

АНАЛИЗ И ДИЗАЙН ДНК/РНК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ПРИМЕРЕ CRISPR/dCAS-СИСТЕМ

Мамаева Н.Ю., Кристовский Н.В., Шайтан А.К.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический ф-т, каф. Биоинженерии, 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, E-mail: mamaeva19n@gmail.com

За последнее десятилетие технология CRISPR-Cas приобрела широкую популярность в различных областях: от редактирования генома до контроля экспрессии генов. В основе системы лежит способность комплексов CRISPR-Cas программироваться для нацеливания на определенные последовательности ДНК. Введение точечных мутаций блокирует нуклеазную активность Cas9, но не влияет на его связывание с мишенью. Инактивированный dCas9, значительно расширил применение технологии CRISPR-Cas9. В частности, dCas белки широко применяются в качестве элементов генетических цепей (1). Для построения моделей генетических схем, улучшения эффективности и специфичности нацеливания, а также контроля регуляции элементов сетей, необходимо понимание параметров взаимодействия комплексов dCas-гРНК-ДНК, измеренных в системах *in vitro*. В нашей работе мы измерили константы диссоциации комплексов dCas9-гРНК с ДНК в различных условиях. Также мы ввели функциональный РНК-домен, приводящий к димеризации dCas-белков посредством взаимодействия между двумя РНК-шпильками.

Для проведения экспериментов по связыванию *in vitro*, белок dCas9 экспрессировали в клетках *E. coli* и очищали путем трехэтапной очистки FPLC. Гидовую РНК синтезировали путем *in vitro* транскрипции. Последовательности ДНК, меченные 6-FAM, получали из синтезированных олигонуклеотидов. Константы диссоциации измеряли методом поляризации флуоресценции в планшетном ридере. Для сборки структур комплексов dCas9 с димеризационным РНК-доменом использовалась программная библиотека MDAnalysis для языка программирования Python. Расчет траекторий молекулярной динамики проводился при помощи программного пакета Gromacs.

Нами были измерены константы диссоциации комплексов dCas9-гРНК с ДНК в буферах с различной концентрацией одно- и двухвалентных ионов. Так, в буфере, содержащем ионы марганца, связывание значительно ухудшается, что может быть связано с эффектом локального раскручивания ДНК. Для повышения кооперативности связывания, мы создали модель двух dCas9-белков, связанных димеризационным РНК-доменом. Электрофоретическими методами было подтверждено наличие связанных димерных комплексов. Параметры взаимодействия полученных комплексов определены методом поляризации флуоресценции. В дальнейшем мы планируем использовать полученную конструкцию в качестве элемента генетических сетей.

Литература.

1. *Shaytan A.K. et al.* From DNA-protein interactions to the genetic circuit design using CRISPR-dCas systems // *Frontiers in Molecular Biosciences*. Vol. 9, Year 2022. P. 1070526.