

Потенциал модифицированных каталитически неактивных эндонуклеаз Cas9 для прижизненной визуализации локусов ДНК

Г.А. Абушинова^{1*}, В.В. Жердева², Л.Г. Малошенок^{1**}

¹ Институт общей генетики РАН, Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

* gerelabushinova@yandex.ru

** maloshenoklg@gmail.com

Ключевые слова: dCas9-ортологи; флуоресцентные белки; прижизненная визуализация; FRET; sgRNA

Potential of modified catalytically inactive Cas9 endonucleases for intravital imaging of DNA loci

G.A. Abushinova^{1*}, V.V. Zherdeva², L.G. Maloshenok^{1**}

¹ Institute of general genetics RAS, Moscow, Russia

² Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the RAS, Moscow, Russia

* gerelabushinova@yandex.ru

** maloshenoklg@gmail.com

Key words: dCas9 orthologs; fluorescent proteins; live-cell imaging; FRET; sgRNA

Существующие методы, основанные на фиксации клеток и сшивке ДНК, позволяют определить пространственное расположение геномных локусов, но не дают возможности отслеживать их динамику в живых клетках. Мы разработали альтернативный подход на основе dCas9-FP, для прижизненной визуализации и оценки расстояния между локусами методом FRET. Созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие гены различных ортологов dCas9 (*S. pyogenes*, *N. meningitidis*, *S. thermophilus*), связанные через линкер с FP под управлением индуцибельного промотора, что снижало цито- и фототоксичность. Выбор флуоресцентных белков базировался на их биофизических свойствах для формирования донор-акцепторных FRET-пар. Также были созданы конструкции sgRNA для мечения последовательностей с различным числом повторов: теломеры (>500 повторов), а также амплифицированные онкогены MUC4 и EGFR (~90 повторов). В клеточной линии MNNGHOS получены стабильные клоны, экспрессирующие пары и одиночные варианты dCas9-FP. Скорость формирования химерных белков, их фолдинг, ядерный импорт и субклеточное распределение существенно различались в зависимости от комбинации флуоресцентного белка и ортолога dCas9. В ряде случаев медленный фолдинг или задержка ядерного транспорта вызывали дисбаланс уровней донора и акцептора, что снижало эффективность FRET-системы. Анализ времени жизни флуоресценции выявил наиболее эффективные FRET-пары: EGFP/mCherry, mNeonGreen/mCherry и mClover3/mRuby3. При таргетировании обеих химер на теломерные последовательности время жизни донора изменялось в широком диапазоне: от значений, характерных для FRET-взаимодействия, до контрольных значений без FRET. Эти данные подтверждают возможность прижизненной регистрации пространственной близости локусов.

Финансирование: грант РНФ No. 22-14-00205 и государственное задание ИОГен РАН «Изучение генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека», No. 125040704886-1.