Cas9/gRNA complex. These modifications were found in 10–20 % of selected clones. To elucidate repair pathways and choose optimal recipients for CRISPR/Cas mutagenesis, we analyzed site-directed mutagenesis in the *ku80*, *ku70*, *polQ* null mutants that contained the inactivated repair genes with the use of various types of donor DNA and without donor DNA. Our results showed that in *Chlamydomonas* DNA polymerase POLQ is responsible for site-directed mutagenesis and repair of DSBs introduced by Cas9/gRNA. At the same time, *ku80* null mutants can serve as effective recipients for nuclear gene knockout if single-stranded oligonucleotides are used as donor DNA. We are currently adapting the Cas9/gRNA methodology for the use with a simpler model of the Gene Pulser Xcell electroporator, which is available in many laboratories. We anticipate that our results will be useful for the further development of plant gene editing technology and microalgae biotechnology.

The work was supported by the Kurchatov Genomic Center – PNPI under the program "Kurchatov Genomic Center - PNPI" (agreement No. 075-15-2019-1663).

Keywords: *Chlamydomonas*, microalgae, CRISPR/Cas technology, genome editing.