

ВЕДУЩАЯ РОЛЬ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ POLQ В CRISPR/CAS9-В ИНДУЦИРОВАННОМ ГЕНОМ ТАРГЕТИНГЕ У ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

И.А. Сизова^{1,2}, В.И. Шалгуев^{1,2}, S. Kelterborn³, P. Hegemann³, В.Н. Вербенко^{1,2}

¹ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² Курчатовский Геномный центр-ПИЯФ, Гатчина, Россия

³ Institute of Biology, Experimental Biophysics, Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany

Известно, что двухцепочечные разрывы ДНК (ДЦР), внесенные в геном сайт-направленными эндонуклеазами системы CRISPR/Cas, могут восстанавливаться посредством гомологичной рекомбинации (HR), классического нехомологичного соединения концов (cNHEJ) и альтернативного соединения концов (altEJ/TMEJ). Целью нашей работы является выяснение роли путей репарации cNHEJ и TMEJ в восстановлении ДЦР, внесенных эндонуклеазой CRISPR/Cas9/gRNA, для повышения эффективности редактирования генов у одноклеточной зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. С использованием SpCas9-опосредованного мутагенеза, проведенного по нашей методике (Greiner et al., 2017), были инактивированы ключевые гены KU80, KU70 пути cNHEJ и ген POLQ пути TMEJ у штамма CC125 дикого типа и трансгенного штамма CC3403-D5, содержащего дефектный ген устойчивости к паромомицину (*mut-aphVIII*). Инактивация генов репарации была подтверждена фенотипически по повышению чувствительности мутантных клеток к ДНК-повреждающему антибиотику зеоцину (Zc). Причем клетки *polQ* были более чувствительны к Zc, чем клетки *ku80*, *ku70*, что указывало на доминирующую роль пути TMEJ в репарации повреждений ДНК. Клетки мутантных штаммов *ku80*, *ku70*, *polQ* были использованы в качестве реципиентов для сайт-направленного мутагенеза и генного таргетинга путем трансформации с использованием препаратов, содержащих рибонуклеопротеиновые комплексы (RNP) SpCas9/gRNA, а также, при необходимости, селективные векторы для предварительного отбора клонов и донорные ДНК-матрицы для модификации генов. Анализ нуклеотидных последовательностей SpCas9-индуцированных мутаций в гене *APHVIII* показал, что у штамма дикого типа мутагенная репарация ДЦР является результатом комбинации активностей путей TMEJ и cNHEJ. Это следовало из того, что мутации включали специфические нуклеотидные участки – “подписи” характерные для репарации по пути TMEJ, а именно, делеции между участками микрогомологии и “шаблонные” вставки, а также 1–2 нуклеотидные вставки/делеции/обмены характерные для репарации посредством NHEJ. Инактивация гена *POLQ* приводила к почти полному подавлению встраивания трансформированной плазмиды в случайные точки генома, что не наблюдалось у мутантов *ku80*, *ku70*, у которых частота случайных вставок плазмидной ДНК практически не отличалась от клеток дикого типа. Генный таргетинг штамма дикого типа и мутантов проводили с использованием донорных одноцепочечных олигонуклеотидов (ssODN) или плазмидной ДНК, содержащей протяженный (~1,4 т. п.н.) фрагмент ДНК гомологичный гену-мишени, и RNP SpCas9/gRNA или LbCas12a/gRNA. Оказалось, что инактивация гена *KU80* приводила к стимуляции репарации дефектного гена *mut-aphVIII* и повышению частоты инактивации гена *SNRK2.2* в результате целевого встраивания короткого фрагмента FLAG, только при использовании доноров ssODN. Напротив, у мутанта *polQ* штамма CC3403-D5 инактивация гена *POLQ* приводила к подавлению репарации гена *mut-aphVIII* при использовании доноров ssODN. Тем не менее, у *polQ* мутанта ген *mut-aphVIII* может быть восстановлен посредством HR с протяженным фрагментом гена *APHVIII*, хотя и с частотой, которая в >10 раз ниже, чем у штамма дикого типа. Это показывает, что существует вклад как пути TMEJ, так и пути HR в репарацию ДЦР, причем роль TMEJ преобладает. Таким образом, наши результаты показали, что при редактировании генов с использованием эндонуклеазы SpCas9 в репарации хромосомных ДЦР принимают участие пути cNHEJ и TMEJ, а встраивание плазмидной ДНК в случайные точки генома и генный таргетинг посредством гомологичной репарации преимущественно происходят по пути TMEJ. При этом полимеразы Theta *POLQ* может быть ответственной за большинство случайных и целевых вставок фрагментов ДНК в ядерный геном.

Работа выполнена как часть программы Курчатовского Геномного центра «Курчатовский Геномный центр-ПИЯФ – ПИЯФ» (соглашение №. 075–15–2019–1663), а также была частично поддержана грантом РФФИ 17–54–45088 ИНД_а (2017–2018 гг.).

ЛИТЕРАТУРА

Greiner A, Kelterborn S, Evers H, Kreimer G, Sizova I, Hegemann P. Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-Finger Nucleases and CRISPR/Cas9. *PlantCell*. 2017, 29(10):2498–2518.