

In vitro характеристика CRISPR-Cas системы PpCas12m

Научный руководитель – Арсениев Анатолий Николаевич

Кретов Даниил Андреевич

Аспирант

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург,
Россия

E-mail: roadto9021@gmail.com

Система Cas12m представляет собой инновационный инструмент в арсенале технологий CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) [3], обладающий рядом уникальных преимуществ. Во-первых, компактный размер белка в 73 кДа облегчает его транспортировку и использование в системах доставки, что особенно важно для терапевтических применений. Во-вторых, короткая crRNA и возможность непосредственного процессинга РНК самим белком эффектором упрощает сборку активного комплекса. В-третьих, уникальной особенностью системы является отсутствие нуклеазной активности, что предотвращает случайные разрезы ДНК и делает систему безопасной платформой для дальнейшей модификации с добавлением функциональных доменов для точного контроля генетической активности, например, таких как деаминазы, сайт специфические нуклеазы, транскрипционные факторы. Для различных эффекторных белков ортологов системы CRISPR Cas12m, характерна короткая PAM (protospacer adjacent motif) последовательность 5'TTN [2] или 5'CCN [1]. Эти особенности открывают новые перспективы в области генной терапии и диагностики, способствуя развитию более точных и безопасных методов редактирования генома.

Целью настоящей работы была характеристика системы PpCas12m из бактерии *Pelobacter propionicus* [1]

Для реализации поставленной цели был выделен и очищен рекомбинантный белок Pp-Cas12m, используя методы афинной хроматографии, биоинформатически предсказаны и *in vitro* наработаны варианты направляющих РНК, а также выделены специальные флуоресцентно меченые ДНК мишени.

В ходе *in vitro* экспериментов была установлена ориентация прямого повтора (DR) для функционирования системы на PAM библиотеках 5N и 7N. Связывание оценивали при помощи EMSA (Electrophoretic mobility shift assay), визуализация на геле осуществлена при помощи Cy3 метки. Далее была проведена проверка на конкретных PAM-последовательностях. Система осуществляла связывание при наличии 5'СССС PAM-последовательности, что позволило оценить влияние именно цитозиновых оснований на связывание комплекса. Таким образом были получены данные согласующиеся с *in vivo* исследованиями о наличии 5'CCN PAM – последовательности. Учитывая, что цитозин относится к пиримидиновым основаниям, для уточнения специфики взаимодействия были созданы дополнительно четыре мишени, в которых в PAM-сегменте заменены цитозины на тимины. Такая стратегическая модификация позволила определить, является ли требование наличия последовательности 5'СС абсолютным или же для эффективного распознавания достаточно общего присутствия пиримидинов. В результате было установлено, что для связывания комплекса с ДНК достаточным будет наличие пиримидиновых оснований.

Таким образом для системы PpCas12m был получен PAM 5'YYN что значительно расширяет возможности нацеливания системы и использования для дальнейшего использования в терапевтических и диагностических приложениях.

Источники и литература

- 1) Bigelyte G. et al. Innate programmable DNA binding by CRISPR-Cas12m effectors enable efficient base editing // *Nucleic Acids Research*. 2024. Vol. 52. No. 6. pp. 3234-3248.
- 2) Sahel D. K. et al. Next-generation CRISPR/Cas-based ultrasensitive diagnostic tools: current progress and prospects // *RSC Advances*. 2024. Vol. 14. No. 44. pp. 32411-32435.
- 3) Wu W. Y. et al. The miniature CRISPR-Cas12m effector binds DNA to block transcription // *Molecular Cell*. 2022. Vol. 82. No. 23. p. 4487-4502.e7.