

**Молекулярное моделирование биосенсора нуклеиновых кислот на основе  
тандемных dCas9 комплексов**

**Научный руководитель – Шайтан Алексей Константинович**

**Новиков Роман Вячеславович**

*Студент (бакалавр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический  
факультет, Кафедра биоинженерии, Москва, Россия

*E-mail: romannovikov526@gmail.com*

Детекция нуклеиновых кислот патогенов является актуальной проблемой диагностики заболеваний человека, животных и растений, а также мониторинга состояния окружающей среды. Для этого требуются высокочувствительные, специфичные, быстрые и простые в использовании методы диагностики. Перспективным подходом является использование естественной способности прокариотических CRISPR/Cas9 систем распознавать последовательности ДНК с высокой специфичностью в изотермических условиях. Одним из вариантов использования CRISPR/Cas9 систем для детекции нуклеиновых кислот является система двух dCas9 комплексов слитых с доменами сплит-фермента. dCas9 белки способны связываться с последовательностью ДНК, не разрезая ее, так как в последовательность Cas9 белка внесены мутации D10A и H840A, что вызывает устранение эндонуклеазной активности белка (Brezgin et al., 2019). Таким образом, когда два dCas9 комплекса связываются с целевой последовательностью ДНК в пространственно близких участках, домены сплит-фермента объединяются с восстановлением биологической активности, что является сигналом наличия целевой последовательности в пробе. Однако для разработки такого биосенсора необходимо учитывать взаимную ориентацию dCas9 комплексов, а также расстояние между ними. Поэтому в данной работе мы определили возможные взаимные ориентации двух dCas9 комплексов на целевой последовательности ДНК, которые подходят для объединения доменов сплит-фермента. Рассчитаны оптимальные расстояния между сайтами связывания ДНК dCas9 комплексами (PAM-сайтами) в разной ориентации (PAM-direct, PAM-in и PAM-out).

Для моделирования комплексов dCas9/гРНК/ДНК в различных ориентациях была выбрана структура комплекса белка SpdCas9 (Sp - *Streptococcus pyogenes*) с гРНК и ДНК (PDB ID 5Y36); а для моделирования дополнительной ДНК между двумя комплексами dCas9 была использована структура идеальной В-ДНК (Huai et al., 2017). Для присоединения ДНК к комплексам проводили структурное выравнивание двух концевых нуклеотидов В-ДНК с двумя концевыми нуклеотидами ДНК dCas9 комплексов. Эти модели были созданы с использованием скриптов Python для UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). Для измерения расстояний и углов в полученных моделях мы использовали пакеты MDAnalysis и NumPy (Gowers et al., 2016; Harris et al., 2020). Для оценки вращения dCas9 комплексов относительно оси ДНК с увеличением длины последней был рассчитан двугранный угол  $\alpha$ , образованный следующими точками: геометрическими центрами N- и C-концевых аминокислотных остатков двух dCas9 белков и геометрическими центрами двух C1' атомов центральных нуклеотидов ДНК, разделяющей dCas9 комплексы.

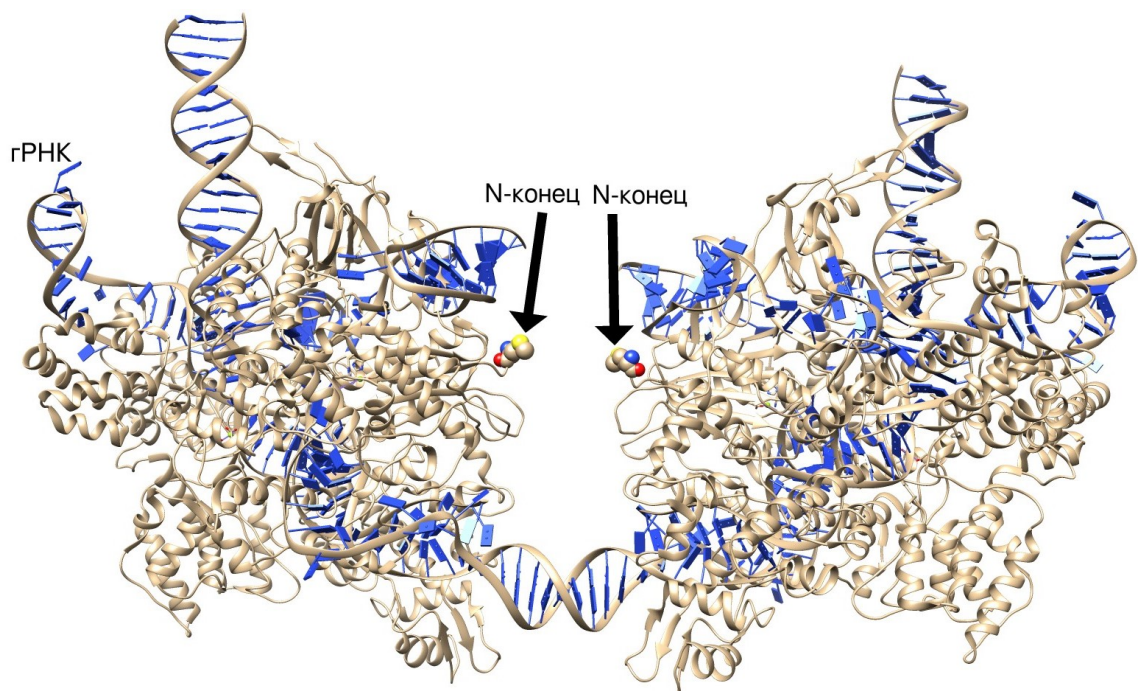
Используя молекулярное моделирование, мы рассчитали зависимость расстояния между N- и C-концевыми остатками пары dCas9 белков (к которым могут присоединяться домены сплит-фермента) от расстояния между PAM-сайтами вдоль ДНК. Также был рассчитан угол  $\alpha$ . На основании этих данных определены оптимальные позиции присоединения

доменов сплит-фермента: для ориентации PAM-in - C-концы dCas9 белков; для ориентации PAM-out - N-концы dCas9 белков; для ориентации PAM-direct - C-конец dCas9 белка, расположенного на 5'-конце распознаваемого локуса ДНК, и N-конец dCas9 белка, расположенного на 3'-конце распознаваемого локуса (ориентация локуса определяется нитью ДНК, образующей гетеродуплекс с молекулой гРНК). Также для каждого варианта были определены модели с наименьшими значениями расстояний между позициями присоединения доменов сплит-фермента и оптимальными значениями углов  $\alpha$  без стерического перекрытия между dCas9 комплексами. Наиболее оптимальными вариантами расстояний между PAM-сайтами являются следующие: для ориентации PAM-direct - 41 нуклеотид, для PAM-in - 29 нуклеотидов и для PAM-out - 52 нуклеотида (рис. 1). Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-34-51053.

### Источники и литература

- 1) Brezgin, S. et al. (2019) 'Dead Cas Systems: Types, Principles, and Applications', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23). doi: 10.3390/ijms20236041.
- 2) Gowers, R. et al. (2016) 'MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations', in. *Python in Science Conference*, Austin, Texas, pp. 98–105. doi: 10.25080/Majora-629e541a-00e.
- 3) Harris, C. R. et al. (2020) 'Array programming with NumPy', *Nature*, 585(7825), pp. 357–362. doi: 10.1038/s41586-020-2649-2.
- 4) Huai, C. et al. (2017) 'Structural insights into DNA cleavage activation of CRISPR-Cas9 system', *Nature Communications*, 8(1), p. 1375. doi: 10.1038/s41467-017-01496-2.
- 5) Pettersen, E. F. et al. (2004) 'UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis', *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), pp. 1605–1612. doi: <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.

### Иллюстрации



**Рис. 1.** Рисунок 1. Структура двух SpdCas9-белков в составе нуклео-протеинового комплекса в RAM-out ориентации с расстоянием между RAM-сайтами в 52 нуклеотида; сферами выделены N-концевые остатки SpdCas9-белков.