

Использование CRISPR-Cas-системы редактирования геномов бактериальных клеток в прикладных целях*

Бурное развитие направления исследований, связанного с геномным редактированием, привело к созданию ряда эффективных методологий, позволяющих конструировать биологические объекты с новыми, полезными для человека свойствами, которые все чаще находят свое применение в биологии, медицине, аграрном секторе и промышленности.

Целью геномного редактирования является модификация отдельных участков геномов бактерий, что позволяет исследовать генетику, лежащую в основе метаболических особенностей бактерий, и модифицировать их геном для последующего использования в прикладных целях.

Редактирование геномов бактерий основано на использовании программируемых нуклеаз из систем CRISPR-Cas, прежде всего нуклеазы Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (spCas9), которые в комплексе с направляющей (гидовой) РНК (гРНК) распознают мишень ДНК. Матрица для рекомбинации обычно представлена последовательностью, которая содержит модификации сайта-мишени, а также фланкирующие участки ДНК. Разрыв ДНК неотредактированных мишеней нуклеазами CRISPR-Cas-системы чаще всего приводит к гибели бактериальных клеток, что позволяет фактически использовать этот феномен для селекции тех бактерий, у которых произошла рекомбинация.

Существует достаточно большой спектр используемых методических подходов для редактирования геномов, которые могут быть отнесены к одной из трех различных стратегий, а выбор каждой из них обусловлен типом матрицы, используемой для рекомбинации.

Одна из стратегий связана с использованием линейной ДНК в качестве матрицы для рекомбинации, а также гетерологичной ДНК-рекомбиназы фагового происхождения. Данная методология подразумевает первоначальную трансформацию плазмиды, содержащей систему для осуществления рекомбинации, затем индукцию экспрессии рекомбиназы и, наконец, совместную трансформацию линейной матрицы ДНК и плазмиды или нескольких плазмид, кодирующих CRISPR-нуклеазы и гидовую РНК. В исследовательской практике используются несколько рекомбиназ, например фермент системы X-Red или рекомбиназа RecT, которая должна быть получена только из родственных для бактерии фагов.

Следующая стратегия подразумевает использование в качестве матрицы для рекомбинации плазмидную ДНК. При этом матрица для осуществления рекомбинации содер-



жится либо на той же плазмиде, что и система CRISPR-Cas, либо на отдельной плазмиде. Для осуществления рекомбинации могут быть использованы как гетерологичные рекомбиназы, так и собственные механизмы рекомбинации бактериальных клеток. К настоящему времени с использованием плазмидной матрицы без гетерологичной рекомбиназы исследователям удалось успешно провести редактирование геномов таких микроорганизмов, как *Escherichia coli*, а также родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* и *Staphylococcus*. Использование эндогенного механизма для гомологичной рекомбинации упрощает процесс редактирования, так как для этого требуется использование только одного или двух плазмидных векторов, содержащих матрицу для редактирования и систему CRISPR-Cas. Однако этот механизм может отсутствовать или быть недостаточно активен у некоторых бактерий, что потребует идентификации рекомбиназ, функционирующих у конкретного вида бактерий.

Существует стратегия для редактирования на основе CRISPR-Cas, основанная на модификации геномов путем негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ) – основного способа репарации двухцепочечных разрывов ДНК, вызванных системой CRISPR-Cas. Такой способ может быть особенно полезным при введении мутаций, обуславливающих снижение жизнеспособности клетки. У бактерий NHEJ зависит от двух белков – Ku и LigD, действие которых часто приводит к неспецифическим мутациям, вставкам или делециям. Следует иметь в виду, что только четверть прокариот, по различным оценкам, кодируют белки Ku и гиперэкспрессия генов *UgD* и *Ku* может быть цитотоксична для бактерий, что приводит к мутациям вне мишени из-за репарации спонтанных разрывов двухцепочечной ДНК. Оценка этой мето-

*На основе обзорных материалов сотрудников Центра геномных исследований мирового уровня по биологической безопасности А.В.Поповой, В.А.Баннова и Д.Ю.Гущина.

дологии говорит о том, что необходимы дополнительные исследования, использующие данную стратегию для полной реализации ее потенциала в отношении редактирования бактериальных геномов.

Необходимо отметить, что в настоящее время не существует преобладающей стратегии по редактированию бактериальных геномов и выбор методологии зависит от непосредственно поставленной исследовательской задачи, целевого местоположения мутаций и используемого штамма.

Одной из первых, хорошо охарактеризованных одно-субъединичных эффекторных нуклеаз с относительно простой последовательностью PAM (protospacer adjacent motif, конститутивная часть мишени ДНК, короткая последовательность из 2–5 нуклеотидов, прилегающая к протоспейсеру) и стабильной экспрессией в клетках различных организмов является *spCas9*. Однако избыточная экспрессия *spCas9* может быть цитотоксичной для бактериальных клеток, что создает потенциальный барьер для широкого использования данной нуклеазы с целью геномного редактирования.

В настоящее время рассматривается несколько подходов для решения проблемы цитотоксичности *spCas9*. Одним из них является использование индуцибельных систем экспрессии *spCas9*, чтобы гарантировать отсутствие мишень-зависимой гибели клетки в отсутствие индуктора. В случае мутации одного из каталитических остатков *spCas9* нуклеаза становится способной разрезать только одну нить ДНК. При использовании *Cas9*-«никазы» (*nCas9*) было показано эффективное редактирование генома в тех случаях, когда использование *spCas9* не приводило к необходимому результату. Однако на сегодняшний день требуется проведение дополнительных исследований, чтобы понять механизм редактирования генома с помощью *nCas9* и исследовать возможности по улучшению редактирования с ее использованием. Одной из альтернатив *spCas9* является использование нуклеазы CRISPR типа V-A *CasI2a*, которая может являться удобным инструментом для эффективного геномного редактирования на основе CRISPR-Cas, хотя необходимо проведение дополнительных исследований для более полного понимания преимуществ и ограничений использования данной нуклеазы.

Недавно разработан альтернативный подход для редактирования геномов на основе использования модифицированных нуклеаз CRISPR-Cas, называемых редакторами основа-

ний. Редакторы оснований, как правило, содержат химеры *dCas9* или *nCas9* и домены цитидин-деаминазы и преобразуют цитидины в урацилы на нецелевой цепи в определенном участке рядом с PAM. Редакторы оснований были использованы для редактирования бактериальных геномов *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Clostridium beijerinckii* с целью внесения точечных мутаций. Метод с использованием редакторов оснований достаточно прост, поскольку он требует трансформации только одной плазмиды, содержащей модифицированную нуклеазу CRISPR и rPHK.

Таким образом, для осуществления редактирования генома бактерий с помощью системы CRISPR-Cas эффективность трансформации в культивируемом штамме должна быть достаточно высокой, чтобы обеспечить доставку как компонентов CRISPR-Cas, так и компонентов, необходимых для гомологичной рекомбинации. В связи с этим разработка более эффективных рекомбиназ, а также регулируемых промоторов в интересующем штамме является важной задачей, решение которой будет способствовать повышению эффективности геномного редактирования.

Для возбудителей бактериальных инфекций из группы особо опасных системы генетического редактирования, позволяющие получать штаммы с новыми, важными для иммунопрофилактики свойствами, еще недостаточно хорошо разработаны. Это еще предстоит сделать на основе детального изучения генетических особенностей возбудителей и применимости к ним технологий на основе CRISPR-Cas-редактирования в различных вариантах. Важной задачей в этой сфере является также обеспечение возможности разработки на основе современных генетических подходов, описанных выше, новых методологий достоверной элиминации опасных возбудителей из организма человека, пребывающих в активном или dormantном состоянии, что является одной из ключевых задач при обеспечении биологической безопасности.

*Руководитель Центра геномных исследований
мирового уровня по обеспечению биологической
безопасности и технологической независимости,
Директор ФБУН «Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
Роспотребнадзора,
академик РАН И.А.Дятлов*