

**Изучение *in vitro* активности нуклеазы MsCas9 бактерии *Megasphaera stantonii* AJH120  
Горьковская А.А. (ИТМО)**

**Научный руководитель – ведущий инженер Васильева А.А.**  
(Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого)

**Введение.** Основа редактирования геномов эукариотических и прокариотических организмов – направленное внесение двуниевых разрывов в последовательности ДНК. Один из способов, позволяющих производить данное действие, основан на CRISPR-Cas системах, которые изначально были обнаружены как системы адаптивного иммунитета бактерий и архей. CRISPR-Cas система состоит из CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) кассеты и кластера генов, кодирующих Cas-белки [1]. CRISPR кассета состоит из спейсеров, разделенных короткими повторяющимися повторами DR (Direct Repeats). Наиболее широко практическое применение получили CRISPR-Cas системы II типа, в которых функцию внесения двуниевых разрывов выполняют Cas-белки, которые обозначаются Cas9. В настоящее время известны различные Cas9 белки, узнающие разные PAM (Protospacer Adjacent Motif) – нуклеотидные мотивы, фланкирующие 3'-конец мишени. PAM последовательности являются обязательным условием, при котором нуклеаза внесет двуниевый разрыв в последовательность ДНК-мишени. Это свойство ограничивает применение Cas9-нуклеаз на любых участках ДНК. Большинство известных на данный момент Cas9 белков характеризуются длинной и сложной последовательностью PAM. Поэтому актуальна задача поиска новых эффективных инструментов для редактирования последовательностей ДНК в строго определенных местах.

**Основная часть.** В настоящем исследовании была биохимически охарактеризована эффекторная часть CRISPR-Cas системы, состоящая из белка MsCas9 бактерии *Megasphaera stantonii* AJH120 [2], tracrPНК и crPНК.

Ранее в геноме бактерии *Megasphaera stantonii* был проведен анализ локуса CRISPR-Cas системы и биоинформатически предсказаны последовательности направляющих crPНК и tracrPНК. Также было проведено сравнение спейсеров, обнаруженных в исследуемой CRISPR кассете с известными на сегодня бактериофагами или плазмидами. По результатам совпадения не были обнаружены, что не позволяет предсказать требуемый PAM биоинформатически.

Нуклеаза MsCas9 была получена в рекомбинантной форме [3]. С полученным белком был проведен *in vitro* деплеционный тест, по результатам которого был получен список достоверно деплецированных последовательностей PAM.

На основе последовательности PAM 5'-GTATGCC-3', на которой MsCas9 показал высокую нуклеазную активность, была произведена проверка значимости отдельных нуклеотидных позиций, состоящая из двух этапов:

1. Замена нуклеотидов (пуринов на пиримидины и наоборот) в каждом положении PAM. Выявление значимых позиций PAM.

2. Замена исходных нуклеотидов в выявленных значимых позициях PAM на все возможные варианты нуклеотидов. Выявление необходимых нуклеотидов в данных позициях.

Полученный консенсус PAM был проверен на отобранных мишенях гена *EMX1*.

Была проведена проверка нуклеазной активности MsCas9 при различных температурах, а также при различной длине DR в crPНК.

В результате проверки значимости отдельных нуклеотидных позиций была выведена формула PAM, распознаваемого нуклеазой MsCas9: 5'-NNNGBB-3'. Была проведена проверка консенсуса PAM на разных мишенях, выбранных в гене *EMX1*. Данная проверка показала, что во многие мишени, которые фланкированы с 3'-конца полученным консенсусом, вносятся двуниевые разрывы. Это говорит о верности определенного консенсуса. В

дальнейшем планируется его уточнение для выявления наиболее предпочтительных вариантов PAM. Также было показано, что MsCas9 не теряет нуклеазную активность в диапазоне температур от 35°C до 50°C, однако наиболее оптимальные условия достигаются при температуре 45°C. Наиболее оптимальная длина DR в crPНК от 20 прямых повторов и больше.

**Выводы.** В ходе изучения *in vitro* активности нуклеазы MsCas9 бактерии *Megasphaera stantonii* AJH120 был получен консенсус PAM, распознаваемого данной нуклеазой. Полученный консенсус был подтвержден на разных мишенях, выбранных в гене *EMX1*. Также была найдена рабочая температура, при которой не теряется нуклеазная активность MsCas9, и оптимальная длина DR в crPНК. Данные факты важны для дальнейшего практического применения нуклеазы MsCas9 в качестве инструмента внесения двунитевых разрывов в последовательности ДНК-мишеней.

#### **Список использованных источников:**

1. Garneau J.E., Dupuis M.É., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadán A.H., Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA // *Nature*. – 2010. – № 468(7320). – С. 67-71.
2. Maki J. J., Looft T. *Megasphaera stantonii* sp. nov., a butyrate-producing bacterium isolated from the cecum of a healthy chicken // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2018. – Т. 68. – №11. – С. 3409–3415.
3. Vasileva A.A., Aliukas S.A., Selkova P.A., Arseniev A.N., Chernova V.E., Musharova O.S., Klimuk E.I., Khodorkovskii M.A., Severinov K.V. Type II CRISPR-Cas system nucleases: a pipeline for prediction and *in vitro* characterization // *Molecular Biology (Moscow)*. – 2023. – № 57(3) – С. 546–560.