

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-231

**ПОИСК И ТЕСТИРОВАНИЕ НОВОЙ РНК-НАПРАВЛЯЕМОЙ РНК-НУКЛЕАЗЫ ТИПА VG  
НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕНИЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВ  
ЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЯХ\***

**SEARCH AND TESTING OF A NOVEL RNA-GUIDED VG TYPE RNA NUCLEASE BASED ON THE  
ANALYSIS OF METAGENOMIC DATA, VALIDATION OF ITS FUNCTIONALITY AND APPLICATION**

Н. М. Гуницева, М. А. Евтеева, А. А. Кузьминкова

*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*

N. M. Gunitseva, M. A. Evteeva, A. A. Kuzminkova

*National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow*

✉ natgunitseva@gmail.com

**Аннотация**

В работе исследуется новая РНК-направляемая РНК-нуклеаза Cas12g, обнаруженная в метабеномах термофильных микробных сообществ во время экспедиции в Республику Северная Осетия — Алания. Обнаруженные свойства белка показывают, что он может стать перспективным инструментом для создания тест-систем.

**Abstract**

The study examines a new RNA-guided RNA nuclease Cas12g, discovered in the metagenomes of thermophilic microbial communities during an expedition in the Republic of North Ossetia—Alania. The properties of the discovered protein suggest that it could become a promising tool for molecular diagnostics.

CRISPR-Cas-система — это адаптивная иммунная система, которая широко распространена среди архей и бактерий и защищает их от вторжения вирусов и другого чужеродного генетического материала. Система состоит из эффекторного белка Cas, который осуществляет гидролиз нуклеиновой кислоты, и молекулы гидовой РНК, которая направляет рибонуклеопротеиновый комплекс на сайт-мишень [1]. Поиск и исследование новых нуклеаз с целью расширения набора инструментов CRISPR-Cas является одним из перспективных направлений в молекулярной биологии. Особенный интерес представляют эффекторы подтипов систем класса 2, в частности системы V типа. Нуклеазы типа V содержат консервативный RuvC-подобный эндонуклеазный домен и обычно расщепляют в качестве субстрата молекулы ДНК. Однако системы V-G отличаются тем, что проявляют РНКазную активность [2]. Кроме того, они демонстрируют коллатеральную активность в отношении молекул РНК и оцДНК [3]. Редактирование РНК представляет собой перспективную альтернативу редактированию генома, поскольку данный подход снижает вероятность появления неконтролируемых мутантных вариантов. Также, в отличие от редактирования ДНК, распознаванию РНК не препятствуют модификации ДНК и доступность хроматина. Это привело к всплеску использования технологии редактирования РНК, которая открывает многочисленные возможности [4].

В работе исследуется ранее не описанная нуклеаза Cas12g, которая была обнаружена в метабеномных данных термофильных микробных сообществ из термальных источников Кармадонского ущелья на высоте 2330 м над уровнем моря [5]. Найденный CRISPR-локус содержал ген *cas12g*, кодирующий 768 аминокислот, CRISPR-массив, содержащий 10 повторов сразу после гена *cas12g*, и область, кодирующую tracrRNA, расположенную ниже гена *cas12g*, с частичной гомологией с повторами массива CRISPR. Ген-кандидат Cas12g, скорее всего, принадлежит представителю класса Terriglobia. По данным NCBI CDD, С-конец гена-кандидата гомологичен белкам семейства РНК-направляемых эндонуклеаз TnpB, включающих CRISPR-ассоциированные белки, такие как CRISPR-ассоциированный белок C2c8 типа V [6]. Чтобы подтвердить, что идентифицированный CRISPR-локус является функциональной системой CRISPR-Cas, Cas12g был экспрессирован в *E. coli* с С-концевой гексагистидиновой (His)-меткой. Очистку белка осуществляли металлохелатной хроматографией и гель-фильтрацией. Для исследования активности цис-расщепления эффектора Cas V-G были проведены реакции *in vitro* разрезания РНК РАМ-библиотеки, содержащей последовательность 8N. Также было показано, что при связывании

\* Исследование выполнено в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

© Н. М. Гуницева, М. А. Евтеева, А. А. Кузьминкова, 2024

с РНК-мишенью активируется неспецифическое транс-расщепление РНК. Чтобы подтвердить, что Cas12g также активен в отношении оцДНК, были проведены эксперименты в присутствии зонда ДНК, меченного флуорофором и гасителем.

Разработка систем CRISPR-Cas, нацеленных на РНК, открывает новые возможности для редактирования РНК и регуляции на посттранскрипционном уровне [7]. Полученная и охарактеризованная новая нуклеаза типа VG в дальнейшем также может успешно применяться в диагностических тест-системах для обнаружения РНК различных патогенов.

### Литература

1. Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. CRISPR — a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea // *Nature Reviews Microbiology*. 2008. Vol. 6, No. 3. P. 181–186.
2. Zetsche B. et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system // *Cell*. 2015. Vol. 163, No. 3. P. 759–771.
3. Liu M. et al. Structural transitions upon guide RNA binding and their importance in Cas12g-mediated RNA cleavage // *PLoS Genetics*. 2023. Vol. 19, No. 9. P. e1010930.
4. Beljouw van S. P. B. et al. RNA-targeting CRISPR-Cas systems // *Nature Reviews Microbiology*. 2023. Vol. 21, No. 1. P. 21–34.
5. Toshchakov S. V. et al. Culture-independent survey of thermophilic microbial communities of the North Caucasus // *Biology*. 2021. Vol. 10, No. 12. P. 1352.
6. Wang J. et al. The conserved domain database in 2023 // *Nucleic Acids Research*. 2023. Vol. 51, No. D1. P. D384–D388.
7. Kadam U. S. et al. Aptamer-based CRISPR-Cas powered diagnostics of diverse biomarkers and small molecule targets // *Applied Biological Chemistry*. 2023. Vol. 66, No. 1. P. 13.