

Нуклеаза Cas12f1 как перспективный инструмент для направленных геномных интеграций

А.Д. Золотаренко, В.В. Шептий, С.А. Брускин*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

* *brouskin@vigg.ru*

Ключевые слова: Cas12f1; геномное редактирование; HDR; направленная интеграция

Cas12f1 nuclease: a versatile platform for targeted genomic integrations

A.D. Zolotarev, V.V. Sheptiy, S.A. Bruskin*

Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

* *brouskin@vigg.ru*

Key words: Cas12f1; genome editing; HDR; targeted integration

Одной из наиболее важных задач в геномном редактировании является внесение нужных последовательностей ДНК в целевые сайты генома. Нуклеазы CRISPR/Cas, генерирующие липкие концы, обеспечивают высокоточную вставку ДНК за счет направленной комплементарности. В отличие от Cas9, образующей при редактировании тупые концы, ферменты типа Cas12a/Cas12f образуют 5'-липкие концы с выступающими одноцепочечными участками длиной 4-7 пн. Это увеличивает эффективность гомологично-зависимой репарации (HDR) в 3–5 раз и снижает нецелевые вставки, основанные на негомولوجичном восстановлении концов. Применение таких систем позволяет осуществлять бесшовное слияние фрагментов ДНК без применения дополнительных линкеров, собирать сложные кассеты в безопасных локусах (AAVS1) с высокой эффективностью, интегрировать трансгены с высокой точностью при создании CAR-T-клеток.

В данной работе оценивался потенциал компактной нуклеазы Cas12f1, образующей при редактировании липкие концы, для интеграции коротких либо протяженных донорных матриц. Преимуществом данной нуклеазы по сравнению с другими является ее небольшой размер, который позволяет осуществлять ее упаковку в AAV частицы.

В работе были созданы два варианта конструкций: небольшие доноры с липкими концами с плечами гомологии в 5 пн либо кассеты, кодирующие ген флуоресцентного белка, с плечами гомологии размером 400 пн. Эксперименты на клетках HEK293 по редактированию нуклеазой Cas12f1 в присутствии донорных матриц показали эффективную интеграцию как небольших, так и протяженных последовательностей, что подтверждалось микроскопией, ПЦР и ПЦР в реальном времени. Анализ эффективности интеграций небольших доноров путем высокопроизводительного секвенирования ампликонов (Ampliseq) показал, что их интеграция в целевые сайты происходила с высокой точностью.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о возможности применения нуклеазы Cas12f1 для решения различных задач молекулярной биологии и генной терапии: от коррекции точечных повреждений ДНК до интеграции протяженных терапевтических кассет.

Финансирование: Исследование проведено в рамках государственного задания ИОГен РАН «Изучение генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека», № 125040704886-1.