

Study on relaxing the PAM recognition requirements of Cas9 nuclease

放松Cas9核酸酶PAM识别要求的研究

G09: 李彦娇、任晓朴、刘拓宇、赵月磊

汇报人: 任晓朴

生物技术研究所

2022.01.23

Study on relaxing the PAM recognition requirements of Cas9 nuclease

放松Cas9核酸酶PAM识别要求的研究

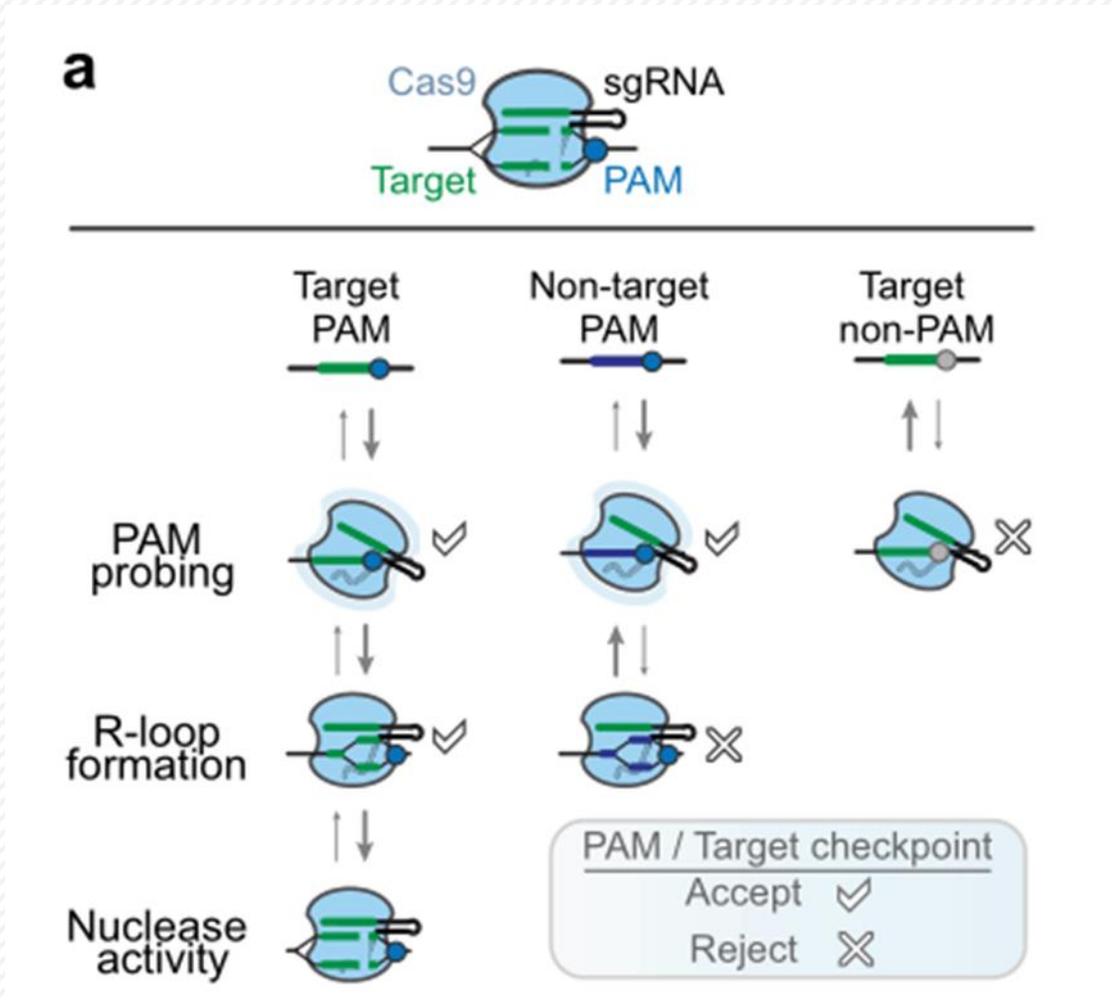
➤ 背景

➤ 天然同源基因挖掘

➤ 蛋白质工程

一、背景

➤ 1. Cas成功靶向的要素



成功的靶向需要两个要素：

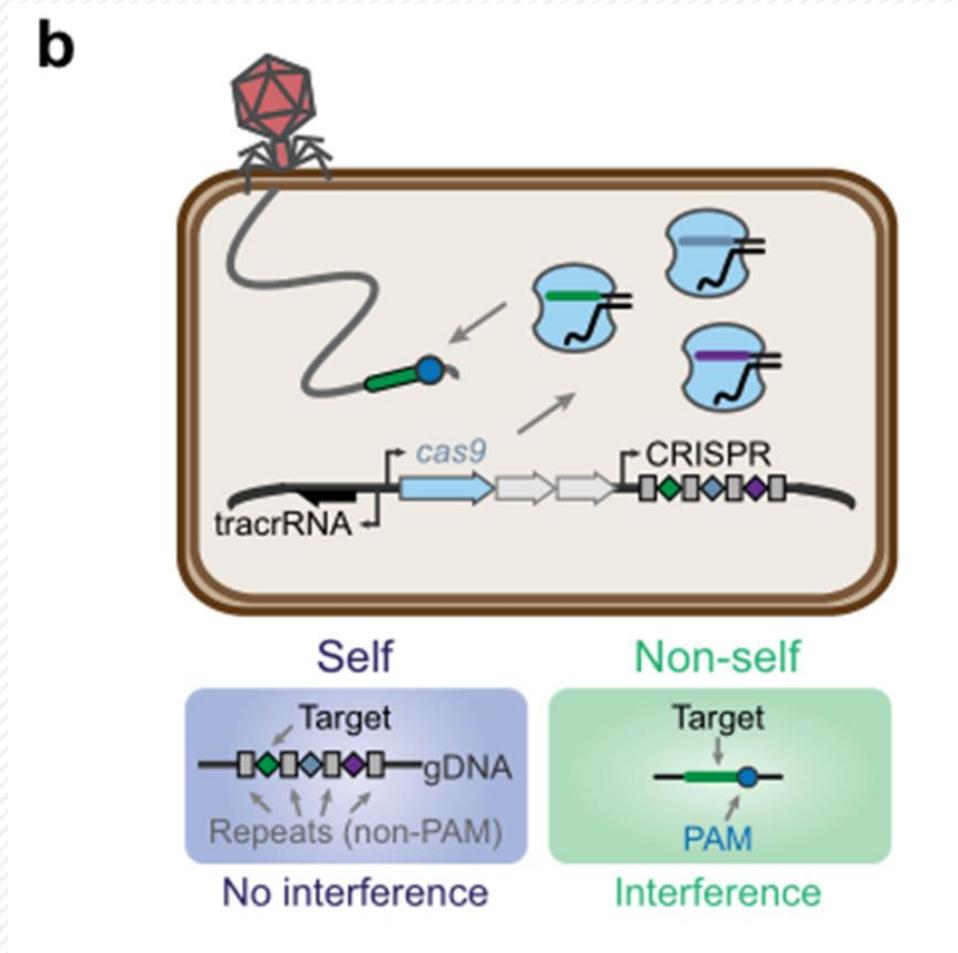
1. 靶点序列旁边的短序列，通常称为原间隔邻近基序（PAM）；

2. sgRNA和靶序列之间的广泛互补性。

与sgRNA完全互补但缺少PAM的序列将被核酸酶忽略。因此，PAM充当CRISPR-Cas靶向的把关。

一、背景

➤ 2.PAM的关键性



PAM在CRISPR-Cas系统的自然功能中起着至关重要的作用。PAM使这些原核免疫系统能够区分外来遗传物质（**非自身**）中的DNA靶点和CRISPR阵列（**自身**）中编码的相同DNA序列（产生sgRNA）。如果没有PAM要求，CRISPR-Cas系统将以其CRISPR阵列为目标，**导致潜在的灾难性自身免疫反应**。这一要求限制了用CRISPR靶向任何序列的能力，并努力来放松PAM要求，甚至几乎任何序列都可以被识别为PAM。

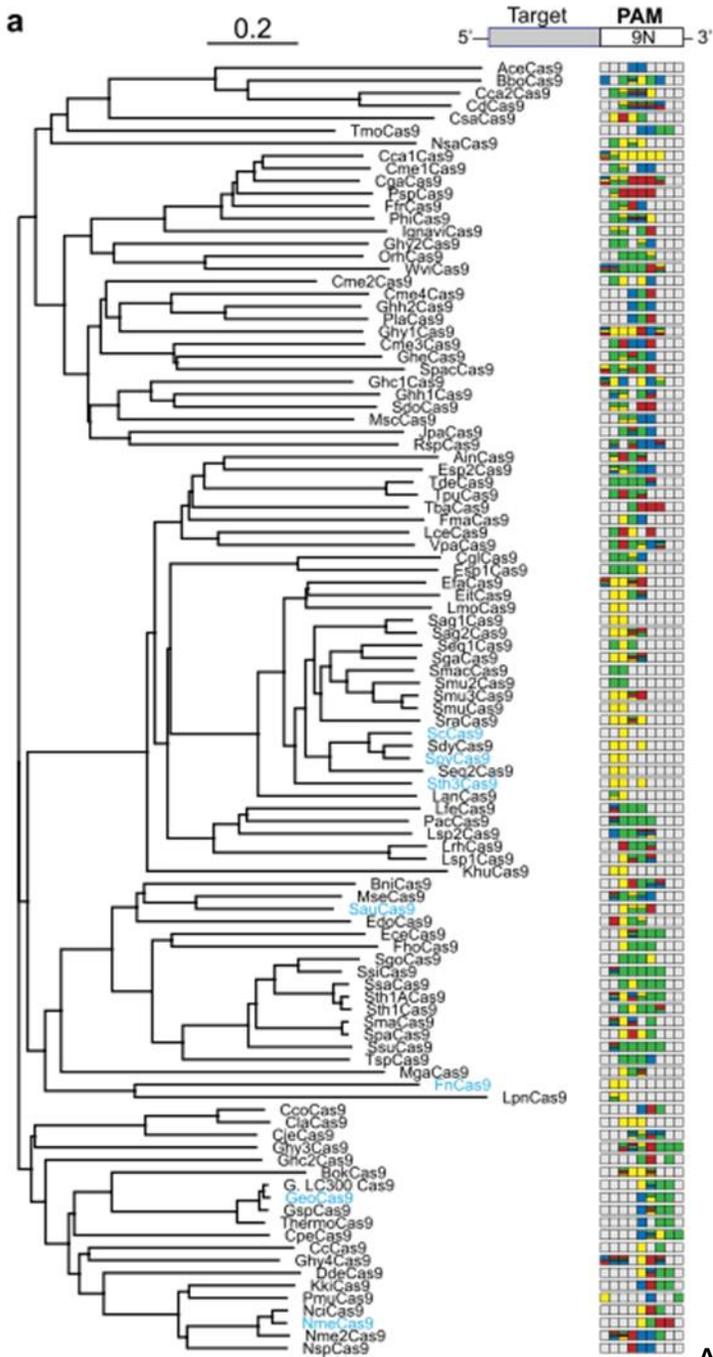
二、天然同源基因挖掘

- ➔ 现在已经了解到不同类型的cas蛋白及其功能，但是在所有CRISPR效应蛋白中，特征较好的蛋白是Cas9。用以调节基因表达、控制转录、染色体成像、药物递送，甚至治疗人类眼科和血液病，也是未来的前沿。尽管这项技术在药物开发方面有很大的前景，疗效和长期安全性仍然是临床试验中的主要问题，为了提高靶向特异性，鉴定CRISPR/Cas9同源物。

The screenshot shows the UniProtKB search interface. The search bar contains the query 'name:cas9 AND reviewed:yes'. The results page is titled 'UniProtKB 2021_04 results'. A filter box is open, showing 'Reviewed (14) Swiss-Prot' selected. Below the filter, a table of results is displayed with columns for Entry, Entry name, Protein names, Gene names, Organism, and Length.

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
G3ECR1	CAS9_STRTR	CRISPR-associated endonuclease Cas9	cas9 csn1	Streptococcus thermophilus	1,409
A0Q5Y3	CAS9_FRATN	CRISPR-associated endonuclease Cas9	cas9 FTN_0757	Francisella tularensis subsp. novicida (strain U112)	1,629
J7RUA5	CAS9_STAAU	CRISPR-associated endonuclease Cas9	cas9	Staphylococcus aureus	1,053

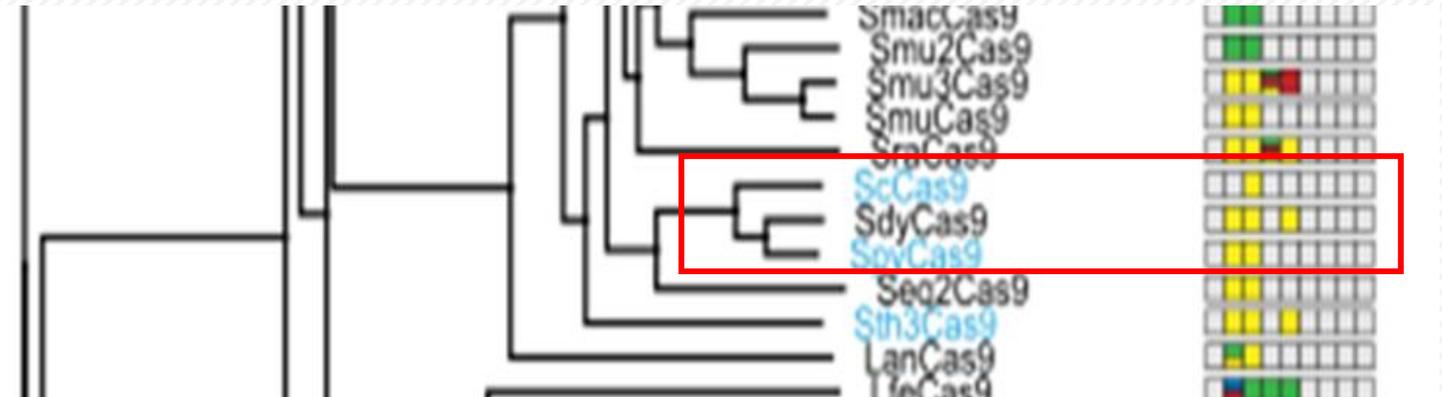
Gasiunas, G. et al. A catalogue of biochemically diverse CRISPR-Cas9 orthologs. Nat. Commun. 11, 5512 (2020).



二、天然同源基因挖掘

- ➔ SpyCas9 NGG PAM (N=any base)
- ➔ Sth1Cas9 NNATAAW PAM (W=A, T)
- SauCas9 NNGRRT PAM (R=A, G)
- NmeCas9 NNNNGATT PAM.

➔ 到目前为止，已经在测序的基因组和元基因组中鉴定出900多个不同的Cas9同源物，更多的同源物可能等待着进一步的测序工作来发现，它们具有不同的PAM谱、蛋白质大小和最适的活性温度。



A=绿色, C=蓝色, G=黄色, T=红色

Collias D, Beisel CL. CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease. Nat Commun. 2021 Jan 22;12(1):555.

三、蛋白质工程

Family & Domainsⁱ

Domains and Repeats

Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Domain ⁱ	770 – 921	HNH Cas9-type PROSITE-ProRule annotation	Add BLAST		152

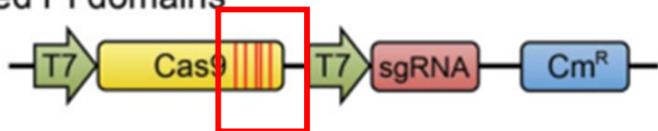
Region

Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Region ⁱ	1 – 62	RuvC-I 1 Publication	Add BLAST		62
Region ⁱ	56 – 718	Recognition lobe 1 Publication	Add BLAST		663
Region ⁱ	56 – 73	ARM 1 Publication	Add BLAST		18
Region ⁱ	718 – 765	RuvC-II 1 Publication	Add BLAST		48
Region ⁱ	925 – 1102	RuvC-III 1 Publication	Add BLAST		178
Region ⁱ	1099 – 1368	PAM-interacting domain (PI) 1 Publication	Add BLAST		270

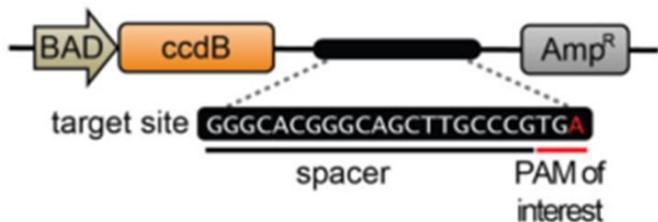
序列号: Q99ZW2

三、蛋白质工程

Library of Cas9/sgRNA plasmids with randomly mutated PI domains



Selection plasmid with PAM of interest



1) transform Cas9/sgRNA plasmid into cells harboring positive selection plasmid:

Cas9/sgRNA cuts selection plasmid Cas9/sgRNA does not cut selection plasmid

2) plate on media: selective (Cm + arabinose)

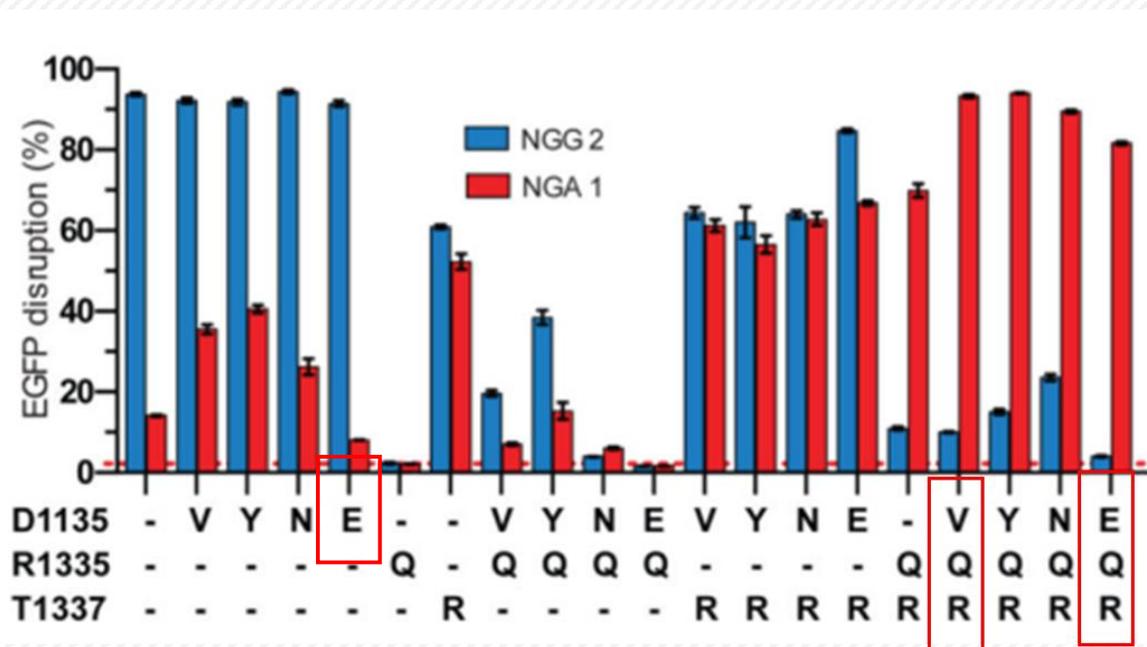


non-selective (Cm only)

3) determine relative activity by calculating survival percentage:

$$\text{survival \%} = \frac{\text{selective counts}}{\text{non-selective counts}}$$

细菌阳性选择系统



➔ 两个文库中存活的克隆替换频率最高的是D1135V/Y/N/E、R1335Q和T1337R。

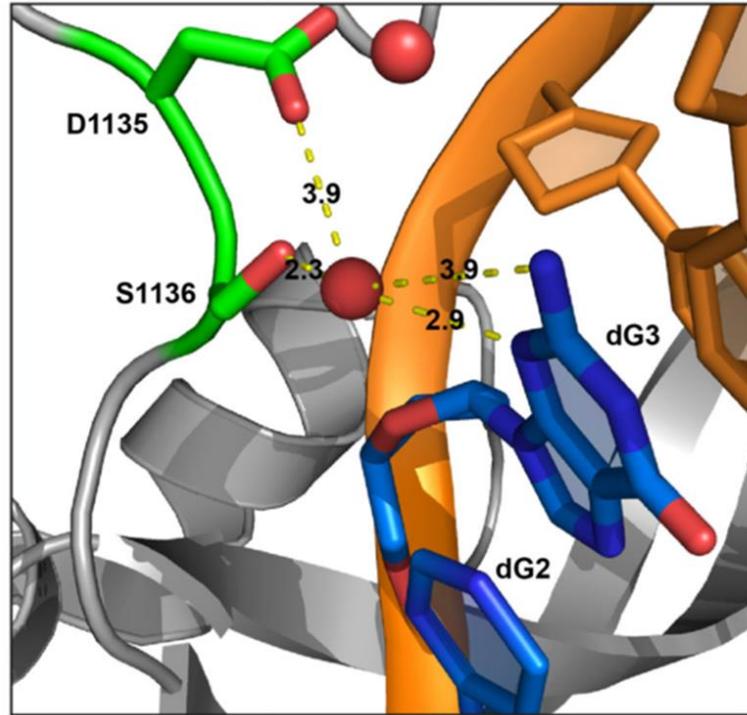
使用基于人类细胞的EGFP破坏试验，对这些突变体进行进一步分析，VQR、EQR组合突变更好的区分NGG和NGA PAMs。

➔ Cas9切割编码毒性基因的选择质粒，细胞可以生存。

Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. Nature. 2015 Jul 23;523(7561):481-5.

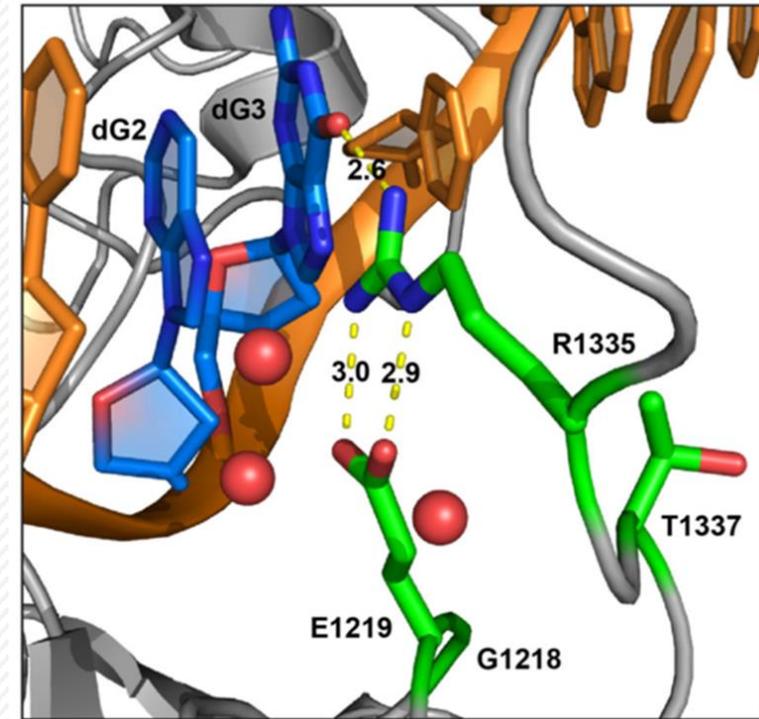
三、蛋白质工程

➤ VRER: D1135V、 G1218R、 R1335E、 T1337R



S1136、**D1135**

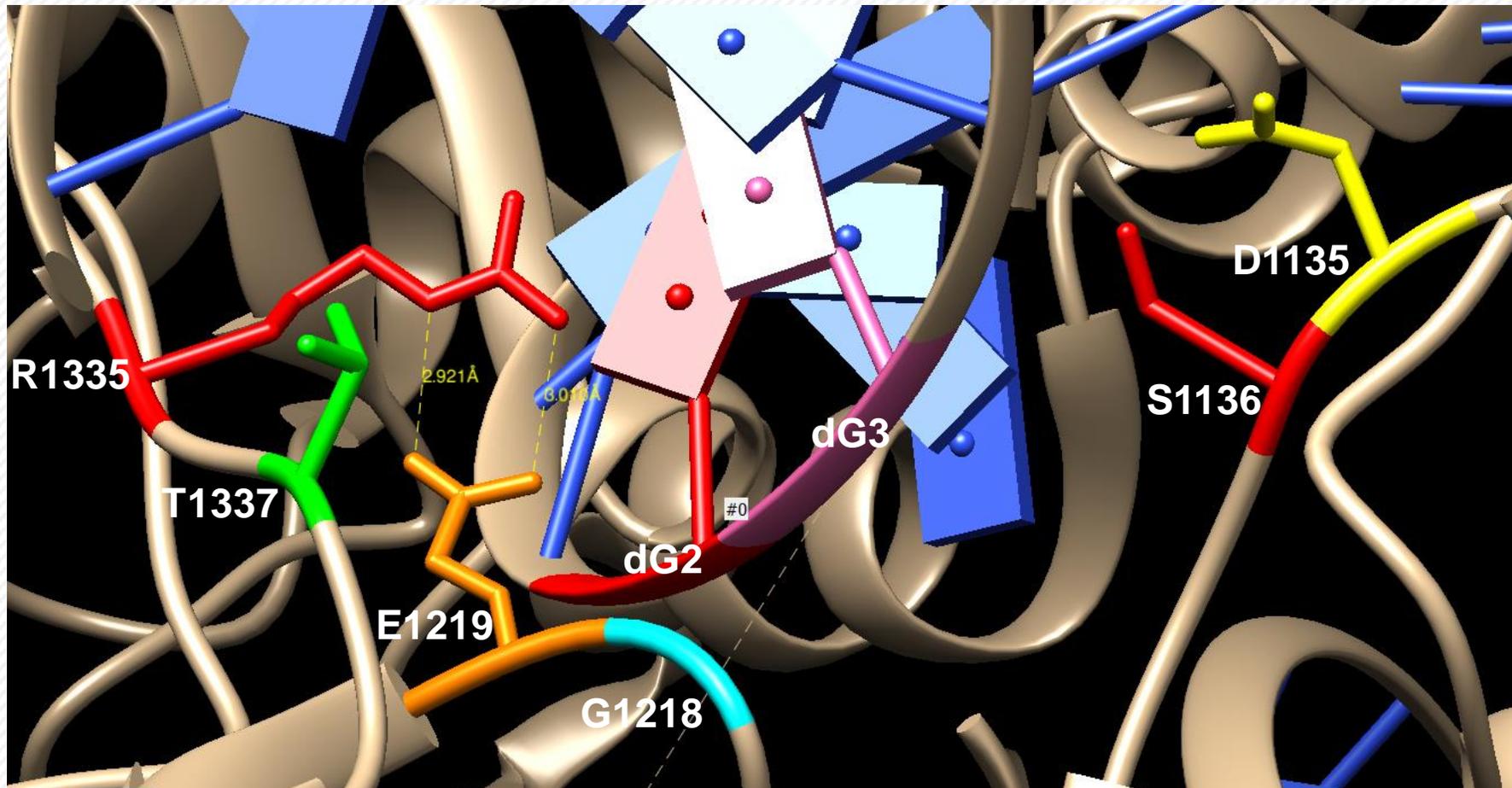
在PAM的第3个碱基上形
成一个水介导的小沟接触



E1219、**R1335**、**G1218**、**T1337**

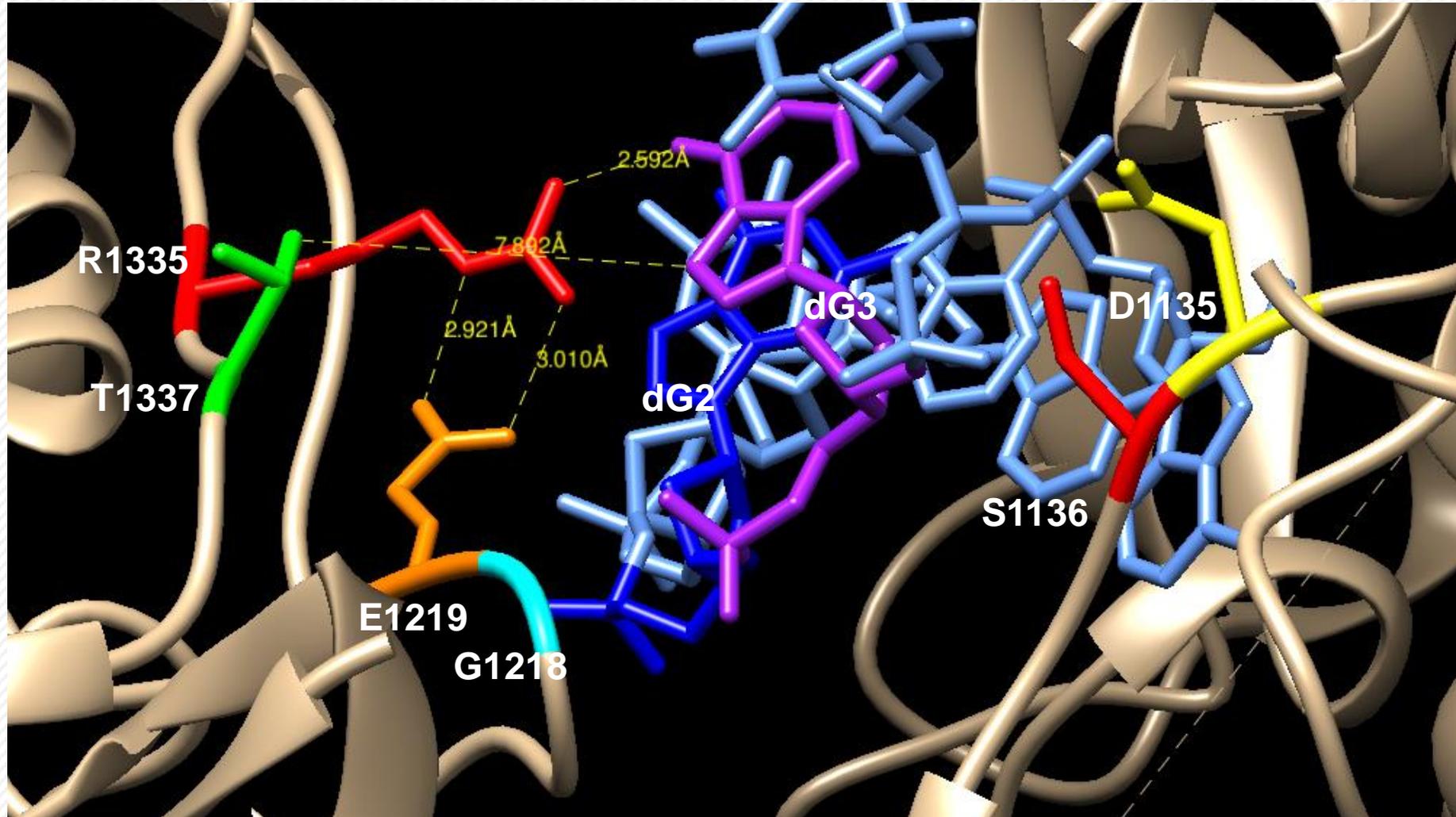
直接与PAM的第3个碱基产生特定的大沟接触

三、蛋白质工程



软件: Chimera
结构来源: PDB (4UN3)

三、蛋白质工程



软件: Chimera
结构来源: PDB (4UN3)

欢迎交流指正