Секция: биология

Кванториум Тюмень

625026, г.Тюмень, ул.Геологоразведчиков,6а +7(3452)29-03-31 info@kvantorium-tyumen.ru

**Разработка инструментов для определения PAM-последовательности Cas-эффекторов с помощью методов биоинформатики и молекулярной биологии**

Зазулин Ян, Сафина Алина, Медведев Кирилл

Класс: 11

625048, г.Тюмень, ул.Елизарова,6 кв.63 +7(908)872-10-72 [ta.w.re.os@yandex.ru](mailto:ta.w.re.os@yandex.ru)

625000, г.Тюмень, ул.Герцена,84к2, кв.46 +7(912)381-15-20 [alinasafina02@mail.ru](mailto:alinasafina02@mail.ru)

625048, г.Тюмень, ул.Фабричная,1 кв.81 +7(982)902-84-36 kmedvedev206@gmail.com

Научный руководитель: Синицын Павел Геннадьевич, PhD Biochemistry, аспирант Института Макса Планка, Германия

*Цель работы:* разработать биоинформатический инструмент и in vitro систему для предсказания PAM-последовательности Cas-эффектора.

*Актуальность разаработкии ее применение:* технология CRISPR/Cas в настоящее время является одним из самых стремительно развивающихся направлений современной биотехнологии. Системы редактирования генома уже активно применяются для модификации и улучшения ценных признаков сельскохозяйственных животных и растений. Активно разрабатываются методы генной терапии с помощью CRISPR/Cas. Также система редактирования CRISPR/Cas - будущий фундамент в области лечения генетических заболеваний.

*Проблема:* к сожалению, как и любая технология, она имеет свои ограничения. Cas- эффектор - избирательный белок, способный разрезать целевую последовательность в молекуле нуклеиновой кислоты при одновременном выполнении двух условий: комплементарном связывании направляющей РНК (спейсера) и таргетируемой последовательности и обнаружении определенного сочетания нуклеотидов, прилегающих к участку связывания с направляющей РНК. Данный мотив называется PAM-последовательностью и является строго специфичным для каждого белка. Соответственно, возможности редактирования будут ограничены теми местами гена, где встречается данное сочетание нуклеотидов.

*Методы работы:* созданный нами биоинформатический инструмент способен предсказывать PAM-последовательность для любого Cas-эффектора с помощью анализа бактериальных CRISPR-кассет и соответствующих им геномов бактериофагов. Путем взаимодействия с программой PILER-CR (или CRISPR recognition tool (CRT)) биоинформатический инструмент получает информацию о последовательностях CRISPR-кассет в геномах исследуемых бактерий, в результате работы инструмент определяет консенсусную PAM-последовательность для анализируемого белка. Также из полученных программой данных нами производился анализ и множественное выравнивание последовательностей белков Cas9 в программе MEGA Software, определение их филогенетического положения относительно друг друга, а так же анализ аминокислотных последовательностей PAM-связывающих доменов. In vitro система же предполагает введение векторной плазмиды (pGLO) со встроенным в неё геном GFP (Green Fluorescent Protein) и вариантами PAM-последовательности перед ним в формате 1 плазмида = 1 возможная PAM-последовательность. Само введение проходит в этом же формате, т.е. 1 бактерия с активной CRISPR-Cas системой или 1 культура бактерий с таким же Cas-эффектором = 1 плазмида. Если PAM подходит Cas-эффектору, то плазмида разрежется, и в будущем синтеза этого белка у бактерии произойти не сможет. Проще говоря, она не будет светиться. Если же PAM не подходит, то плазмида не разрежется, и этот белок синтезируется. В данном случае бактерия будет светиться зелёным светом. Изначально записывая плазмиды с каким PAM и куда мы вводим, мы рассматриваем те бактерии, которые не светятся зелёным, а точнее плазмиду с каким PAM мы туда ввели. В результате мы получаем список подходящих PAM. Данный метод позволяет существенно экономить, так как нам не надо секвенировать и амлифицировать огромное количество геномов бактерий, как это происходит в методе отрицательной эволюции или других in vitro методах поиска PAM, которые существуют на сегодняшний день.

*Анализ результатов:* в ходе работы над проектом мы написали скрипты, разработали биоинформатический инструмент для предсказания PAM-последовательностей для различных бактерий и предложили in vitro систему для проверки PAM-специфичности Cas9-белков. Открытие новых PAM-последовательностей позволит увеличить количество Cas-белков, применяемых в редактировании человеческого генома, что в дальнейшем поможет вылечить многие наследственные заболевания, а также, возможно, будет способствовать применению геномного редактирования в иных целях, направленных на благо человечества

Список литературы:

1. <https://sites.tufts.edu/crispr/crispr-mechanism/> (анализ связывания Cas9-белка с PAM-последовательностью)
2. <https://www.uniprot.org> (база данных белков)
3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (база данных геномов бактерий и бактериофагов)
4. <https://pfam.xfam.org/family/PF16595> (анализ PAM-связываюищх доменов разных белков Cas9)
5. <https://www.rcsb.org> (визуализация Cas-белков)