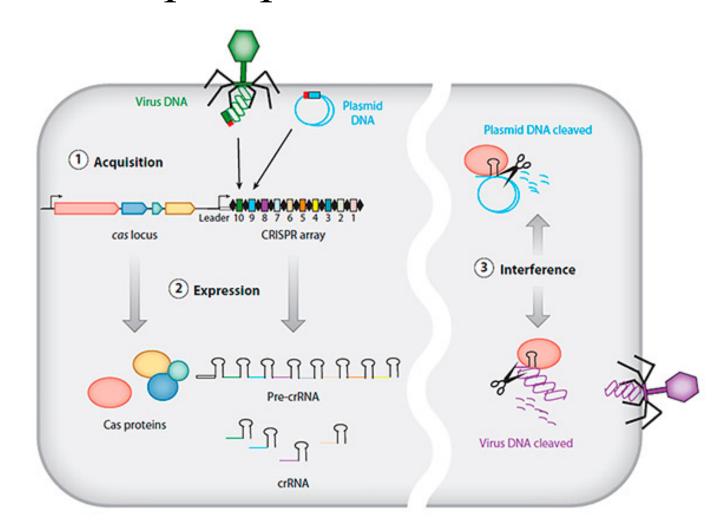
Поиск и анализ новых белк ов-эффекторов CRISPR-Саѕ систем

Овсянникова Диана СУНЦ МГУ

Научный руководитель: Анна Владимировна Желтова ФББ МГУ

Введение

- CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) новая технология для редактирования геномов, базиру ющийся на иммунной системе прокариот.
- Принцип действия:



Общие недостатки известных систем CRISPR-Cas

- Сложность доставки из-за большого размера
- Некоторые типы делают двуцепочечные разрывы (CRISPR-Cas9)
- Иммуногенность
- Недостаточная специфичность

! Необходимо искать новые, небольшие по длине, о бладающие высокой специфичностью белки!

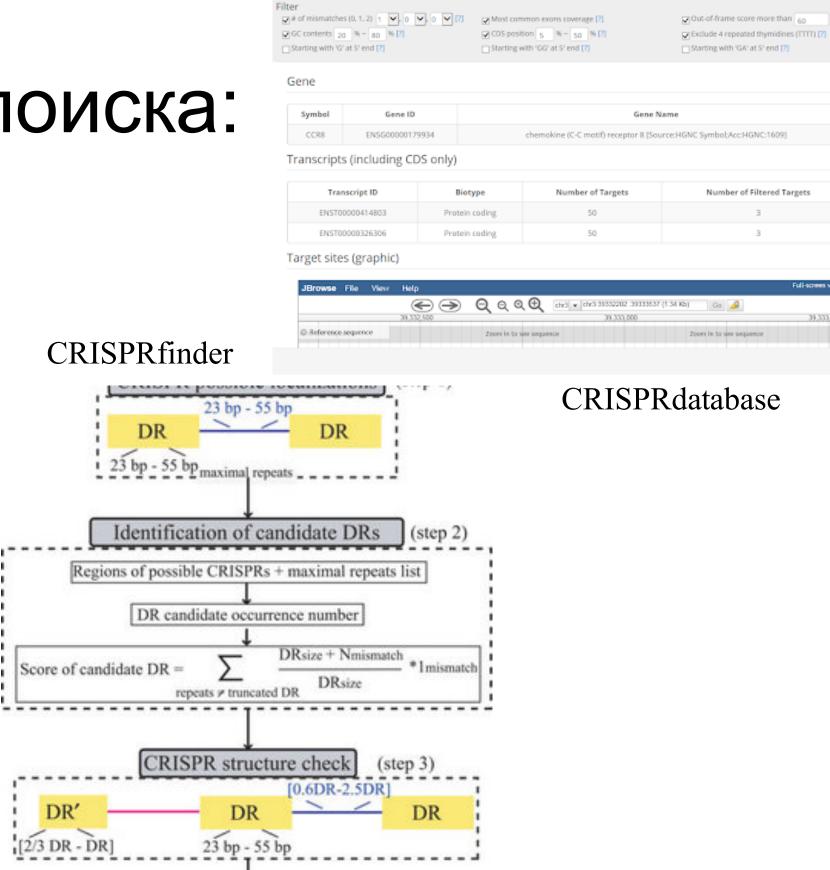
Методы поиска Cas-белков

- Секвенирование геномов бактерий и последующи й биоинформатический поиск:
- 1) Определение «затравок» консервативных учас тков для Cas-нуклеаз, проверка окружающих их по следовательностей на другие Cas-гены (BLAST)
- 2) Проверка белков на сходство с уже известными (BLAST)
 - 3) Анализ на наличие доменов (*HHsenser*)

Программы для поиска:

Enter accession n	ımber, gi,	or FASTA sequer	ice 🕝	Clear	Query subrange
					From
					То
SSS(10) (100)					
Or, upload file			Browse		
Job Title					
	Enter a d	escriptive title for your	BLAST search	9	
Blast 2 sequence		escriptive title for your	BLAST search	9	
▼ Blast 2 sequence	es 🕢	escriptive title for your	BLAST search	9	
Enter Subject S	equence				Subject subrange
	equence			Clear	
Enter Subject S	equence			Clear	Subject subrange

BLAS T

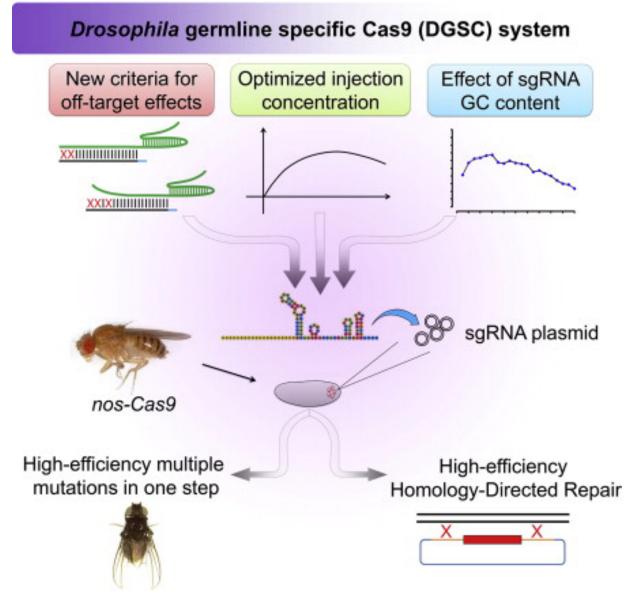


Эффективность белка зависит от:

- Положения редактируемого гена в геноме организм а
- Специфичности гидовой РНК
- Сродства гРНК к белку Cas
- Стабильности самого белка и гРНК внутри организ ма
- Наличие доменов, определяющих функциональнос ть белка

Методы оценки Cas-белков Молекулярный метод

• Накопление в плаз мидах бактерий и последующее испы тание на клетках ра стений, животных или других бактер ий.



Методы оценки Cas-белков Биоинформатический метод

- Проверка белка на наличие доменов, подтверждающих его функциональность
- Предсказание возможных изменений для усовершенствован ия работы белков путём редактирования гидовой РНК

Основные требования к гРНК:

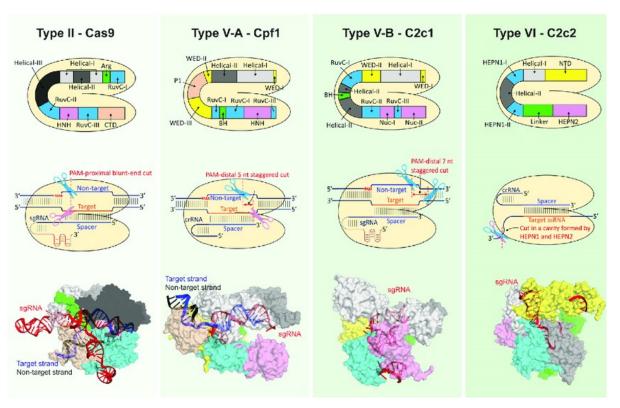
- 1) Стабильность
- 2) Максимальное сродство к Cas-белку
- 3) Высокая специфичность

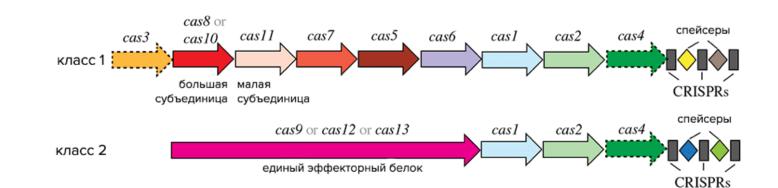
- Цель: обнаружить новый Cas-белок и подобрать для него гРНК
- Задачи:
- 1) Обнаружить последовательность данного белка в генах бактерий, в которых ранее не были найдены подобные белки
- 2) Подобрать специфичную гидовую РНК для найденного белка

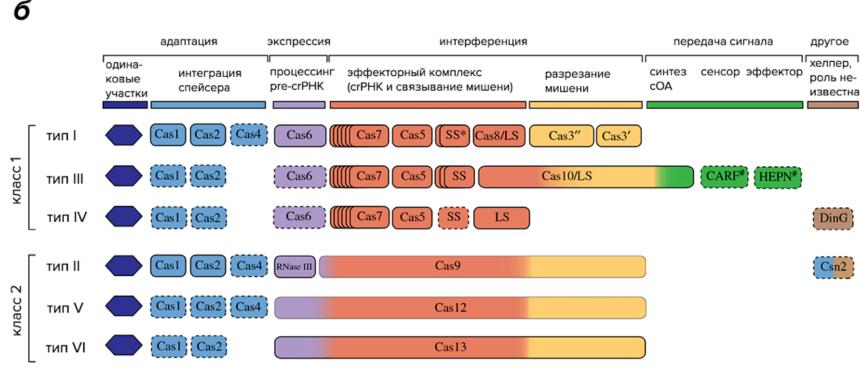
Разновидности CRISPR-Cas систем

a

Самыми распространён ными являются типы II, Va и VI.

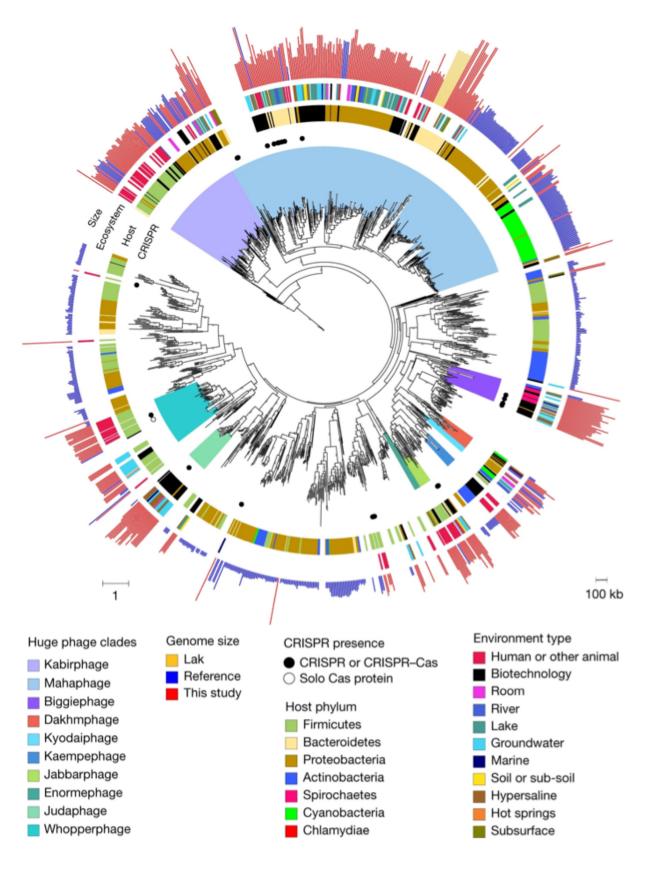






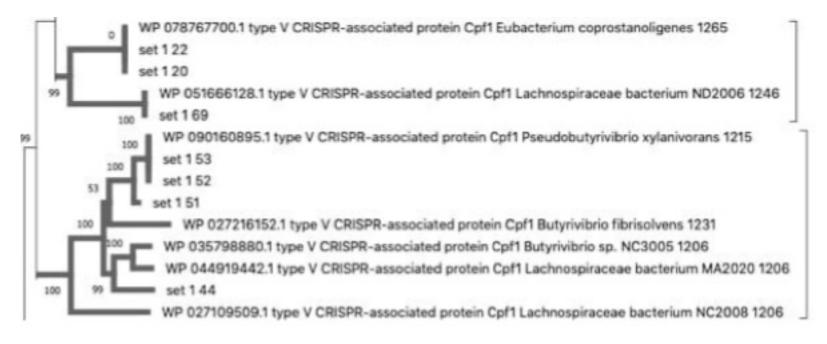
Поиск Cas-белка

• Для поиска выбрали род грамположительных неподвижных анаэробных аспорогенных бактерий. Выбор был обусловлен наличием образцов, что является ва жным для дальнейшего осуществле ния молекулярной проверки.



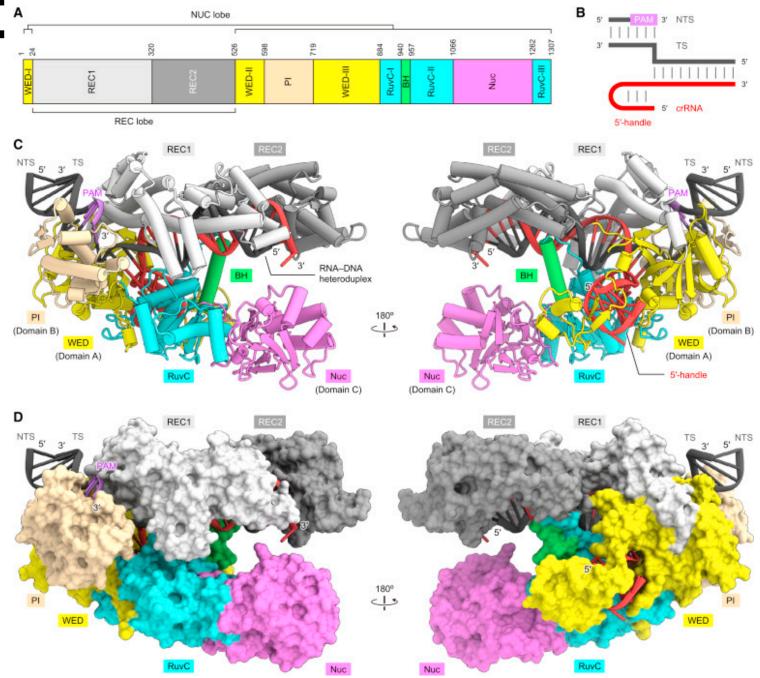
Стратегия поиска:

• Предположили, что у бактерий рода Ruminococcus есть система CRISPR-Cas, так как она присутствует у родственных бактерий. Также предположили, что белки-эффекторы у родственных видов гомологичны, значит, если у выбранных бактерий есть система CRISPR-Cas, то белком эффектором в ней будет именно Cpf1(Cas12a). С помощью программы BLAST нашли его.



Стратегия поиска:

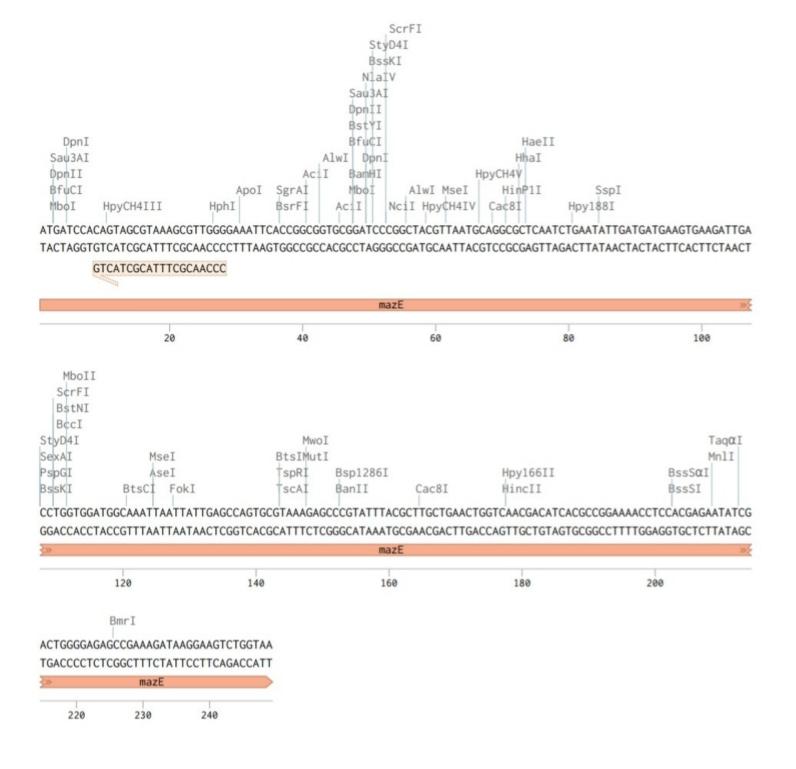
- Найденный белок провер или на наличие доменов, подтверждающих его фун кциональность:
- 1. PI: взаимодействие с PA M
- 2. Nuc, RuvC: разрезание Д НК



Поиск РАМ

- В программе CRISPR finder найдена CRISPR-кассета, в которой обнаружены участки из генома выбранной бактерии
- С помощью программы BLAST проверили данную последовательность на наличие у бактериофагов
- У фагов данную последовательность найти не удалось => обладает вырожденным РАМ.

Подбор гРНК

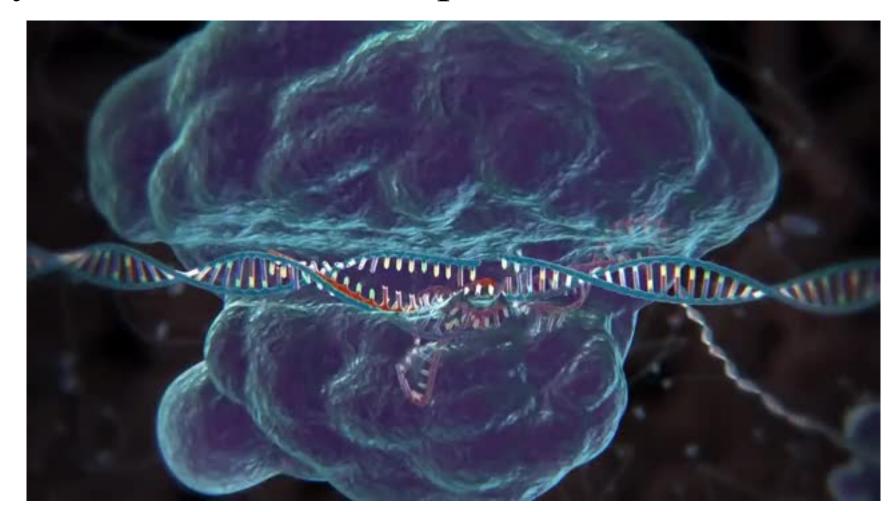


Стратегия:

- В качестве модельного организма выбра ли Е. coli K12 (расшифрованный геном, простота молекулярной проверки)
- Проанализировали геном данной бактер ии и выбрали ген *mazE* (токсин-антиток синовый локус) в связи с легко видимы м фенотипом (нокаут гена вызывает гиб ель клетки)
- С помощью платформы benchling.com п одобрали возможные варианты гРНК

Вывод:

- В грамположительных неподвижных анаэробных аспорогенных бактериях была найдена Cpf1-нуклеаза
- Для этой нуклеазы была подобрана гРНК



Спасибо за внимание!

