



КУРЧАТОВСКИЙ
ГЕНОМНЫЙ ЦЕНТР

Поиск и получение компактных ДНК-связывающих гомологов Cas12m из метагенома кишечника *Alces alces*

Кузьминкова Анастасия Андреевна, м.н.с.
Патрушев Максим Владимирович, к.б.н.
Курчатовский геномный центр,
НИЦ «Курчатовский институт»
г. Москва

07.04.2026





03 Разнообразие CRISPR-Cas систем

05 Редакторы оснований

06 Актуальность и задачи исследования

07 Метагеном *Alces alces* как источник для поиска новых белков

08 Биоинформатический пайплайн

10 Гетерологическая экспрессия белков в *E.coli*

07 Анализ образования специфических комплексов с РНК и ДНК

08 Подтверждение РАМ

09 Ключевые результаты

10 Дальнейшие планы

Разнообразие CRISPR-Cas систем

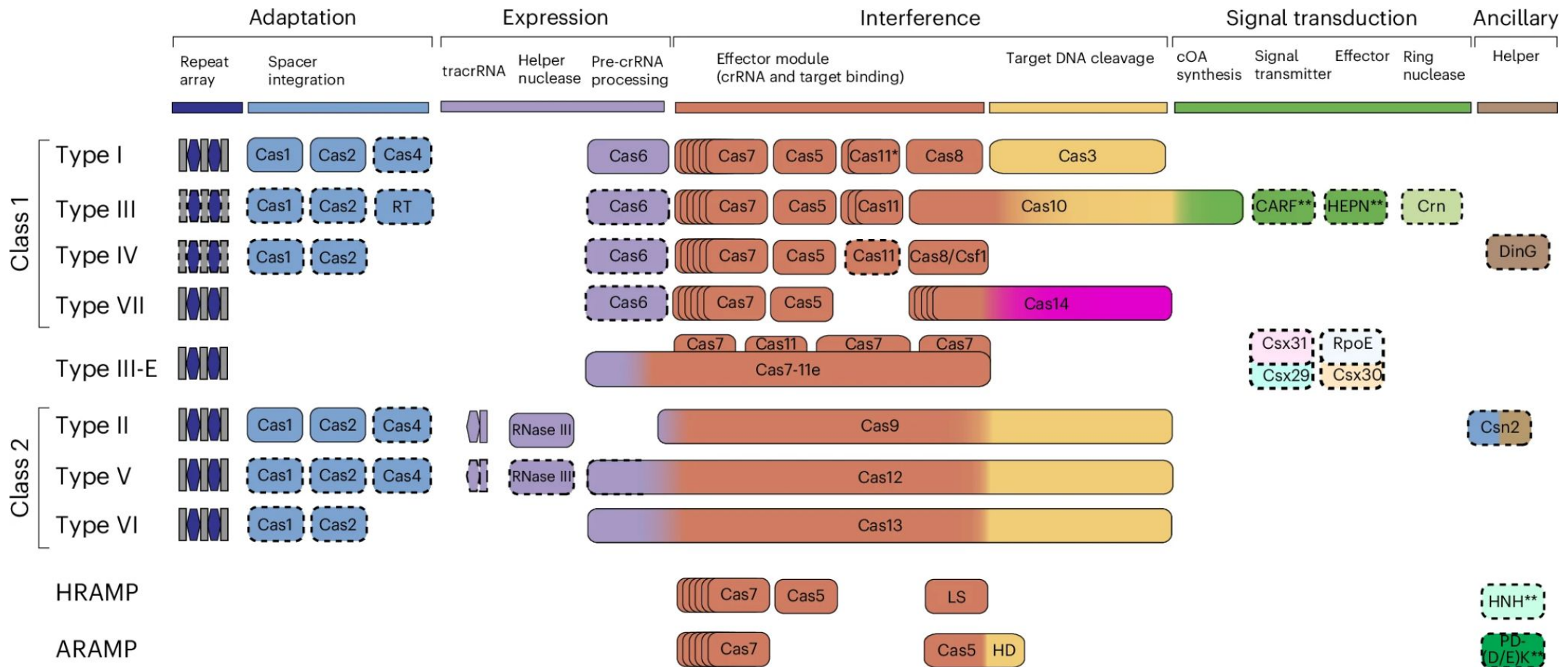


Рис. 1 - Модульная организация и разнообразие CRISPR-Cas систем (Makarova, K.S., Shmakov, S.A., Wolf, Y.I. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems including rare variants. *Nat Microbiol* 10, 3346–3361 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41564-025-02180-8>)



🔗 Классификация

- Класс 1** Мульти-субъединичные эффекторные комплексы (Типы I, III, IV)
- Класс 2** Эффекторы из одного белка (Типы II, V, VI)
- Тип II: Cas9 (наиболее изучен)
 - Тип V: семейство Cas12 (включая Cas12m)
 - Тип VI: Cas13 (РНКазная активность)

100+
Семейств Cas
белков

6
Основных типов

2
Класса

Характеристика белков семейства Cas12

- ✓ Одна crRNA (tracrRNA нет)
- ✓ T-богатая консервативная последовательность PAM (обычно TTN)
- ✓ Коллатеральная активность
- ✓ Компактный размер (550–1200 aa)



Компоненты системы редакторов оснований

1 Cas эффектор и направляющая РНК

Нацеливание на ДНК и формирование R-петли

2 Дезаминаза

Внесение замен (C → T or A → G)

3 Линкер

Гибкое соединение функциональных доменов

4 NLS

Сигналы ядерной локализации

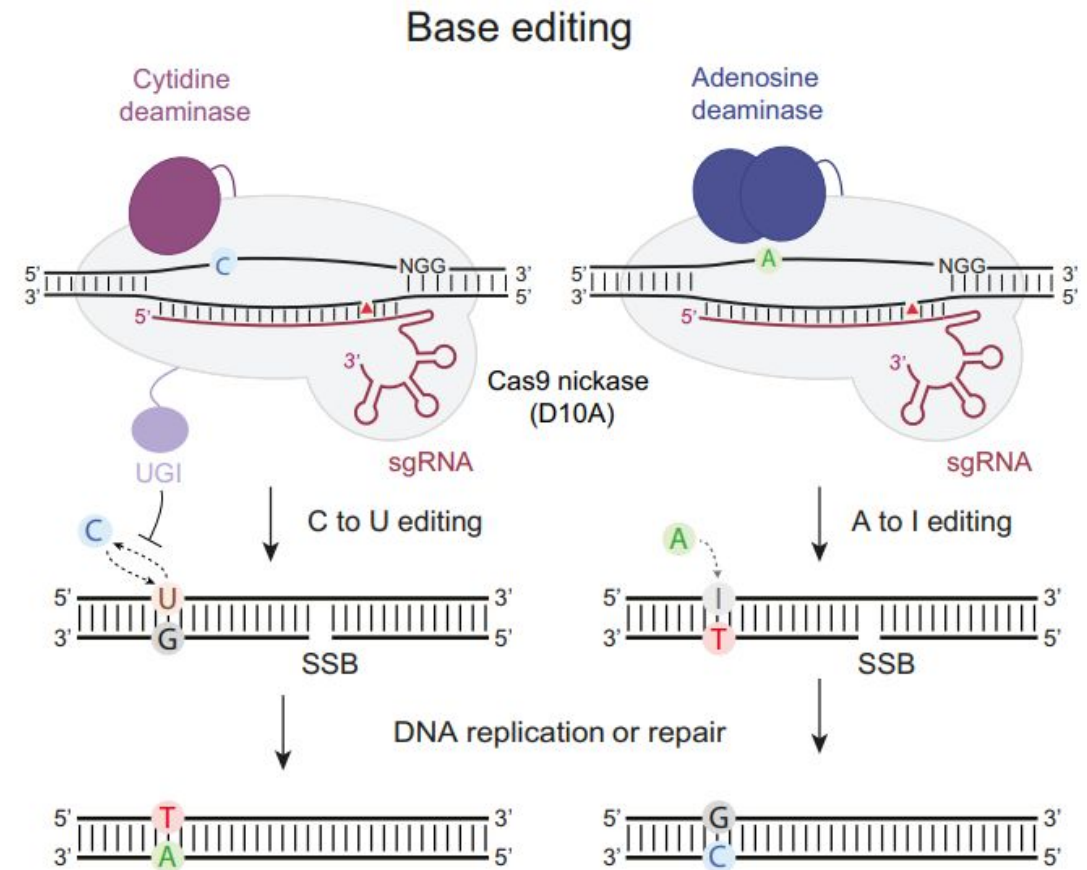
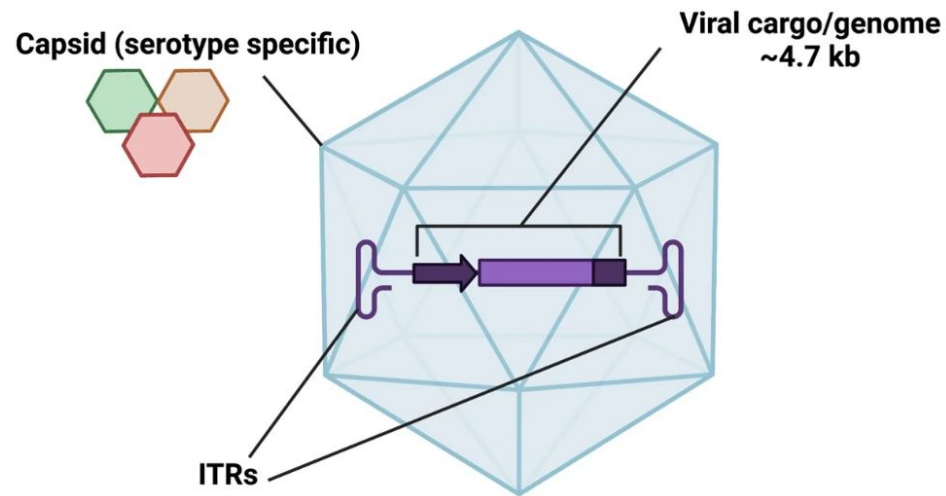


Рис. 2 - Схематичное изображение механизма редактирования ОСНОВАНИЙ (Molla K, Yang Y. CRISPR/Cas-Mediated Base Editing: Technical Considerations and Practical Applications Trends in Biotechnology, 2019; 37, 1121-1142)

Проблема вместимости векторов (rAAV)



rAAV: золотой стандарт

- ✓ Наиболее изучен в контексте генной терапии
- ✓ Относительно низкая иммуногенность
- ✓ Не интегрируется в геном - эписомальная экспрессия снижает онкогенные риски
- ✓ Много серотипов под разные ткани

Почему длина Cas-эффектора имеет значение?

- ✂ Предел вместительности AAV - 4.7 kb
- 📄 Длина кассеты простого редактора оснований значительно превышает емкость rAAV
- ✂ Преимущества в клинических приложениях
Разбивка кассеты на два вектора снижает эффективность

Простая арифметика

Cas9 + дезаминаза + NLS -5.2-5.8 kb ✗

Cas12m + дезаминаза + NLS -4.2-4.5 kb ✓

💡 Компактные РНК-направляемые ДНК-связывающие Cas12m позволяют упаковку редакторов оснований в одну вирусную частицу rAAV



Рис. 4 - Лось европейский (*Alces alces*)

Обоснование выбора

- ✔ Богатое разнообразие микроорганизмов в кишечнике млекопитающих
- ✔ Температура тела $\sim 38^{\circ}\text{C}$
- ✔ Высокий шанс найти новые **Cas12m** работающие при температуре, близкой к физиологической температуре человека



Сбор материала

Qiagen PowerLyzer PowerSoil kit

Подготовка библиотек

NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit

Секвенирование NovaSeq 6000 (Illumina)

Парные прочтения

Поиск CRISPR-Cas систем

Сборка контигов SPAdes, Megahit, поиск CRISPRCasTyper

Обнаружены два новых Cas12m-эффектора

Найдены два полных CRISPR-Cas V-M локуса, с Cas12m эффектора и CRISPR-массивами из прямых повторов и спейсеров

Белок-кодирующие последовательности Cas12m

Полные белок-кодирующие последовательности

Прямые повторы (DR)

Консервативные последовательности в сCRISPR-массивах, являются частью crPHK

Последовательности спейсеров

Вариабельные последовательности в CRISPR-массивах, фрагменты геномов бактериофагов

Архитектура CRISPR-массива



DR = прямой повтор; спейсер = последовательность атаковавшего в прошлом фага

Почему важно отобрать полный CRISPR-локус

- Поиск crPHK: скаффолдная часть в последовательности прямых повторов
- Косвенное подтверждение функциональности найденных белков системы

Генерация биоинформатических данных и поиск Cas12m

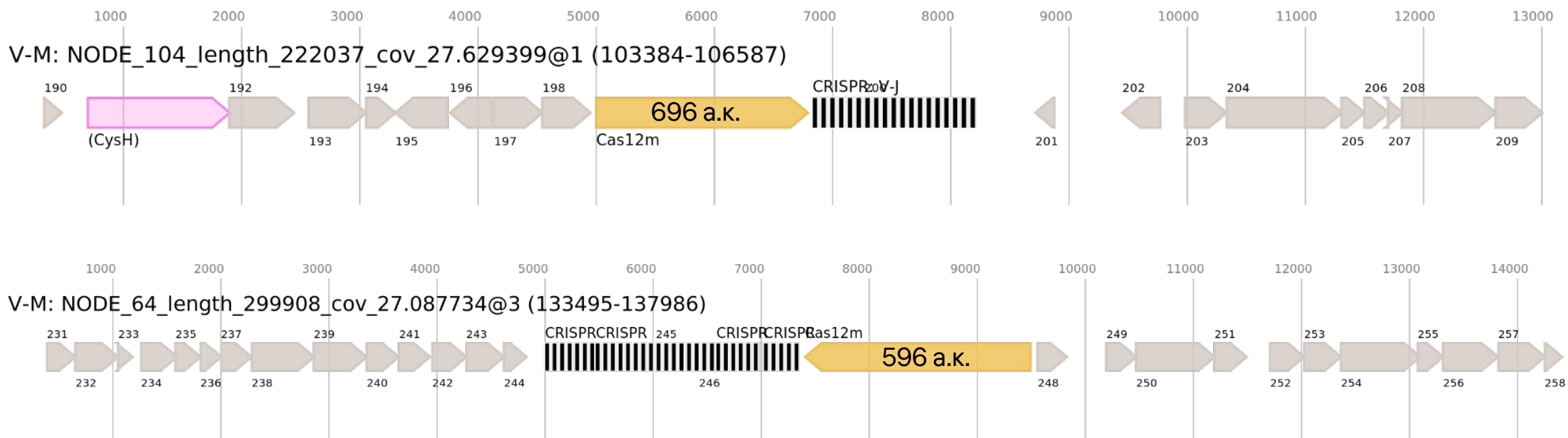


Рис. 5 - CRISPR-Cas V-M локусы, обнаруженные в метагеноме *Alces alces* (CRISPRCasTyper). Желтые стрелки - белок-кодирующие последовательности Cas12m, CRISPR-массив изображен чередующимися черно-белыми полосами.



Стратегии для оптимизации экспрессии

1 Подбор штамма *E. Coli*

Rosetta(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysS, KRX, Arctic Express

2 Партнеры по слиянию в рамке

SUMO, GST, MBP, TRX, Trigger Factor

Проблема: белки агрегировали

× Без партнера по слиянию

Целевые белки экспрессировались в виде телец включения

× После протеолиза партнеров по слиянию

Целевые белки агрегировали в растворе

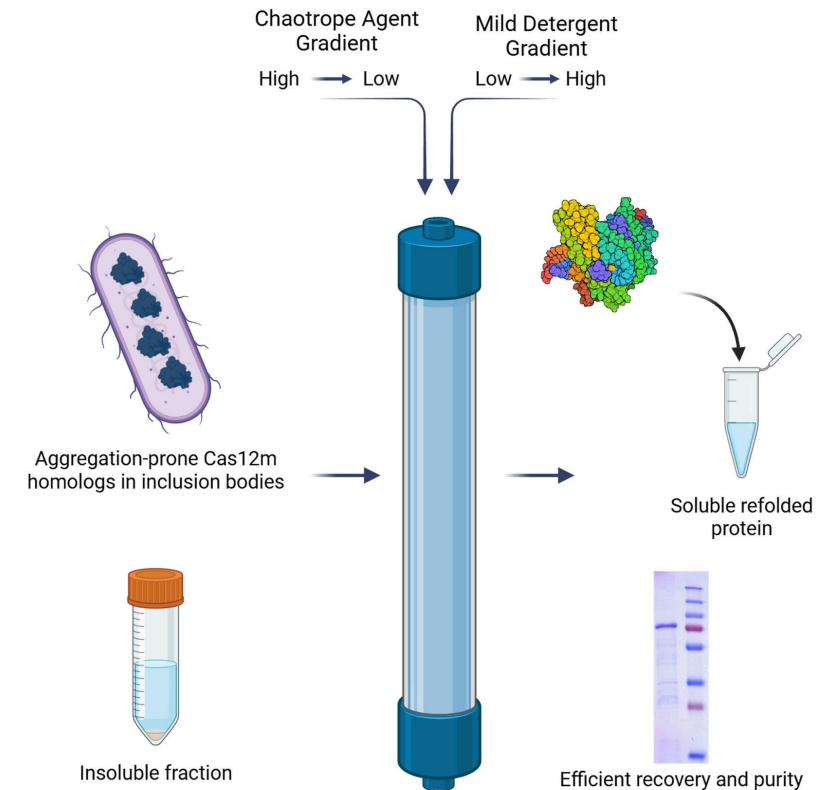


Рис. 6 - Схема рефолдинга белка на хроматографической колонке (Vlaskina, A., Petrenko, D., Agapova, Y., Kuzminkova, A., Evteeva, M. and Patrushev, M. (2026). On-Column Dual-Gradient Refolding for Efficient Recovery of Insoluble Affinity-Tagged Recombinant Proteins. *Bio-protocol* 16(3): e5598)

Анализ связывания (сдвиг электрофоретической мобильности)



Cas12m	0	0.5	1	1.5	1	0.5	1	1.5	0
crRNA	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Target DNA	-	-	-	-	+	+	+	+	+

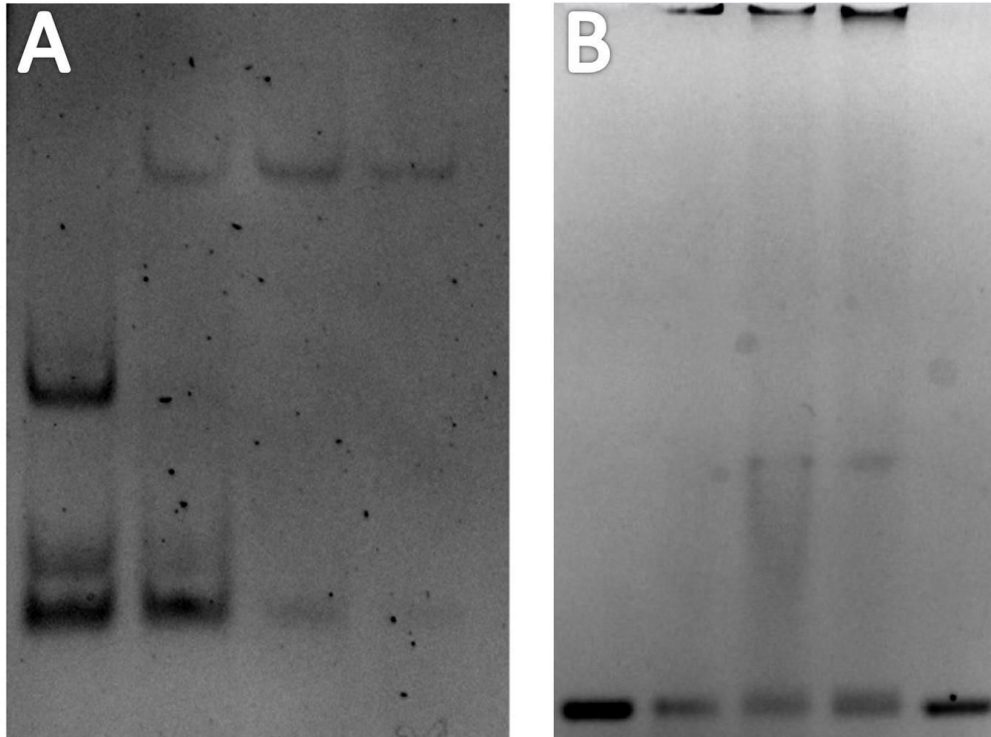


Рис. 8 - (А) Бинарные комплексы Cas12m-crРНК, 6% неденатурирующий ПААГ. (В) Третичные комплексы Cas12m-crРНК-ДНК (1% агарозный гель).



Дизайн PAM библиотеки

5'- **NNNNN** Протоспейсер -3'

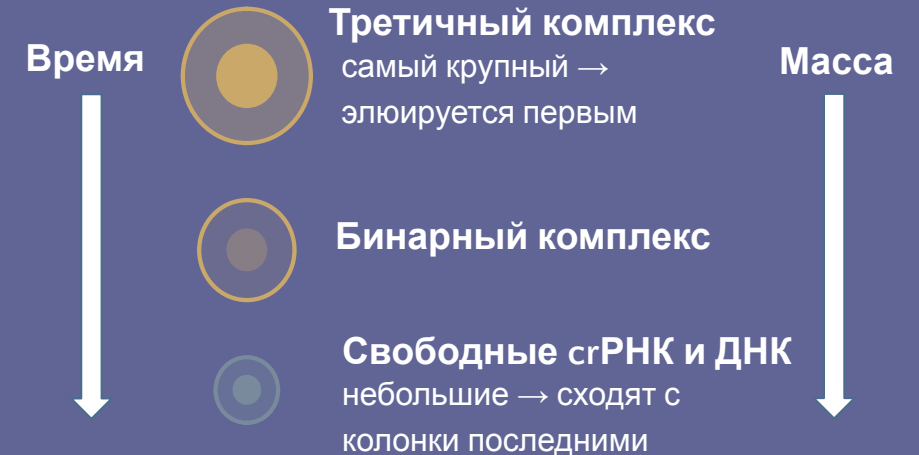
❗ Вырожденная последовательность из 5N на месте PAM + фиксированный протоспейсер

Были сформированы третичные комплексы с PAM-библиотекой, которая содержит все возможные комбинации из 5 нуклеотидов (1024 варианта) на месте PAM.

Схематичное описание шагов

- 1 **Формирование комплексов**
- 2 **Разделение продуктов реакции связывания**
Гель-проникающая хроматография (SEC)
- 3 **Очистка ДНК только из фракции, содержащей третичные комплексы**
Ферментативное удаление РНК, белка, очистка
- 4 **Секвенирование (NGS)**

Принцип SEC



Результаты

Последовательность PAM

TTN

Соответствует литературной



🔍 Два новых гомолога Cas12m

Обнаружили

Два новых гомолога Cas12m обнаружены в кишечном микробиоме *Alces alces*

Гомология

Менее 70% гомологии относительно депонированных в NCBI

Классификация внутри Cas12m

Принадлежат к одной из четырех клад внутри семейства Cas12m – на основе критических аминокислот в активном центре

Новизна белков

Ранее не охарактеризованные

🧬 crRNA и связывание

Скаффолд crRNA

Из последовательностей прямых повторов (DR) вычленены скаффолдные части crRNA

Бинарные комплексы

Комплексы из Cas12m + crRNA формируются

Третичные комплексы

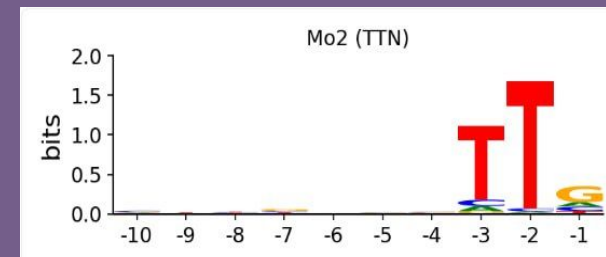
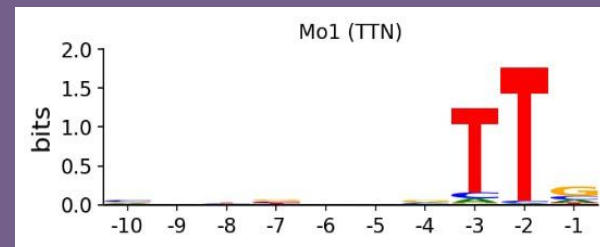
Комплексы из Cas12m + crRNA + ДНК формируются

Функционально активные



EMSA

🎯 Исследование PAM



PAM специфичность

TTN



1 Измерение кинетики

Измерение константы диссоциации (K_d) методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

i Критический параметр для редакторов оснований

2 Сборка плазмидных векторов с редакторами оснований

- перебор дезаминаз
- выбор NLS
- выбор линкера
- UGI для CBE

3 Валидация в клетках млекопитающих

Оценка эффективности редактирования, специфичности

4 Тестирование *in vivo* (мышинная модель)

Оценка эффективности доставки в rAAV, эффективности редактирования, доли нецелевых эффектов, биобезопасности

Большой потенциал в качестве терапевтического инструмента

Оптимизация этапа доставки в rAAV – более стабильный и предсказуемый эффект от введения редактора оснований

Оптимальный температурный оптимум – близкий к температуре тела человека и сельскохозяйственных животных

Редакторы на основе Cas12m не вносят разрывы в ДНК, оставаясь стабильно связанными с целевыми участками редактирования
продолжительное время – снижает риск нецелевых мутаций



**КУРЧАТОВСКИЙ
ГЕНОМНЫЙ ЦЕНТР**

Спасибо за внимание

Кузьминкова Анастасия

младший научный сотрудник

Курчатовского геномного центра НИЦ

«Курчатовский институт»

ms.kuzminkova@gmail.com

