

Исследование чувствительности системы CRISPR-ScCas12a к заменам в PAM

Научный руководитель – Ходорковский Михаил Алексеевич

Заир-Бек Т.А.¹, Арсениев А.Н.², Васильева А.А.³, Абрамова М.В.⁴

1 - Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: timogenen@mail.ru*; 2 - Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: arsenievanatoly@gmail.com*; 3 - Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: daucussativus7@gmail.com*; 4 - Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: abramova.mv07@gmail.com*

Комплексы CRISPR-Cas представляют собой защитные системы прокариот для борьбы с бактериофагами и другими чужеродными генетическими элементами. Белки эффекторы Cas обладают направленной нуклеазной активностью, активирующейся после того, как белок Cas, направляемый гидовой РНК, распознает определенную последовательность PAM (Мотив, примыкающий к протоспейсеру). Способность направленного узнавания и расщепления ДНК Cas-эффекторов активно применяется в методах редактирования генома и диагностики. Широкое применение в диагностике инфекционных заболеваний получили системы CRISPR-Cas12a за счет своей коллатеральной активности – способности белка Cas12a к неспецифическому разрезанию всех доступных одноцепочных ДНК молекул после направленного расщепления ДНК мишени.[1]

Целью данной работы была характеристика коллатеральной активности системы CRISPR-ScCas12a (PAM YTTN) из бактерии *S. cyanobacteriorum*, и выявление степени ее специфичности путем сравнения с широко описанным белком AsCas12a (PAM TTTN) из бактерии *Acidaminococcus sp.*[1] Исследование уровня специфичности системы проводилось методом измерения интенсивности световых потоков, возникающих вследствие индуцированного коллатеральной активностью нуклеазного расщепления одноцепочных флуоресцентных ДНК репортеров после направленного разрезания комплексами CRISPR-ScCas12a ДНК мишеней. В исследовании использовались специфичные ДНК мишени с точечными заменами во всех положениях PAM. Измерение проводилось с помощью Bio-Rad CFX96.

Экспериментальные результаты показали более высокую степень специфичности коллатеральной активности белка ScCas12a по сравнению с AsCas12a при точечных заменах во 2-м и 3-м положении относительно референсного PAM - TTTG. Соотношение степеней специфичности коллатеральных активностей ScCas 12a к AsCas 12a для каждой из точечных замен во 2-м положении PAM составило A – 2.71 ± 0.6 , G – 1.31 ± 0.22 , C – 1.09 ± 0.09 и 3-м положениях PAM A – 4.18 ± 1.23 , G – 2.17 ± 0.67 , C – 1.36 ± 0.18 .

На основе полученных данных было проведено исследование распознавания Cas системами точечной мутации H275Y вируса гриппа H1N1, увеличивающей его контагиозность в несколько раз и обеспечивающей вирус резистентностью к озельтамивиру.[2] Отношение степеней специфичности коллатеральной активности исследуемых белков для данной мутации составило 5.31 в пользу системы ScCas12a, что указывает на крайне высокую чувствительность к заменам в PAM и на потенциал к использованию изучаемой системы в диагностических целях. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ (№FSEG-2023-0014).

Источники и литература

- 1) Paul B., Montoya G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications //Biomedical journal. – 2020. – Т. 43. – №. 1. – С. 8-17.

- 2) Pinilla L. T. et al. The H275Y neuraminidase mutation of the pandemic A/H1N1 influenza virus lengthens the eclipse phase and reduces viral output of infected cells, potentially compromising fitness in ferrets // Journal of virology. – 2012. – T. 86. – №. 19. – С. 10651-10660.