



Конкурс для школьников «Гениальные мысли» Автореферат проекта победителя I степени

Название работы – Изучение встраивания фрагментов ДНК в CRISPR-кассеты в процессе CRISPR-адаптации у *Escherichia coli*.

Автор – Реутова Софья Алексеевна (11 класс, ГБОУ Школа № 1543, г. Москва).

Основная идея работы, цели, задачи

Ранее было показано, что в ходе праймированной адаптации некоторые нуклеотидные последовательности встраиваются в CRISPR-кассету гораздо эффективнее, чем другие. Однако причины наблюдаемого явления до сих пор остаются неизвестными. Они могут быть обусловлены либо специфичностью комплекса Cas1-Cas2 к нуклеотидной последовательности фрагмента-предшественника, либо зависеть от исходного количества соответствующих фрагментов в клетке, доступных для связывания с комплексом Cas1-Cas2, например, в процессе CRISPR-интерференции может образовываться разное количество различных фрагментов-предшественников.

В нашей работе мы решили выяснить, зависит ли эффективность встраивания фрагментов в CRISPR-кассету от их нуклеотидной последовательности при наивной адаптации, которая осуществляется исключительно Cas1-Cas2-комплексом. Выявление такой зависимости свидетельствовало бы о специфичности адаптационного комплекса Cas1-Cas2 к нуклеотидной последовательности ДНК фрагментов-предшественников, отсутствие такой зависимости при наивной адаптации говорило бы в пользу второго предположения, согласно которому неравное количество фрагментов в клетке ведет к неравной представленности спейсеров в CRISPR-кассете.

Основные результаты

Для решения поставленной задачи было решено использовать клетки *E.coli* штамма BL21DE3, который не несет собственных *cas*-генов и имеет одну функциональную CRISPR-кассету. Клетки этого штамма трансформировали плазмидой pCDF-Cas1,2, несущей гены *cas1* и *cas2* CRISPR-Cas-системы типа I-E. При добавлении индуктора в данных клетках экспрессируются белки Cas1 и Cas2, формирующие комплекс, способный осуществлять CRISPR-адаптацию. В отсутствие генов, отвечающих за CRISPR-интерференцию, приобретение новых спейсеров будет происходить только по пути наивной адаптации.

Чтобы проверить, зависит ли эффективность встраивания фрагментов-предшественников от их нуклеотидной последовательности, в клетках штамма BL21DE3, несущих плазмиду pCDF-Cas1,2, проводили индукцию экспрессии белков адаптации Cas1, Cas2, а затем клетки трансформировали смесью двух двуцепочечных фрагментов ДНК длиной 33 пары оснований, взятых в одинаковом молярном соотношении. Один из фрагментов соответствовал «горячему» спейсеру, то есть, спейсеру, наиболее эффективно встраиваемому при праймированной адаптации из плазмиды pT7blue, и имел нуклеотидную последовательность GTG CTC ATC ATT GGA AAA CGT TCT TCG GGG CGA (в дальнейшем обозначается как HS (hot spot)). Второй фрагмент соответствовал спейсеру с нуклеотидной последовательностью GAA GAT CCT TTG ATC TTT TCT ACG GGG TCT GAC, который встраивается редко при праймированной адаптации из плазмиды pT7blue, так называемому, «холодному» спейсеру (CS – cold spot). Ранее было показано, что разница в эффективности встраивания HS и CS при праймированной адаптации составляла более чем 40 раз.

После трансформации смесью фрагментов HS и CS, клетки культивировали в течение 6 часов, после чего проводили ПЦР с праймерами *toj3-1*, *toj4-1*, которые комплементарны участкам геномной ДНК CRISPR-кассеты, окружающим место потенциального встраивания нового спейсера (Рис.1). При анализе методом электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР, мы обнаружили ДНК-фрагменты длиной 130 и 180 пар оснований, которые соответствовали неудлиненной CRISPR-кассете и CRISPR-кассете, удлинённой за счёт встраивания нового спейсера, соответственно (Рис.1). Фрагменты, соответствующие удлинённой CRISPR-кассете, были выделены из геля и отправлены на высокоэффективное секвенирование на приборе MiniSeq Illumina. Вышеописанный эксперимент мы проводили 2 раза.

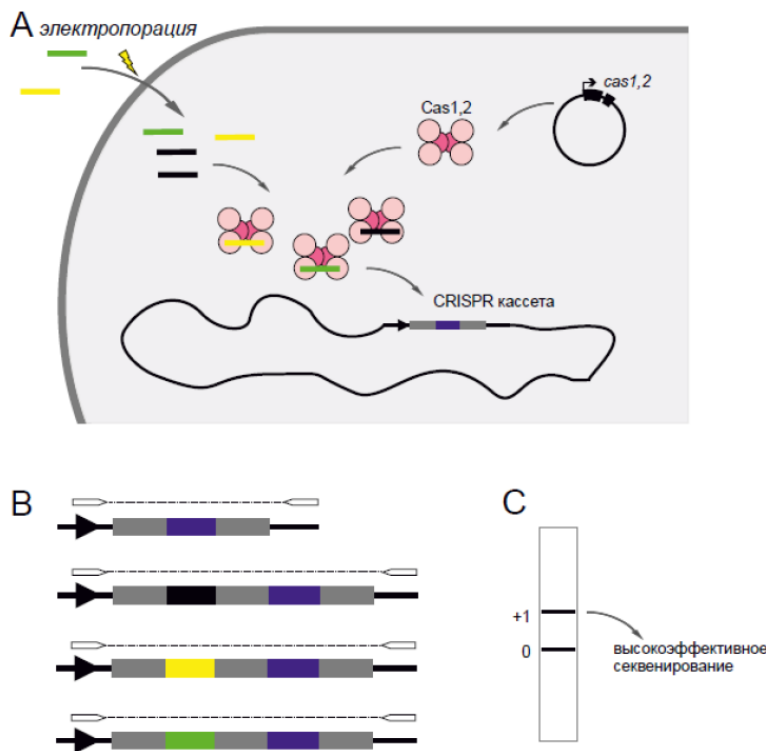


Рис. 5. Схема эксперимента. А.Рисунок клетки E.coli, несущей плазмиду pCDF-Cas1,2, с которой под действием индуктора считываются белки Cas1 и Cas2; введение в клетку фрагментов ДНК путём электропорации; участие комплекса Cas1,2 в CRISPR-адаптации. В. верхняя панель демонстрирует неудлиненную CRISPR-кассету, вторая сверху панель – удлинение кассеты за счёт встраивания нового спейсера, три нижних панели – CRISPR-кассеты, удлинённые за счёт фрагментов из генома или трансформированных в клетки. С. Схема электрофореграммы продуктов ПЦР с использованием праймеров, комплементарных лидерной последовательности и повтору (0 соответствует неудлинённой CRISPR-кассете, +1 – удлинённой).

Fastq-файлы, полученные в результате секвенирования образцов, были проанализированы, как описано в разделе Материалы и методы. Результаты обработки данных приведены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что только 1,47 % новых спейсеров в первом эксперименте и 1,14 % новых спейсеров во втором эксперименте соответствовали фрагментам HS и CS, которые были трансформированы в клетки, то есть, общая эффективность встраивания спейсеров из фрагментов, трансформированных в клетку, была крайне невелика.

Таблица 1. Результаты обработки данных высокоэффективного секвенирования.

	Адаптация смеси фрагментов HS и CS длиной 33п.н.	
	Эксперимент №1	Эксперимент №2
Исходное кол-во ридов	307722	224492
Кол-во ридов после компьютерной фильтрации и склеивания парных ридов	121805	114593
Общее кол-во спейсеров	119048	60449
Кол-во спейсеров длиной 33 п.н.	107347	54303
Кол-во спейсеров, соответствующих HS-фрагменту	1232	395
Кол-во спейсеров, соответствующих CS-фрагменту	345	226

Хотя при трансформации в клетки использовалась смесь фрагментов, взятых в равных молярных соотношениях, соотношение полученных спейсеров составило 1232:345 в первом эксперименте и 395:226 во втором эксперименте, то есть, HS-спейсер использовался в 3,57 и 1,76 раз чаще, чем CS. Таким образом, соотношение спейсеров отличается от 1:1, что также подтверждается статистическим критерием Хи-квадрат, $p=0.01$; причём HS встраивается чаще, чем CS. Это подтверждает нашу гипотезу о том, что на эффективность встраивания спейсеров в CRISPR-кассету влияет их нуклеотидная последовательность. Можно предполагать, что адаптационный комплекс Cas1-Cas2 имеет некоторую специфичность к нуклеотидной последовательности, которую еще предстоит установить. Также не исключен вариант, что такой специфичностью обладают другие белки, способные к расщеплению ДНК, что приводит к тому, что реальная концентрация одного фрагмента (HS) становится больше, чем другого (CS) в клетке.

Мы решили сравнить наши результаты с результатами исследований праймированной CRISPR-адаптации, проводимых ранее. Полученные данные приведены в таблице 2 и на гистограмме рис.6.

Таблица 2. Сравнение соотношения спейсеров, соответствующих HS и CS-фрагментам, приобретенных в ходе наивной CRISPR-адаптации

	Праймированная адаптация			Наивная адаптация	
	Эксперимент №1	Эксперимент №2	Эксперимент №3	Эксперимент №1	Эксперимент №2
Кол-во спейсеров, соответствующих HS-фрагменту	96169	2212	3282	1232	395
Кол-во спейсеров, соответствующих CS-фрагменту	1209	58	75	345	226
CS/(HS+CS)* 100 (в процентах)	1,24	2,56	2,23	21,88	36,39

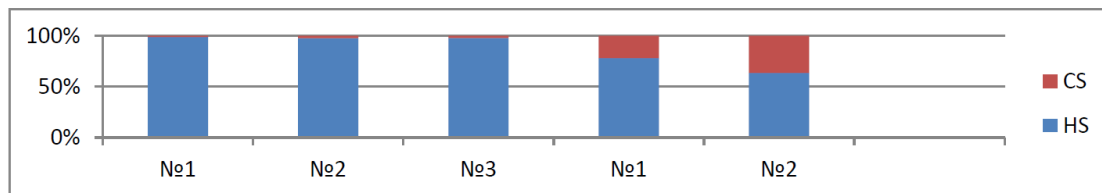


Рис.6. Процентное соотношение спейсеров, соответствующих фрагментам HS и CS.

Из таблицы 2 и рис.6 видно, что эффективность встраивания в CRISPR-кассету спейсеров, соответствующих CS-фрагменту, намного выше при наивной адаптации, нежели при праймированной, что подтверждается точным критерием Фишера, $p=0.01$. Это можно объяснить тем, что в процессе CRISPR-интерференции, сопровождающей праймированную адаптацию, образуется меньше фрагментов-предшественников CS-, чем HS-. Следовательно, на эффективность встраивания фрагментов-предшественников влияет не только их нуклеотидная последовательность, но и возможность образования таких фрагментов в процессе CRISPR-интерференции. Это свидетельствует о том, что обе наши гипотезы соответствуют действительности.

Выводы, заключение, перспективы

1. При наивной адаптации эффективность встраивания ДНК-фрагментов в CRISPR-кассету зависит от их нуклеотидной последовательности.
2. Относительная эффективность встраивания фрагментов отличается при наивной и праймированной адаптации, т.е. в определении набора будущих спейсеров при праймированной адаптации большую роль играет процесс CRISPR-интерференции.

Список цитированных источников

1. Marraffini L.A., CRISPR-Cas immunity in prokaryotes, *Nature*, 2015, v. 526, № 7571, pp. 55-61.
2. Nunez J.K. , Kranzusch P.J., et al., Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR- Cas adaptive immunity, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2014, v. 21, № 6, pp. 528–534
3. Nunez J.K., Harrington L.B., Kranzusch P.J., Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity, *Nature*, 2015, v. 527, № 7579, pp. 535–538
4. Савицкая Е.Е., Мушарова О.С., Северинов К.В., Разнообразие механизмов CRISPR-Cas-систем адаптивного иммунитета прокариот и возможности их применения в биотехнологии, *Биохимия*, 2016, v. 81, № 7, pp. 870 – 880
5. Yosef I., Goren M.G., Qimron, U. , Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, 2012, v. 40, № 12, pp. 5569–5576
6. Mojica F.J.M., Diez-Villasenor C., et al., Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system, *Microbiology*, 2009, v. 155, № 3, pp. 733–740
7. Jackson S.A., McKenzie R.E. et al., CRISPR-Cas: Adapting to change, *Science*, 2017, v. 356, № 6333
8. Shipman S.L., Nivala J. et al., Molecular recordings by directed CRISPR spacer acquisition, *Science*, 2016, v. 353, № 6298