

Система с глубоким подавлением базальной транскрипции и активацией экспрессии с помощью системы CRISPR-Cas9

П.А. Бобровский*, В.А. Манувера, Е.Н. Графская, К.А. Бровина, М.Ю. Серебренникова, Д.Д. Харлампиева, В.Н. Лазарев

*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия*

* *pbobrovskiy@gmail.com*

Ключевые слова: CRISPR-Cas9; транскрипция; терминатор; экспрессия

Expression system with deep transcriptional repression and CRISPR-Cas9-mediated activation

P.A. Bobrovsky*, V.A. Manuvera, E.N. Graftskaia, D.D. Kharlampieva, K.A. Brovina, M.Y. Serebrennikova, V.N. Lazarev

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

* *pbobrovskiy@gmail.com*

Key words: CRISPR-Cas9; transcription; terminator; expression

Проблема экспрессии генов, кодирующих токсичные белки в бактериальных системах, давно волнует научное сообщество – даже минимальная базальная экспрессия таких генов может приводить к ингибированию роста клеток или их гибели. Традиционные подходы, включающие использование усиленных промоторов, дополнительных репрессорных систем или плазмид с регулируемой копийностью, не обеспечивают необходимого уровня репрессии базальной транскрипции. В рамках данного проекта была разработана альтернативная стратегия, основанная на регуляции длины транскрипта. В 5'-нетранслируемую область целевого гена встроены терминаторы транскрипции, приводящие к преждевременной терминации и образованию нефункциональных РНК. Ключевой особенностью метода является использование CRISPR-Cas9 для точного вырезания терминаторной последовательности, что позволяет восстановить экспрессию целевого гена. Наиболее эффективным оказалось применение двойного терминатора, сочетающего элементы терминатора гена *rrnB* *E. coli* и модифицированного терминатора T7. В ходе многоэтапного экспериментального исследования система была сначала апробирована на модели eGFP. Мы показали отсутствие накопления флуоресцентного белка при наличии в среде индуктора экспрессии. Были оптимизированы параметры редактирования плазмид, и в заключение успешно протестирована на четырех различных антимикробных пептидах с выраженной бактерицидной активностью. Разработанная платформа открывает новые возможности для контролируемой экспрессии высокотоксичных белков в бактериальных системах с потенциальным применением в биотехнологии и фармацевтике.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, № 23-15-00084, <https://rscf.ru/project/23-15-00084/>.