

## Биофизика и медицинская физика

Научная статья

УДК 577.322

DOI: <https://doi.org/10.18721/JPM.17109>

### **АНАЛИЗ БЕЛКА Cas1\_3 АСГАРДАРХЕЙ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРОМЕЖУТОЧНОГО ЗВЕНА В ЭВОЛЮЦИИ СИСТЕМ CRISPR-Cas**

**М. В. Абрамова<sup>1</sup>, А. С. Малых<sup>1</sup>, Я. М. Гатиева<sup>1</sup>,  
М. А. Казалов<sup>1</sup>, П. А. Селькова<sup>1</sup>, А. П. Якимов<sup>1</sup>,  
А. А. Васильева<sup>1,2</sup>, А. Н. Арсениев<sup>1,2</sup>, М. А. Ходорковский<sup>1</sup> ✉**

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> Комплекс НБИКС-природоподобных технологий, Национальный  
исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

✉ [khodorkovskii@gmail.com](mailto:khodorkovskii@gmail.com)

**Аннотация.** В настоящее время актуальны исследования эволюции систем CRISPR-Cas и их возможного происхождения от мобильных генетических элементов транспозонов. Недавно у новой группы асгардархей были обнаружены уникальные системы, которые предположительно функционируют как транспозоны и содержат Cas1-подобные белки. В настоящей работе для одного из таких белков, Cas1\_3, впервые с использованием генетических и биохимических технологий, а также методов электрофореза, аффинной хроматографии и высокоразрешающей масс-спектрометрии получена и частично охарактеризована его рекомбинантная версия. В частности, показано наличие у него АТФ-азной активности, количественное значение которой было определено с помощью метода спектрофотометрии. Полученные результаты могут быть полезны в понимании механизмов функционирования потенциального предшественника систем CRISPR-Cas.

**Ключевые слова:** характеристика, CRISPR-Cas, промежуточное звено эволюции, асгардархеи, транспозон, рекомбинантный белок

**Финансирование:** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00122), а также Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1062).

**Для цитирования:** Абрамова М. В., Малых А. С., Гатиева Я. М., Казалов М. А., Селькова П. А., Якимов А. П., Васильева А. А., Арсениев А. Н., Ходорковский М. А. Анализ белка Cas1\_3 асгардархей: экспериментальная характеристика потенциального промежуточного звена в эволюции систем CRISPR-Cas // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2024. Т. 17. № 1. С 81–92. DOI: <https://doi.org/10.18721/JPM.17109>

Статья открытого доступа, распространяемая по лицензии CC BY-NC 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

Original article

DOI: <https://doi.org/10.18721/JPM.17901>

## AN ANALYSIS OF THE ASGARDARCHAEA Cas1\_3 PROTEIN: EXPERIMENTAL CHARACTERIZATION OF A POTENTIAL INTERMEDIATE IN THE EVOLUTION OF CRISPR-Cas SYSTEMS

M. V. Abramova<sup>1</sup>, A. S. Malykh<sup>1</sup>, I. M. Gatieva<sup>1</sup>,  
M. A. Kazalov<sup>1</sup>, P. A. Selkova<sup>1</sup>, A. P. Yakimov<sup>1</sup>,  
A. A. Vasileva<sup>1,2</sup>, A. N. Arseniev<sup>1,2</sup>, M. A. Khodorkovskii<sup>1</sup> ✉

<sup>1</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> Complex of NBICS Technologies, National Research Center "Kurchatov Institute",  
Moscow, Russia

✉ [khodorkovskii@gmail.com](mailto:khodorkovskii@gmail.com)

**Abstract.** The evolution of CRISPR-Cas systems and their possible origin from mobile genetic elements of transposons are currently being actively studied. Recently, unique systems have been discovered in a new group of Asgardarchaea that presumably function as transposons and contain Cas1-like proteins. In this study, the genetic and biochemical technologies were used, along with electrophoresis, affinity chromatography, and high-resolution mass spectrometry, to obtain and partially characterize a recombinant version of one of these proteins, Cas1\_3. In particular, it was shown to have the ATPase activity, the quantitative value of the latter being determined by the spectrophotometric method. The results obtained may be useful in understanding the mechanisms of functioning the potential ancestor of CRISPR-Cas systems.

**Keywords:** characterization, CRISPR-Cas, evolution intermediate form, Asgardarchaea, transposon, recombinant protein

**Funding:** The reported study was funded by Russian Science Foundation (Grant No. 21-14-00122), and by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-1062).

**For citation:** Abramova M. V., Malykh A. S., Gatieva I. M., Kazalov M. A., Selkova P. A., Yakimov A. P., Vasileva A. A., Arseniev A. N., Khodorkovskii M. A., An analysis of the Asgardarchaea Cas1\_3 protein: Experimental characterization of a potential intermediate in the evolution of CRISPR-Cas systems, St. Petersburg State Polytechnical University Journal. Physics and Mathematics. 17 (2) (2024) 81–92. DOI: <https://doi.org/10.18721/JPM.17109>

This is an open access article under the CC BY-NC 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

### Введение

CRISPR-Cas – это специфические системы бактерий и архей, защищающие их от чужого вредоносного генетического материала (это могут быть вирусы, мобильные генетические элементы и т. п.). Белки такой системы в комплексе со специальными рибонуклеиновыми кислотами (РНК) направленно узнают чужеродные элементы и вносят в них разрывы, приводя к последующей деградации. В состав системы CRISPR-Cas входит CRISPR-кассета и гены, кодирующие белки Cas [1]. CRISPR-кассета – это область генома, устроенная особым образом: в ней короткие палиндромные повторы разделяются небольшими уникальными последовательностями – спейсерами. Последние представляют собой фрагменты чужеродного генетического материала, которые были сохранены в геноме микроорганизма в результате предыдущего инфицирования. Спейсеры возникают в результате процесса адаптации, т. е. встраивания чужеродного генетического материала в CRISPR-кассету. В большинстве систем CRISPR-Cas за этап адаптации отвечают белки Cas1 и Cas2 [2].



В настоящее время системы CRISPR-Cas активно изучаются с эволюционной точки зрения. Это не только расширяет фундаментальные представления о биологии таких систем, но и имеет перспективы в разработке новых технологий и усовершенствовании существующих методов генного редактирования. А поиск возможных промежуточных звеньев эволюции может привести к обнаружению белков, полезных для последующего практического использования.

Ранее методами биоинформатики были прослежены пути эволюции разных систем CRISPR-Cas. Была выдвинута гипотеза, что часть адаптационных модулей имеет эволюционное происхождение из белков-интеграз транспозонов – последовательностей ДНК, способных перемещаться по геному из одного места в другое [3, 4]. В 2020 году в нуклеотидных последовательностях новой группы архей *Asgard* (асгардархеи) были обнаружены уникальные системы, предположительно функционирующие как транспозоны. Все эти системы объединяет между собой наличие больших Cas1-подобных белков, которые являются гомологами белка Cas1 из системы CRISPR-Cas. Одну из таких систем – aCas1\_3 можно рассматривать в качестве модели одного из предшественников системы CRISPR-Cas [5].

В данной работе впервые была получена рекомбинантная версия белка Cas1\_3 – гигантского Cas1-подобного белка из предположительно транспозабельной системы асгардархей aCas1\_3. Помимо получения рекомбинантной версии белка удалось провести его первичную функциональную характеристику.

### Материалы и методы

**Биоинформатический анализ последовательности белка Cas1\_3.** Для идентификации мотивов в аминокислотной последовательности белка использовался ресурс MOTIF (<https://www.genome.jp/tools/motif/>). Поиск осуществлялся против библиотек PROSITE [6], NCBI-CDD [7] и Pfam [8].

**Клонирование гена белка Cas1\_3 для экспрессии в клетках-продуцентах.** Последовательности ДНК асгардархей, несущих белки системы aCas1\_3, существуют только в виде метагеномных данных. В настоящей работе была исследована система белков aCas1\_3, обнаруженная в последовательности *Candidatus Thorarchaeota archaeon* изолата Yarp500.bin9.44, размещенной в базе данных GenBank под номером JAEOSL000000000.1.

Кодон-оптимизированная последовательность гена белка Cas1\_3 была синтезирована в российской биотехнологической компании Клонинг Фасилити (*англ.* Cloning Facility), г. Москва, и заклонирована в вектор pEXPR\_001. С полученной плазмиды (небольшая кольцевая молекула ДНК) pEXPR\_001\_Cas1\_3 при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) был наработан ПЦР-фрагмент, несущий последовательность белка Cas1\_3. Также со стандартного вектора pMJ806 (Addgene, США) был наработан ПЦР-фрагмент, несущий последовательность гена белка, связывающего мальтозу (*англ.* Maltose Binding Protein (MBP)).

Наработка ПЦР-фрагментов проводилась с использованием смеси Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (NEB, Великобритания) согласно протоколу производителя. Последовательности использованных праймеров представлены в таблице.

Полученные ПЦР-фрагменты, несущие последовательности белков Cas1\_3 (4986 п.н.) и MBP (1101 п.н.) были заклонированы в вектор pET21a методом Гибсона [9] при помощи Gibson Assembly Master Mix (NEB, Великобритания) (напомним, что длину секвенированных участков ДНК (гена, сайта, хромосомы) или всего генома указывают в парах нуклеотидов (п.н.)). Для клонирования были выбраны сайты эндонуклеаз рестрикции NdeI и NotI.

**Экспрессия гена белка Cas1\_3 в клетках-продуцентах.** Плазмиду pET21a\_Cas1\_3\_MBP трансформировали в компетентные клетки кишечной палочки *E. coli* BL21 AI стандартными методами. Полученные клетки растили в жидкой питательной среде LB (*англ.* Lysogeny broth) с ампициллином (100 мкг/мл) в объеме 500 мл. Клеточные культуры инкубировали при температуре 37°C и равномерной аэрации на вращающейся качалке до достижения оптической плотности 0,6 на длине волны 600 нм. Транскрипцию целевого гена белка Cas1\_3 индуцировали добавлением арабинозы и изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0,1 % и 1 мМ, соответственно. Выращивание

Таблица

**Последовательности праймеров, использованных в работе**

Последовательность, 5' → 3' [обозначение праймера]
AACCTGTACTTCCAATCCAATATTGGAATGACACGATCAAGAGGAAGGCCCG [Cas1_3 forward primer]
TGGTGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTACAACGCTGCTCCTCAGACTCCGTCGGTTTCGC [Cas1_3 reverse primer]
CTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCACCACCACCACATGAAAATCGAAGAAGGTA AAC [MBP forward primer ]
ATATTGGATTGGAAGTACAGGTTTTCTCGATAGTCTGCGCGTCTTTCAGGGCTTC [MBP reverse primer]

Обозначения: forward, reverse primers – прямой и обратный праймеры, соответственно.

клеточных культур продолжали при температуре 18°C в течение 16 часов. Клетки собирали центрифугированием при центробежном ускорении 3500g в течение 30 мин. Полученный осадок хранили при температуре –20°C.

Проверку индукции транскрипции белка Cas1\_3 в полученных осадках проводили по протоколу, описанному ранее [10].

**Проверка растворимости белка Cas1\_3.** Клеточная культура в объеме 1 мл была отобрана после инкубации с арабинозой и ИПТГ (см. предыдущий подраздел). Клетки собирали центрифугированием при 12 000g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 700 мкл лизирующего буфера, включающего 50 мМ Трис, 5 % глицерина, раствора NaCl разной концентрации (она составляла 150, 500 или 1000 мМ); показатель кислотности (pH) буфера был равен 6,5 либо 8,0. Лизис клеток проводили методом ультразвуковой дезинтеграции на ледяной бане. Ультразвуковую дезинтеграцию проводили на приборе LABSONIC (Sartorius AG, Германия) при следующих значениях параметров: амплитуда ультразвука – 30 %, интервал времени активности – 0,2 с. Продолжительность каждого цикла обработки составляла 2 мин, последующего охлаждения – 2 мин; при этом общее время обработки – 10 мин.

Образец центрифугировали при центробежном ускорении 4000g и температуре 4°C в течение 10 мин, затем отделяли надосадочную жидкость от осадка. К осадку добавляли 700 мкл лизирующего буфера, ресуспендировали, затем отбирали по 15 мкл из осадка и из надосадочной жидкости для анализа состава. Анализ проводили методом электрофореза в денатурирующем 10%-м полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли [11].

**Получение рекомбинантного белка Cas1\_3.** Осадок, полученный из 500 мл жидкой клеточной культуры, содержащей индуцированный белок Cas1\_3, ресуспендировали в 15 мл лизирующего буфера с добавлением лизоцима и инкубировали на льду в течение 20 мин.

Состав лизирующего буфера (pH = 8,0): 50 мМ Трис (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>), 5 % глицерина, раствор NaCl с концентрацией 150 мМ, 1 мг/мл лизоцима.

Лизис клеток проводили методом ультразвуковой дезинтеграции на ледяной бане по протоколу, описанному в предыдущем разделе, с увеличенным временем обработки (до 30 мин). Растворимую часть лизата и осадок разделяли центрифугированием при 16 000g и 4°C в течение 60 мин. Надосадочную жидкость использовали при дальнейшей очистке.

Аффинную хроматографию производили на колонке MBPTrap HP Columns (GE Healthcare, США). Пробы с белком концентрировали с использованием центрифужных концентраторов Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit (Merck Millipore, США) с фильтром на 100 кДа.

Для проведения гель-фильтрации полученный образец наносили на колонку Superose 6 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, США) в разных буферах (см. далее раздел «Результаты и их обсуждение»). Фракции, содержащие целевой белок, собирали, объединяли и концентрировали при помощи центрифужных концентраторов с фильтром на 100 кДа.



К белковым концентратам добавляли глицерин до конечной концентрации 10 %. Очищенный белок хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Количественный анализ АТФ-азной активности белка Cas1\_3.** С целью количественной оценки АТФ-азной активности использовали метод, описанный в работе [12] (напомним, что АТФ – это аденозинтрифосфорная кислота). Для этого использовали буфер, состоящий из 25 мМ Трис ( $\text{pH} = 7,5$ ), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ АТФ, 2 – 4 мМ фосфоенолпирувата (ФЕП), 50 ед./мкл лактатдегидрогеназы, 50 ед./мкл пируваткиназы и 4 – 5 мМ восстановленного никотинамид-аденин-динуклеотида (НАДН).

Сначала измеряли фон, представляющий собой гидролитическую активность буфера, затем – активность белка в буфере; и на последнем этапе измеряли активность белка в буфере в присутствии олигонуклеотидов, состоящих из дезокситиминов (олиго-дТ). Кривые поглощения НАДН получали на длине волны 340 нм на спектрофотометре Cary 5000 (Varian, США). Для надежности получения воспроизводимых данных эксперимент повторяли трижды.

### Результаты и их обсуждение

Cas1\_3 – это представитель уникальной группы Cas1-подобных белков систем aCas1\_3 асгардархей. Данная группа белков ранее не была достаточно изучена и экспериментально не охарактеризована.

Cas1\_3, как и все остальные представители данной группы, представляет собой очень крупный белок, по сравнению с хорошо изученными белками Cas1, входящими в состав систем CRISPR-Cas. Его длина составляет 1368 аминокислотных остатков, в то время как в состав белка Cas1, например, системы CRISPR-Cas бактерии *Streptococcus pyogenes* SF370 (M1 GAS) II-A типа входит всего 289 аминокислотных остатков. Такое различие в размерах заставляет предполагать вероятное наличие дополнительных доменов в структуре белка Cas1\_3.

Первым шагом в данном исследовании был анализ того, какие дополнительные домены могут входить в состав белка Cas1\_3, что сразу должно повлечь за собой, естественно, предположение об их возможной функции. Поскольку не решена пространственная модель Cas1\_3, подобный анализ был возможен только на основе имеющихся данных об аминокислотной последовательности белка. Нами был осуществлен поиск так называемых мотивов, т. е. коротких характерных последовательностей аминокислот, связанных с определенными функциями.

В аминокислотной последовательности белка Cas1\_3 нам удалось обнаружить мотивы, подобные мотивам Уокера. В частности, мотив Уокера А представляет собой характерную последовательность аминокислотных остатков GXXXXGKT/S, где X – это любой аминокислотный остаток [13]. В последовательности белка Cas1\_3 указанный мотив может быть представлен аминокислотными остатками (G143-...-G150-K151-T152). Также в аминокислотной последовательности белка Cas1\_3 можно найти участок, подобный мотиву Уокера В (GXXXLhhhD, где X – это любой аминокислотный остаток, а h – гидрофобный аминокислотный остаток). Данный участок образован аминокислотными остатками G167-...-L172-A173-H174-P175-D176.

Известно, что расположение мотива Уокера В после мотива Уокера А является достаточно характерным для белков, обладающих АТФ-азной активностью. Последовательности этих мотивов связываются с АТФ и участвуют в переносе энергии, высвобождающейся при гидролизе молекулы АТФ, на структурные изменения белка. Это позволяет белкам, содержащим мотивы Уокера, участвовать в функциях, задействованных в процессах активного транспорта, клеточной подвижности и других биологических процессах. Здесь имеются в виду процессы, связанные с передвижением и транспортом внутри клетки, обеспечивающие эффективное использование энергии, высвобождающейся при гидролизе АТФ [14]. Как уже было отмечено выше, белок Cas1\_3 есть часть системы, которая, вероятнее всего, выполняет функции транспозона (мобильный генетический элемент). Резонно предположить, что дополнительная энергия, получаемая в ходе гидролиза АТФ белком Cas1\_3, может помогать транспозону инкорпорироваться в геном, участвуя таким образом в организации его мобильности.

Чтобы проверить способность белка Cas1\_3 гидролизовать АТФ, мы получили его рекомбинантную форму. Для этого клонировали его ген в конструкцию для экспрессии в клетках-продуцентах. Дополнительно ген целевого белка мы объединяли с последовательностью гена белка МВР (эта аббревиатура расшифрована выше). Этот белок, связывающий мальтозу, используется для повышения растворимости целевого белка в лизирующем буфере для его дальнейшей очистки методом аффинной хроматографии [15]. Полученная плаزمида pET21a\_Cas1\_3\_MBP представлена на рис. 1,*a*.

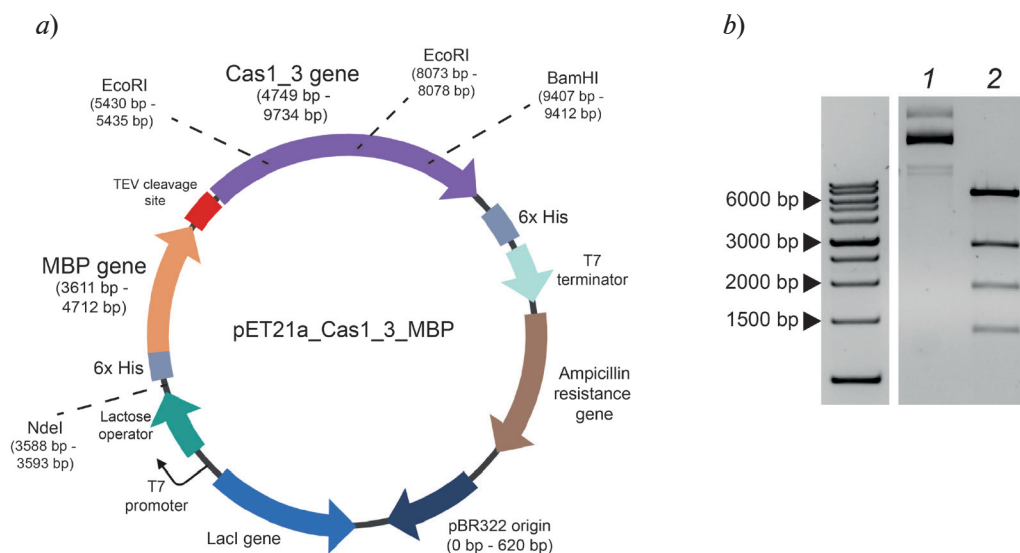


Рис. 1. Результат клонирования генов белков Cas1\_3 и MBP в вектор pET21a: *a* – схема плазмиды pET21a\_Cas1\_3\_MBP (несет гены белков Cas1\_3 и MBP); *b* – результаты рестрикционного анализа этой плазмиды.

На рис. 1, *b*: анализ с контролем без рестриктаз (1) и рестрицированная плаزمида по сайтам NdeI, EcoRI, BamHI (2); bp (base pair) – п.н. (пара нуклеотидов)

Верификацию вставки целевых генов в вектор проводили с использованием метода рестрикционного анализа: полученную плазмиду pET21a\_Cas1\_3\_MBP обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI, EcoRI, BamHI. Такая обработка плазмиды должна приводить к образованию фрагментов длиной приблизительно 1334 пар нуклеотидов (п.н.), 1841 п.н., 2643 п.н. и 5710 п.н. (см. рис. 1,*b*). В случае такой обработки исходного вектора pET21a без вставки должны образовываться фрагменты длиной 5399, 38 и 6 п.н. Размеры фрагментов, полученных в результате рестрикции, соответствуют ожидаемым (см. рис. 1,*b*), что свидетельствует о вставке целевых генов в вектор pET21a. Для дополнительной верификации проводили и секвенирование клонированного гена (определение его первичной нуклеотидной последовательности) по методу Сэнгера.

Для последующего выделения рекомбинантного белка Cas1\_3\_MBP необходимо было проверить, индуцируется ли его синтез в клетках-продуцентах и является ли этот белок растворимым.

Результаты проверки индукции транскрипции гена белка Cas1\_3\_MBP представлены на рис. 2,*a*. В образце «после индукции» регистрировался продукт, соответствующий ожидаемой молекулярной массе целевого белка (232 кДа), что свидетельствовало об успешном синтезе Cas1\_3\_MBP в клетках-продуцентах.

Для хроматографической очистки белка было необходимо убедиться в его растворимости. Поэтому на следующем этапе исследований были подобраны условия, при которых белок Cas1\_3\_MBP обладал бы наибольшей растворимостью. Для выбора наилучших условий использовали лизирующие буферы с разной концентрацией хлорида натрия NaCl (150, 500 и 1000 мМ) и значениями показателя кислотности pH (6,5 и 8,0). Продукты, соответствующие молекулярной массе белка Cas1\_3\_MBP, были обнаружены во всех образцах: как в осадках (pellet), так и в надосадочной жидкости (supernatant) (рис. 2,*b*),

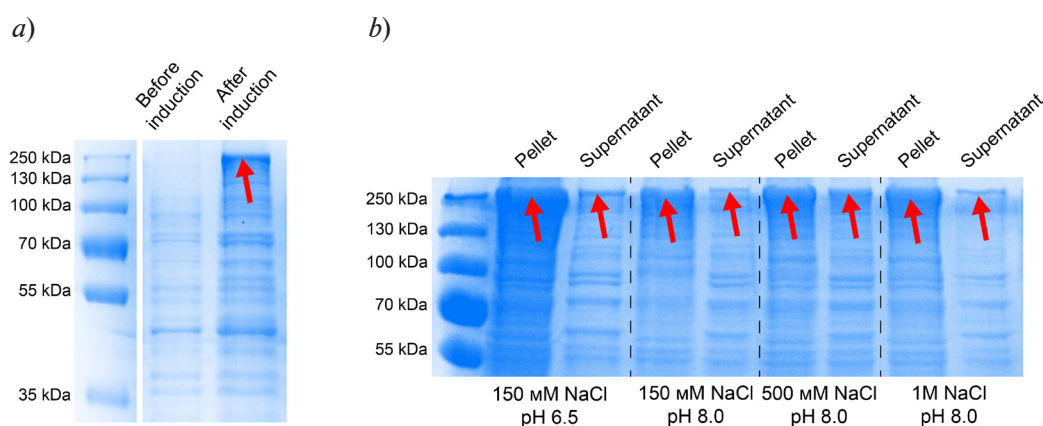


Рис. 2. Результаты электрофоретических анализов проб, полученных при двух проверках: индукции синтеза белка Cas1\_3\_MBP (a) и его растворимости (b). Ожидаемая молекулярная масса белка – 232 кДа.

Красными стрелками указаны положения целевого белка

что свидетельствовало о растворимости белка во всех проверенных буферных растворах. Для дальнейшей очистки белка был использован буфер с наименьшим количеством NaCl (150 mM) и pH = 8,0, поскольку более высокие концентрации хлорида натрия в дальнейшем могут помешать проведению экспериментов *in vitro* с данным белком.

Для выделения функционально активного белка Cas1\_3\_MBP проводилась двухстадийная очистка методами аффинной хроматографии и гель-фильтрации.

Гель-фильтрацию проводили в нескольких вариантах. Для этого использовали буферы с разным содержанием хлорида натрия. Кроме того, мы проводили очистку в буфере с 2M NaCl с обработкой раствора белка перед гель-фильтрацией бензоназой и TEV-протеазой. Обработка бензоназой проводилась для удаления нуклеиновых кислот из раствора белка, обработка TEV-протеазой – для отрезания пептида MBP от Cas1\_3. Оказалось, что при очистке белка в буфере с содержанием 2M NaCl на хроматограмме появляется пик в области 12 – 14 мл, состоящий из Cas1\_3\_MBP (рис. 3). Однако, как ранее было отмечено, использование буферов с высокой концентрацией NaCl может мешать проведению дальнейших экспериментов. В связи с этим для проверки наличия АТФ-азной активности было решено использовать фракции белка, полученные после этапа аффинной хроматографии.

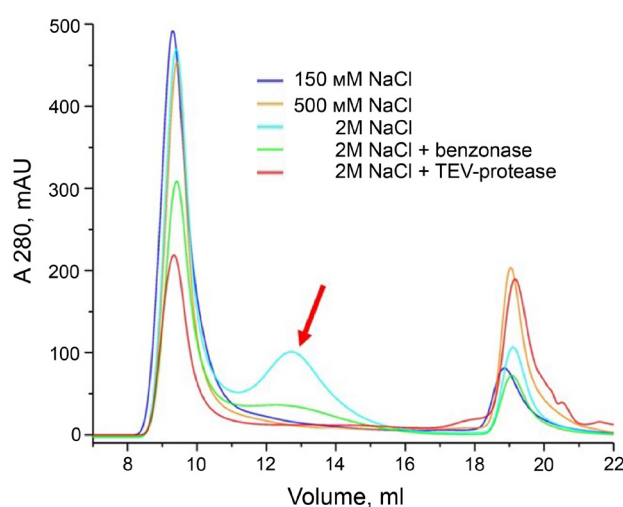


Рис. 3. Хроматографические профили гель-фильтрационной очистки белка Cas1\_3\_MBP при использовании различных буферных условий (см. легенду).

При выделении этого белка в растворе 2M NaCl обнаружен пик на объеме 13 мл (отмечен красной стрелкой), относящийся к этому белку

Проверка способности к гидролизу АТФ рекомбинантного белка Cas1\_3\_MBP была проведена *in vitro*. В качестве положительного контроля параллельно измеряли активность белка RecA. На рис. 4 представлены результаты эксперимента в виде графика зависимости количества гидролизованного АТФ от времени. Видно, что очищенный белок Cas1\_3\_MBP имеет АТФ-азную активность с постоянной скоростью гидролиза, как и белок RecA.

Скорость гидролиза АТФ белком RecA составила от  $17 \pm 3$  мкмоль/мин при добавлении олигонуклеотидов, состоящих из дезокситиминов (олиго-дТ), что совпадает с литературными данными [16]. Гидролитическая активность RecA зависит от олиго-дТ, поэтому в их отсутствии гидролиза АТФ не наблюдалось.

Скорость гидролиза АТФ белком Cas1\_3\_MBP составила  $6,0 \pm 1,5$  мкмоль/мин как

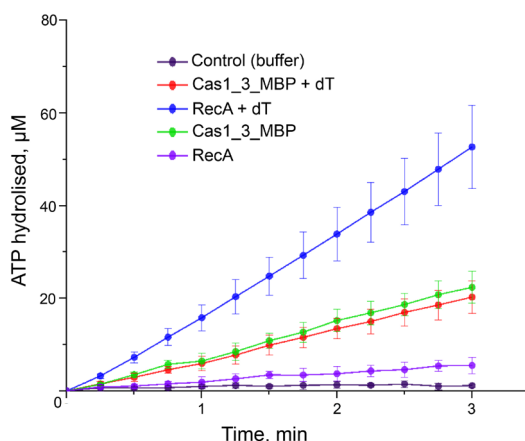


Рис. 4. Зависимости от времени количества АТФ, гидролизованного под действием белков Cas1\_3\_MBP и RecA в присутствии и в отсутствие олигонуклеотидов, состоящих из дезокситиминов (олиго-дТ (dT)), в растворе

в присутствии, так и при отсутствии олиго-дТ. Отсутствие зависимости гидролитической активности Cas1\_3\_MBP от олиго-дТ может быть связано с тем, что нам не удалось полностью избавиться от ДНК при очистке белка из биомассы клеток.

Для того чтобы убедиться, что наблюдаемый гидролиз АТФ обусловлен действием именно белка Cas1\_3\_MBP, мы устанавливали наличие примесных белков, которые могли каким-либо образом повлиять на полученный результат.

С этой целью применялся метод высоразрешающей масс-спектрометрии (см., например, статью [17]), который позволил убедиться, что белки, выделяющиеся совместно с Cas1\_3\_MBP (рис. 5), не могут вносить заметного вклада в измеренные значения скорости гидролиза АТФ.

### Заключение

Таким образом, в данной работе были определены условия получения рекомбинантной версии белка Cas1\_3 системы aCas1\_3 асгардархей, которые ранее не были кем-либо охарактеризованы. Указанная система, скорее всего, выполняет функции транспозона и является потенциальным эволюционным предшественником систем CRISPR-Cas.

Наши первоначальные результаты демонстрируют способность белка Cas1\_3 к гидролизу АТФ *in vitro*. Обнаружение АТФ-азной активности позволяет поставить вопрос о возможной роли гидролиза АТФ в жизненном цикле транспозона как мобильного генетического элемента и предшественника систем CRISPR-Cas.

Для дальнейшего объяснения механизма обнаруженной АТФ-азной активности потребуется создание новых вариантов белка Cas1\_3 с мутированными мотивами, потенциально ответственными за указанную активность.

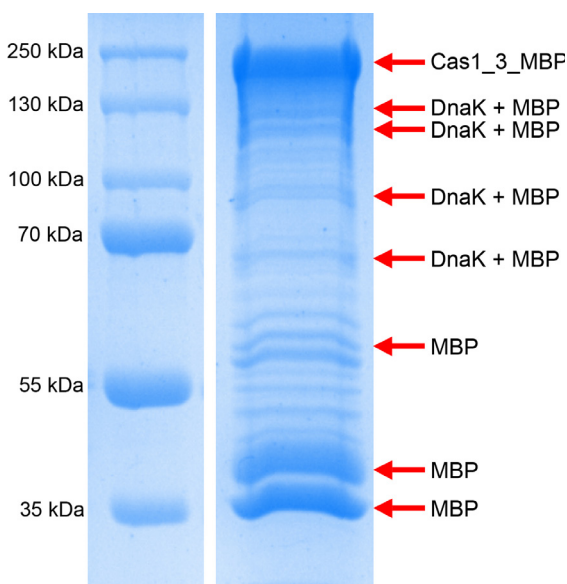


Рис. 5. Результат электрофоретического анализа пробы, полученной в результате очистки белка Cas1\_3\_MBP с помощью аффинной хроматографии. Красными стрелками обозначены пробы примесных белков, проанализированные методом масс-спектрометрии





## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Jansen R., Embden J. D., Gaastra W., Schouls L. M.** Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes // *Molecular Microbiology*. 2002. Vol. 43. No. 6. Pp. 1565–1575.
2. **Koonin E. V., Makarova K. S.** Origins and evolution of CRISPR-Cas systems // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2019. Vol. 374. No. 1772. P. 20180087.
3. **Krupovic M., Shmakov S., Makarova K. S., Forterre P., Koonin E. V.** Recent mobility of casposons, self-synthesizing transposons at the origin of the CRISPR-Cas immunity // *Genome Biology and Evolution*. 2016. Vol. 8. No. 2. Pp. 375–386.
4. **Faure G., Shmakov S. A., Yan W. X., Cheng D. R., Scott D. A., Peters J. E., Makarova K. S., Koonin E. V.** CRISPR-Cas in mobile genetic elements: Counter-defence and beyond // *Nature Reviews Microbiology*. 2019. Vol. 17. No. 8. Pp. 513–525.
5. **Makarova K. S., Wolf Y. I., Shmakov S. A., Liu Y., Li M., Koonin E. V.** Unprecedented diversity of unique CRISPR-Cas-related systems and Cas1 homologs in Asgard archaea // *The CRISPR Journal*. 2020. Vol. 3. No. 3. Pp. 156–163.
6. **Sigrist C. J., de Castro E., Cerutti L., Cuche B. A., Hulo N., Bridge A., Bougueleret L., Xenarios I.** New and continuing developments at PROSITE // *Nucleic Acids Research*. 2013. Vol. 41. No. D1, 1 January. Pp. D344–D347.
7. **Marchler-Bauer A., Zheng C., Chitsaz F., et al.** CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure // *Nucleic Acids Research*. 2013. Vol. 41. No. D1, 1 January. Pp. D348–D352.
8. **Finn R. D., Bateman A., Clements J., et al.** Pfam: the protein families database // *Nucleic Acids Research*. 2014. Vol. 42. No. D1, 1 January. Pp. D222–D230.
9. **Gibson D. G., Young L., Chuang R.Y., Venter J. C., Hutchison C. A. 3rd, Smith H. O.** Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases // *Nature Methods*. 2009. Vol. 6. No. 5. Pp. 343–345.
10. **Васильева А. А., Алюкас С. А., Селькова П. А., Арсениев А. Н., Чернова В. Е., Мушарова А. С., Климук Е. И., Ходорковский М. А., Северинов К. В.** Нуклеазы CRISPR-Cas II типа: алгоритм поиска и *in vitro* характеристика // *Молекулярная биология*. 2023. Т. 57. № 3. С. 546–560.
11. **Laemmli U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227. No. 5259. Pp. 680–685.
12. **Kreuzer K. N., Jongeneel C. V.** *Escherichia coli* phage T4 topoisomerase // *Methods in Enzymology*. 1983. Vol. 100. Pp. 144–160.
13. **Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J., Gay N. J.** Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold // *The EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*. 1982. Vol. 1. No. 8. Pp. 945–951.
14. **Ramakrishnan C., Dani V. S., Ramasarma T.** A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins // *Protein Engineering, Design, and Selection*. 2002. Vol. 15. No. 10. Pp. 783–798.
15. **Sun P., Tropea J. E., Waugh D. S.** Enhancing the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli* by using hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner // *Evans Jr., T., Xu M.Q. (Eds.) Heterologous Gene Expression in E. coli*. Book series: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 705. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press, 2011. Pp. 259–274.
16. **Kowalczykowski S. C., Clow J., Krupp R. A.** Properties of the duplex DNA-dependent ATPase activity of *Escherichia coli* RecA protein and its role in branch migration // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987. Vol. 84. No. 10. Pp. 3127–3131.
17. **Yakunina M., Artamonova T., Borukhov S., Makarova K. S., Severinov K., Minakhin L.** A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by a giant bacteriophage // *Nucleic Acids Research*. 2015. Vol. 43. No. 21. Pp. 10411–10420.

## REFERENCES

1. **Jansen R., Embden J. D., Gaastra W., Schouls L. M.**, Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *Mol. Microbiol.* 43 (6) (2002) 1565–1575.
2. **Koonin E. V., Makarova K. S.**, Origins and evolution of CRISPR-Cas systems, *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 374 (1772) (2019) 20180087.

3. Krupovic M., Shmakov S., Makarova K. S., et al., Recent mobility of casposons, self-synthesizing transposons at the origin of the CRISPR-Cas immunity, *Genome Biol. Evol.* 8 (2) (2016) 375–386.
4. Faure G., Shmakov S. A., Yan W. X., et al., CRISPR-Cas in mobile genetic elements: counter-defence and beyond, *Nature Reviews Microbiology.* 17 (8) (2019) 513–525.
5. Makarova K. S., Wolf Y. I., Shmakov S. A., et al., Unprecedented diversity of unique CRISPR-Cas-related systems and Cas1 homologs in Asgard archaea, *CRISPR J.* 3 (3) (2020) 156–163.
6. Sigrist C. J., de Castro E., Cerutti L., et al., New and continuing developments at PROSITE, *Nucl. Acids Res.* 41 (D1, 1 Jan) (2013) D344–D347.
7. Marchler-Bauer A., Zheng C., Chitsaz F., et al., CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure, *Nucl. Acids Res.* 41 (D1, 1 Jan) (2013) D348–352.
8. Finn R. D., Bateman A., Clements J., et al., Pfam: the protein families database. *Nucl. Acids Res.* 42 (D1, 1 Jan) (2014) D222–D230.
9. Gibson D. G., Young L., Chuang R. Y., et al., Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases, *Nat. Methods.* 6 (5) (2009) 343–345.
10. Vasileva A. A., Aliukas S. A., Selkova P. A., et al., Type II CRISPR-Cas system nucleases: a pipeline for prediction and in vitro characterization. *Molecular Biology (Moscow).* 57 (3) (2023) 546–560 (in Russian).
11. Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227 (5259) (1970) 680–685.
12. Kreuzer K. N., Jongeneel C. V., *Escherichia coli* phage T4 topoisomerase. *Methods Enzymol.* 100 (1983) 144–160.
13. Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J., Gay N. J., Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold, *EMBO J.* 1 (8) (1982) 945–951.
14. Ramakrishnan C., Dani V. S., Ramasarma T., A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins, *Protein Eng. Des. Sel.* 15 (10) (2002) 783–798.
15. Sun P., Tropea J. E., Waugh D. S., Enhancing the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli* by using hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner, In book: Evans Jr., T., Xu M.Q. (Eds.) *Heterologous Gene Expression in E. coli*, Book series: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 705. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA (2011) 259–274.
16. Kowalczykowski S. C., Clow J., Krupp R. A., Properties of the duplex DNA-dependent ATPase activity of *Escherichia coli* RecA protein and its role in branch migration, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 (10) (1987) 3127–3131.
17. Yakunina M., Artamonova T., Borukhov S., et al., A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by a giant bacteriophage, *Nucl. Acids Res.* 43 (21) (2015) 10411–10420.

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**АБРАМОВА Марина Викторовна** – инженер-исследователь лаборатории молекулярной микробиологии Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
 abramova.mv07@gmail.com  
 ORCID: 0000-0003-4310-1189

**МАЛЫХ Анастасия Сергеевна** – лаборант-исследователь лаборатории молекулярной микробиологии Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
 malyh.as@edu.spbstu.ru

**ГАТИЕВА Яна Маратовна** – лаборант-исследователь лаборатории молекулярной микробиологии Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
yana.gatieva6@gmail.com

**КАЗАЛОВ Максим Алексеевич** – инженер-исследователь лаборатории молекулярной микробиологии Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
maksim.kazalov@gmail.com  
ORCID: 0000-0001-5640-8142

**СЕЛЬКОВА Полина Анатольевна** – инженер-исследователь лаборатории молекулярной микробиологии Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
polina.nanobio@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-9562-1998

**ЯКИМОВ Александр Павлович** – кандидат физико-математических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
yaleks@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-0462-1157

**ВАСИЛЬЕВА Александра Андреевна** – инженер-исследователь лаборатории молекулярной микробиологии Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург; инженер комплекса НБИКС-природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
daucussativus7@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-0070-4898

**АРСЕНИЕВ Анатолий Николаевич** – научный сотрудник Научно-исследовательского комплекса «Нанобиотехнологии» Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург; лаборант-исследователь комплекса НБИКС-природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
arsenievanatoly@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-0901-4188

**ХОДОРКОВСКИЙ Михаил Алексеевич** – кандидат физико-математических наук, директор Научно-исследовательского комплекса «Нанобиотехнологии» Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
khodorkovskii@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-0562-0156

#### THE AUTHORS

**ABRAMOVA Marina V.**

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
abramova.mv07@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-4310-1189

**MALYKH Anastasia S.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
anastasiyaa2s3d4f5g6@gmail.com

**GATIEVA Iana M.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
yana.gatieva6@gmail.com

**KAZALOV Maksim A.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
maksim.kazalov@gmail.com  
ORCID: 0000-0001-5640-8142

**SELKOVA Polina A.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
polina.nanobio@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-9562-1998

**YAKIMOV Alexander P.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
yaleks@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-0462-1157

**VASILEVA Aleksandra A.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
*Complex of NBICS Technologies, National Research Center "Kurchatov Institute" (Moscow)*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
daucussativus7@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-0070-4898

**ARSENIEV Anatolii N.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,*  
*Complex of NBICS Technologies, National Research Center "Kurchatov Institute" (Moscow)*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
arsenievanatoly@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-0901-4188

**KHODORKOVSKII Mikhail A.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
khodorkovskii@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-0562-0156

*Статья поступила в редакцию 08.12.2023. Одобрена после рецензирования 26.02.2024.*  
*Принята 26.02.2024.*

*Received 08.12.2023. Approved after reviewing 26.02.2024. Accepted 26.02.2024.*