

# Стратегии редактирования и модификации геномов бактериальных вирусов

А.С.Щурова<sup>1</sup>, В.А.Баннов<sup>2</sup>, А.В.Попова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

В последние десятилетия серьезной проблемой для систем здравоохранения разных стран мира является широкое распространение бактериальных возбудителей, устойчивых к различным антимикробным препаратам. Возможным подходом для решения данной проблемы является использование бактериофагов – вирусов, специфически взаимодействующих с бактериальными клетками, а также ферментов и белков, закодированных в их геномах. Развитие технологий геномного редактирования, в том числе и на основе систем CRISPR-Cas, обуславливает возможность создания генно-инженерных или рекомбинантных фаговых частиц с заданными свойствами, важными для дальнейшего практического применения. В данном обзоре мы рассматриваем вопросы, связанные с характеристикой бактериофагов как биологических объектов и как перспективных кандидатов для контроля распространения антибиотикорезистентных штаммов. Кроме того, мы обсуждаем современные подходы и стратегии для модификации геномов бактериофагов с помощью различных методов геномной инженерии и молекулярной биологии для решения разнообразных практических и исследовательских задач.

*Ключевые слова:* бактериофаги, редактирование геномов, гомологичная рекомбинация, CRISPR-Cas

**Для цитирования:** Щурова А.С., Баннов В.А., Попова А.В. Стратегии редактирования и модификации геномов бактериальных вирусов. Бактериология. 2020; 5(1): 48–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-48-59

## The strategy of editing and modification of the genomes of bacterial viruses

A.S.Schurova<sup>1</sup>, V.A.Bannov<sup>2</sup>, A.V.Popova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

In recent decades, a major problem for health systems around the world is the wide spread of bacterial pathogens that are resistant to various antimicrobial agents. A possible approach to solving this problem is the use of bacteriophages, viruses that specifically infect bacterial cells, as well as enzymes and proteins encoded in their genomes. The development of genomic editing technologies, including those based on CRISPR-Cas editing, makes it possible to create genetically engineered or recombinant phage particles with desired properties that are important for further practical application. In this review, we consider issues related to the characterization of bacteriophages as biological objects and as promising candidates for controlling the spread of antibiotic-resistant bacterial strains. We discuss modern approaches and strategies for modifying the phage genomes using various methods of genetic engineering and molecular biology to solve a variety of practical and research problems.

*Keywords:* bacteriophages, phage genome editing, CRISPR-Cas system

**For citation:** Schurova A.S., Bannov V.A., Popova A.V. The strategy of editing and modification of the genomes of bacterial viruses. Bacteriology. 2020; 5(1): 48–59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-48-59

**Н**а сегодняшний день проблема стремительно увеличивающегося числа множественно устойчивых к антимикробным препаратам бактериальных штаммов настоятельно требует поиска новых способов контроля их распро-

странения. В особенности это касается возбудителей внутрибольничных инфекций, характеризующихся резистентностью к большинству доступных на сегодняшний день антибиотиков, устойчивостью к дезинфицирующим средствам

### Для корреспонденции:

Попова Анастасия Владимировна, старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», старший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

E-mail: popova\_nastya86@mail.ru

Статья поступила 29.02.2020 г., принята к печати 27.03.2020 г.

### For correspondence:

Anastasia V. Popova, senior researcher, the Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University) and State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

E-mail: popova\_nastya86@mail.ru

The article was received 29.02.2020, accepted for publication 27.03.2020

и антисептикам, толерантностью к детергентам, ультрафиолетовому облучению, высушиванию, способностью к образованию биопленок на различных биотических и абиотических поверхностях [1–3].

Разработка новых биологически активных молекул происходит недостаточно быстро в силу как научных, так и экономических причин. Химическая модификация существующих антибиотиков, действующих на уже известные мишени, не решает проблему полностью: со временем бактерии приобретают устойчивость и к модифицированным вариантам [4]. В то же время поиск новых перспективных мишеней для действия антибиотиков, а также разработка ингибиторов для новых мишеней по-прежнему остаются очень медленной и трудоемкой работой.

Возможным альтернативным подходом для решения проблемы распространения антибиотикоустойчивых штаммов является использование литических бактериофагов, а также ферментов и белков, закодированных в фаговых геномах. Кроме того, благодаря активному развитию методов геномной и геномной инженерии, в частности редактирования с использованием систем CRISPR/Cas, у разных исследовательских групп по всему миру возникает все больший интерес к созданию генно-инженерных фаговых частиц с определенными свойствами, важными, в том числе, и для последующего практического использования. С помощью различных генетических инструментов для решения как фундаментальных, так и практических задач в определенные участки геномов бактериофагов могут быть внесены мутации, фрагменты ДНК или конкретные гены, произведены замены или делеции [5, 6]. Бактериальные вирусы могут быть модифицированы с целью расширения спектра их антибактериального действия путем изменения/замены генов, кодирующих их рецептор-связывающие/распознающие белки, что открывает широкие перспективы для контроля антибиотико-резистентных микроорганизмов.

#### **Общая характеристика бактериофагов как биологических объектов и перспективных кандидатов для практического использования**

Бактериофаги (фаги) – это крупнейшая группа вирусов, инфицирующих бактерии. Фаги могут рассматриваться как облигатные паразиты на молекулярном уровне с отсутствием независимого метаболизма вне бактериальной клетки, использующие белки, ферменты и химические компоненты клеток-хозяев для своего воспроизведения. Бактериофаги являются наиболее распространенными и убиквитарными биологическими объектами биосферы нашей планеты, с популяцией, насчитывающей более чем  $10^{31}$  фаговых частиц [7, 8], и могут быть обнаружены в любых образцах окружающей среды и живых организмах, где обитают инфицируемые ими бактерии [9, 10]. Считается, что образцы водной среды могут содержать до  $10^4$ – $10^8$  вирусных частиц на миллилитр [11], а почвенные образцы –  $10^9$  на грамм почвы [12].

Бактериофаги были открыты в начале прошлого века британским микробиологом Фредериком Твортом (1915 г.) [13] и канадским сотрудником Института Пастера в Париже Феликсом д'Эрелем (1917 г.) [14], которые независимо друг от друга сообщили об обнаружении фильтруемых субстан-

ций, способных разрушать бактериальные культуры и образовывать на бактериальных газонах небольшие «стерильные пятна». Именно д'Эрель предложил назвать эти субстанции «бактериофагами» (лат. *bacteriophaga* – пожирающий бактерии).

Большинство охарактеризованных на сегодняшний день бактериофагов относятся к отряду *Caudovirales* – «хвостатых» фагов, основными структурными компонентами которых являются головка (капсид) и хвостовой отросток. На основании морфологии хвостового отростка и особенностей организации геномов представители порядка *Caudovirales* подразделяются Подкомитетом по таксономии вирусов бактерий и архей (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) на несколько семейств, включающих фаги с длинными сократимыми хвостовыми отростками (например, представители семейства *Myoviridae*), с длинными несократимыми хвостовыми отростками (представители семейства *Siphoviridae*), с короткими несократимыми хвостовыми отростками (*Podoviridae* и *Autographiviridae*), с длинными сократимыми хвостовыми отростками и сложно организованным аппаратом адсорбции, представленным несколькими выростами или хвостовыми шипами (*Ackermannviridae*) [15].

По конечному результату инфекции бактериальной клетки среди представителей отряда *Caudovirales* выделяют две группы: вирулентные (литические) и умеренные фаги. Жизненный цикл вирулентных фагов включает следующие основные этапы: 1) адсорбция фага на бактериальной клетке-хозяине за счет специфического взаимодействия рецептор-связывающих/распознающих фаговых белков с поверхностными структурами бактериальных клеток; 2) проникновение в клетку фаговой ДНК; 3) внутриклеточное развитие, включающее репликацию ДНК и синтез структурных компонентов, а также сборку фаговых частиц и 4) высвобождение новых частиц-потомков. В результате такой инфекции бактерия-хозяин погибает [16]. Поэтому именно вирулентные бактериофаги представляют наибольший интерес для контроля распространения бактериальных патогенов, в том числе и антибиотико-резистентных (рис. 1).

Умеренные бактериофаги способны воспроизводить себя путем такого же литического цикла, с помощью которого обеспечивается быстрое образование большого числа копий фаговых частиц, однако развитие этих фагов может пойти и по другому пути. В этом случае бактериофаг может интегрироваться в хромосому клетки-хозяина или присутствовать в клетке в свободном плазмидоподобном состоянии, реплицируясь и распределяясь по дочерним бактериальным клеткам в строгом соответствии с репликацией и делением бактерии [16, 17] (рис. 1).

Как антибактериальные агенты бактериофаги обладают рядом преимуществ: вследствие специфичности своего действия высоковирулентные фаги не влияют на нормальную микрофлору, соответственно, не вызывают развития дисбактериозных процессов; фаги способны экспоненциально реплицироваться в инфекционном очаге и увеличивать свою численность до тех пор, пока не будут уничтожены все чувствительные к ним бактериальные клетки; бактериофаги можно использовать наряду с другими антибактериальными агентами, в том числе для борьбы с множественно устойчивыми микроорганизмами [19–22].

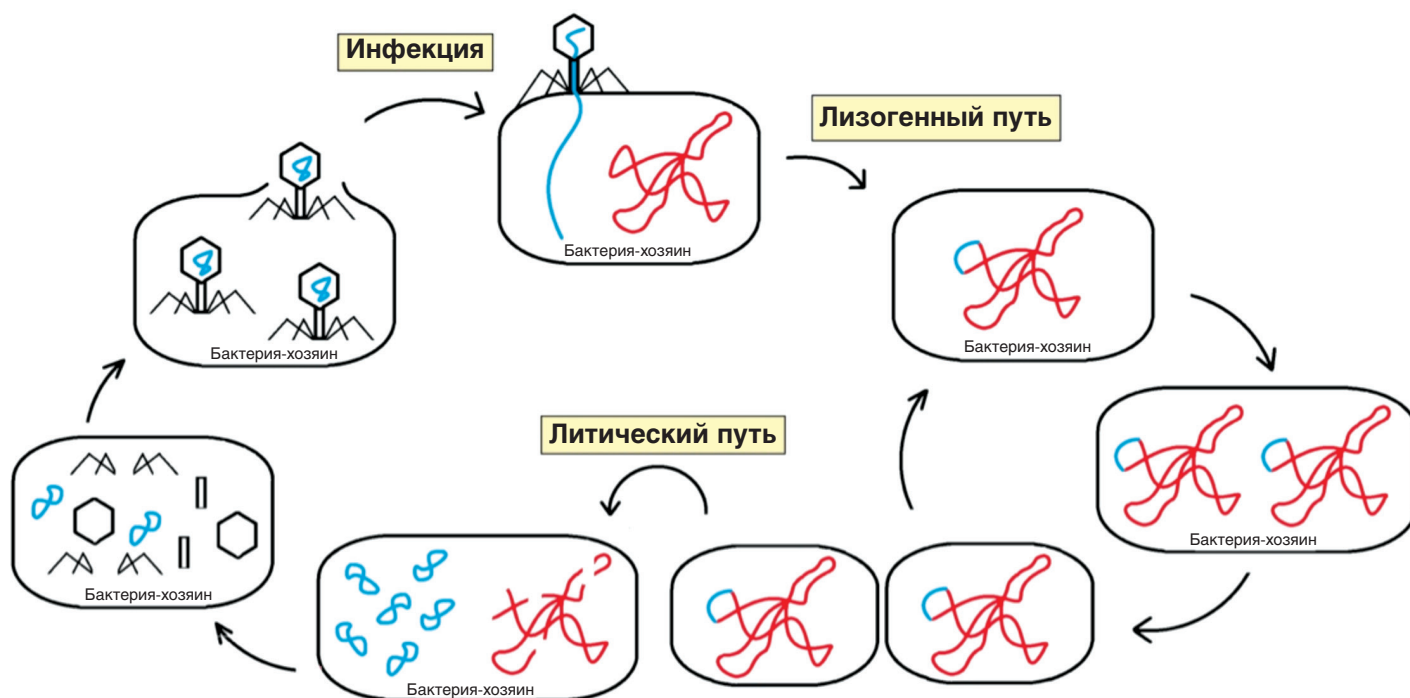


Рис. 1. Схематическое изображение жизненного цикла бактериофагов (Reyes A. et al. [18], с модификацией).

Для вирулентных бактериофагов характерно множество молекулярных механизмов, позволяющих им успешно и быстро инфицировать бактериальных хозяев, развиваться в них, подавляя или модифицируя жизненно важные клеточные процессы, что, в конечном итоге, приводит к гибели инфицированных бактерий. Особую роль в этом играют фаговые белки, экспрессируемые на ранних стадиях инфекции. Эти белки связываются с хозяйскими белками-компонентами функционально важных клеточных систем и быстро и эффективно ингибируют их или переориентируют метаболизм бактериальной клетки на выработку фагового потомства [23]. Кроме того, в геномах всех литических фагов закодированы эндолизины – пептидогликанлизирующие ферменты, эффективно и быстро разрушающие пептидогликановый слой клеточных стенок бактерий на поздней стадии инфекции. Нарботка эндолизинов запускается одновременно с синтезом и встраиванием в мембрану специальных регуляторных белков – холинов (мембрано-проникающих регуляторных белков лизиса), способствующих проникновению эндолизинов через плазматическую мембрану к пептидогликановому слою, что приводит к тотальному разрушению клетки и выходу фаговых частиц наружу [8, 23]. Также геномы многих бактериофагов содержат гены, кодирующие белки с полисахариддеполимеризующей активностью. Это высокоспецифичные деполимеразы (часто структурные белки, например выросты хвостовых отростков или хвостовые шипы бактериофагов), ответственные за расщепление капсульных полисахаридов и прикрепление к бактериальной клетке-хозяину [23, 24].

Таким образом, бактериофаги, а также ферменты и белки, закодированные в фаговых геномах, являются перспективными агентами для контроля распространения различных возбудителей бактериальных инфекций, в том числе множественно-устойчивых к различным антимикробным

препаратам. В связи с этим в последние десятилетия как в нашей стране, так и за рубежом возобновился интерес к использованию бактериофагов как антимикробных агентов. Развитие фаготерапии в значительной степени обусловлено не только более глубоким пониманием биологии фагов, но также реально существующим прогрессом в молекулярной биологии, биотехнологии и биохимии. В России препараты бактериофагов официально разрешены и используются для лечения и профилактики острых кишечных инфекций – дизентерии, брюшного тифа и сальмонеллеза, а также для лечения гнойно-септических и интестинальных заболеваний различной локализации, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, относящимися к родам *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter* [25].

Однако, несмотря на очевидный интерес к фаготерапии во всем мире, остается круг нерешенных проблем, затрудняющих использование бактериофагов в качестве лекарственных антимикробных средств. В частности, это связано с отсутствием обширных коллекций строго вирулентных бактериофагов с определенным набором характеристик, важных для дальнейшего практического использования. Вследствие того, что фаги высокоспецифичны к определенным штаммам внутри конкретного вида бактерий, необходимо создание препаратов-коктейлей, состоящих из различных вирулентных фагов, инфицирующих актуальных для конкретного отделения/больницы/города/страны бактериальных возбудителей. Регистрация подобных препаратов для терапевтического применения может быть достаточно сложной задачей из-за значительного разнообразия фагов с точки зрения их структуры, жизненного цикла и организации их геномов [26, 27]. Кроме того, бактериальные клетки могут формировать устойчивость к инфицированию бактериофагами, что может быть обусловлено раз-

личными механизмами, в частности – утратой/модификацией поверхностных структур, с которыми взаимодействуют рецептор-распознающие/связывающие фаговые белки [27–29].

С помощью стремительно развивающихся методов геномной инженерии можно преодолеть некоторые из вышеперечисленных ограничений [30]. Основой для создания генно-инженерных фагов с заданными свойствами является постоянно растущее количество полногеномных последовательностей бактериофагов в общедоступных базах данных [31, 32], а также исследования, касающиеся изучения структурных компонентов фаговых частиц [33–37] и особенностей взаимодействия между фагами и их бактериальными хозяевами [38–40].

### Методы редактирования и модификации геномов бактериофагов

Для редактирования геномов бактериофагов, в том числе с целью преодоления возможных ограничений их практического применения, используют различные подходы, которые будут подробно рассмотрены в данном разделе.

#### Гомологичная рекомбинация

Одним из широко распространенных методов модификации геномов является гомологичная рекомбинация в клетках бактериальных хозяев, которая может происходить между двумя гомологичными последовательностями ДНК, длиной не менее 23 п.н. (пар нуклеотидов) [41, 42]. Гомологичная рекомбинация является основным механизмом репарации ДНК бактерий, кроме того, путем гомологичной рекомбинации может происходить обмен попавшей внутрь клетки гетерологичной ДНК с их собственной ДНК при наличии гомологичных участков [43, 44]. Соответственно, механизм, лежащий в основе гомологичной рекомбинации, может быть использован для целенаправленного редактирования геномов бактериофагов, а именно вставок, замен, делеций (уда-

лений) фрагментов ДНК и конкретных генов, а также внесения мутаций в определенные участки генома.

Например, для вставки гетерологичного гена / фрагмента ДНК в геном конкретного фага необходимо, чтобы данный ген / фрагмент был фланкирован гомологичными участками, которые и определяют место его вставки в геном фага (рис. 2). При этом гетерологичный ген / фрагмент ДНК вводится в бактериальную клетку в составе плазмидного вектора (донорной плазмиды). Затем бактериальная клетка, несущая донорную плазмиду, инфицируется фагом, в геноме которого необходимо произвести модификацию. И далее между ДНК фага и донорной плазмидой (матрицей) происходит гомологичная рекомбинация, за счет чего гетерологичный ген / фрагмент ДНК встраивается в генетический материал фага, который затем упаковывается в новые фаговые частицы [5, 45]. Аналогичным образом подход, основанный на гомологичной рекомбинации между матрицей и фаговой ДНК, может быть использован для получения рекомбинантных фагов с заменами, делециями генов и мутациями в конкретном участке генома фага [5, 6].

После попадания фаговой ДНК внутрь бактериальной клетки, содержащей донорную плазмиду со вставкой гетерологичного участка (отмечен красным цветом) и плечами для рекомбинации (участками размером 40–200 п.н., которые гомологичны той части генома фага, где планируется вставка), происходит рекомбинация между плазмидой-матрицей и генетическим материалом фага, с последующим формированием рекомбинантных фаговых частиц.

В целом частота рекомбинации составляет от  $10^{-10}$  до  $5 \times 10^{-3}$  [5, 6], поэтому для облегчения скрининга рекомбинантных фагов гетерологичный участок ДНК (для вставки, делеции, замены или внесения мутации) может быть ассоциирован с генами флуоресцентных белков (например, GFP) или люциферазы [46–48].

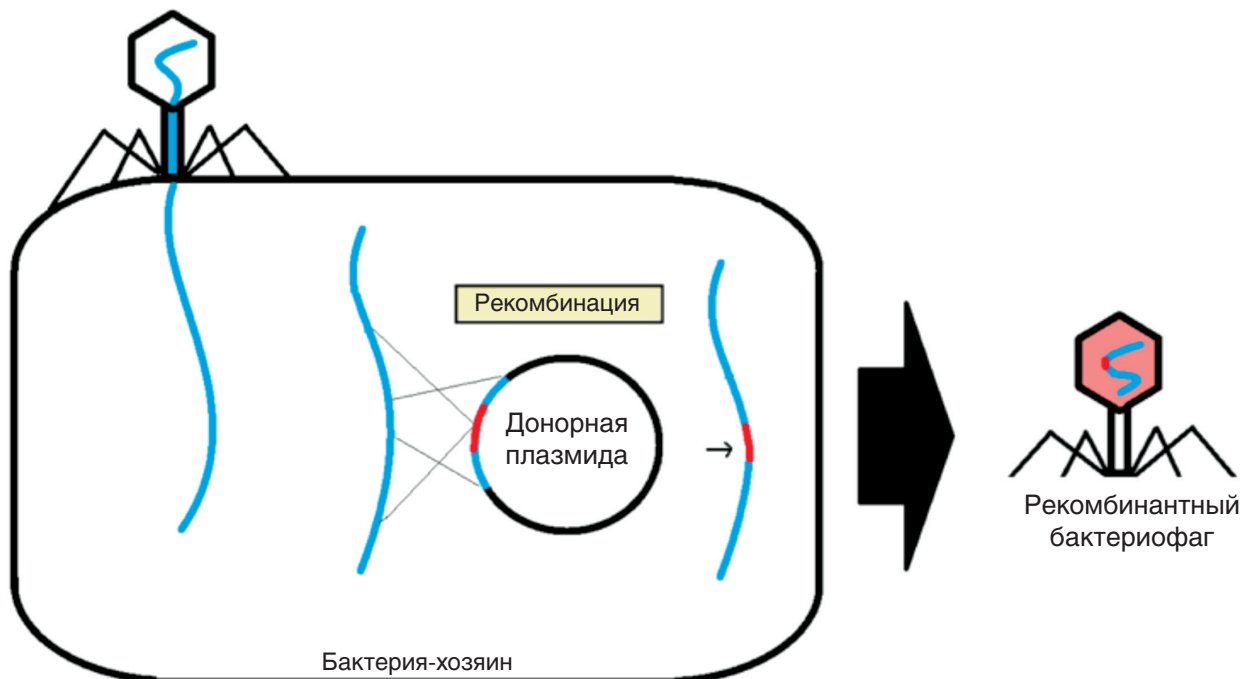


Рис. 2. Получение рекомбинантных фагов путем гомологичной рекомбинации.



Путем гомологичной рекомбинации был произведен обмен генов, кодирующих длинные хвостовые фибриллы (gp37 и gp38) фага T2, специфичного к штамму *Escherichia coli* K-12, на гены хвостовых фибрилл фага PP01, специфически инфицирующего *E. coli* O157:H7. При этом рекомбинантный бактериофаг T2ppD1 (несущий гены, кодирующие gp37 и gp38 фага PP01) приобрел способность инфицировать тот же круг бактериальных хозяев, что и фаг PP01, но утратил способность инфицировать *E. coli* K-12 [49]. Такой же подход использовался в работе Mahichi et al. для расширения спектра антибактериальной активности фага T2. Поскольку бактериофаг IP008 обладал более широким спектром антибактериальной активности по сравнению с фагом T2 (инфицировал 33% против 7% изолятов *E. coli* соответственно), путем гомологичной рекомбинации была произведена замена генов gp37 и gp38 фага T2 на соответствующие гены фага IP008, что привело к тому, что спектр антибактериальной активности модифицированного фага T2 стал аналогичным спектру фага IP008 [50].

### Получение рекомбинантных фагов путем совместной электропорации фаговой ДНК и матрицы для рекомбинации

Впервые этот методологический подход, основанный на рекомбинации между электропорированной внутрь бактериальной клетки фаговой ДНК и матрицей для рекомбинации (bacteriophage recombineering of electroporated DNA, BRED) был использован Marinelli et al. для модификации микобактериофагов [51, 52], а позже был применен для фагов, инфицирующих *E. coli* и *Salmonella enterica* [53, 54]. В целом BRED может быть использован для делеции, вставки или замены генов, а также внесения точечных мутаций в геном бактериофага. Суть метода заключается в совместной электропорации ДНК бактериофага и двухцепочечной ДНК(дцДНК)-матрицы в электрокомпетентные бактериальные клетки, несущие плазмиды с генами белков, обеспечивающих высокий уровень гомологичной рекомбинации, таких как белки Red-системы фага лямбда или RecE/RecT-подобные белки [51, 52] (рис. 3). Red-система – это хорошо изученная система рекомбинации фагов, состоящая из генов *gam* ( $\gamma$ ), *exo* ( $\alpha$ ) и *bet* ( $\beta$ ). Gam ингибирует экзонуклеазный комплекс RecBCD *E. coli* для предотвращения разрушения линейной дцДНК-матрицы [55]. Exo взаимодействует с концами дцДНК-матрицы и обеспечивает деградацию одной из ее цепей в направлении 5'-3', в результате чего формируется одноцепочечная ДНК(оцДНК)-матрица. Beta связывает оцДНК-матрицу с участком фагового генома, в котором будет происходить рекомбинация. дцДНК-матрица для рекомбинации, которую электропорировают вместе с ДНК фага, включает необходимый для модификации фрагмент ДНК (дополнительная вставка или фрагмент с делецией/мутацией) и гомологичные участки к локусам выше и ниже участка генома фага, в который необходимо внести изменения [52, 56]. Электропорированные таким образом бактериальные клетки смешивают с клетками дикого типа и высевают на плотные питательные среды в чашках Петри. После этого фаговые бляшки (негативные колонии), формируемые на бактериальных газонах, проверяются методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наличие необходимой модификации в геноме фагов [52]. Отмечено, что при использовании данной методологии на выходе удастся получить 10–15% рекомбинантных фаговых частиц, что значительно упрощает скрининг и отбор фагов с необходимой модификацией в геноме, однако для проведения подобных экспериментов необходимо использовать исключительно высококомпетентные бактериальные клетки [5].

Очищенная фаговая ДНК и двухцепочечная ДНК-матрица совместно электропорироваются в бактериальную клетку, с последующей рекомбинацией между их гомологичными областями (отмечены желтым цветом).

### Сборка фаговой ДНК *in vitro* и *in vivo*

Рекомбинантные бактериофаги могут быть получены и при трансформации бактериальной клетки геномной ДНК фага, содержащей желаемые мутации, вследствие ее репликации, транскрипции и трансляции и последующего формирования структурных компонентов и сборки новых фаговых частиц [6] (рис. 4).

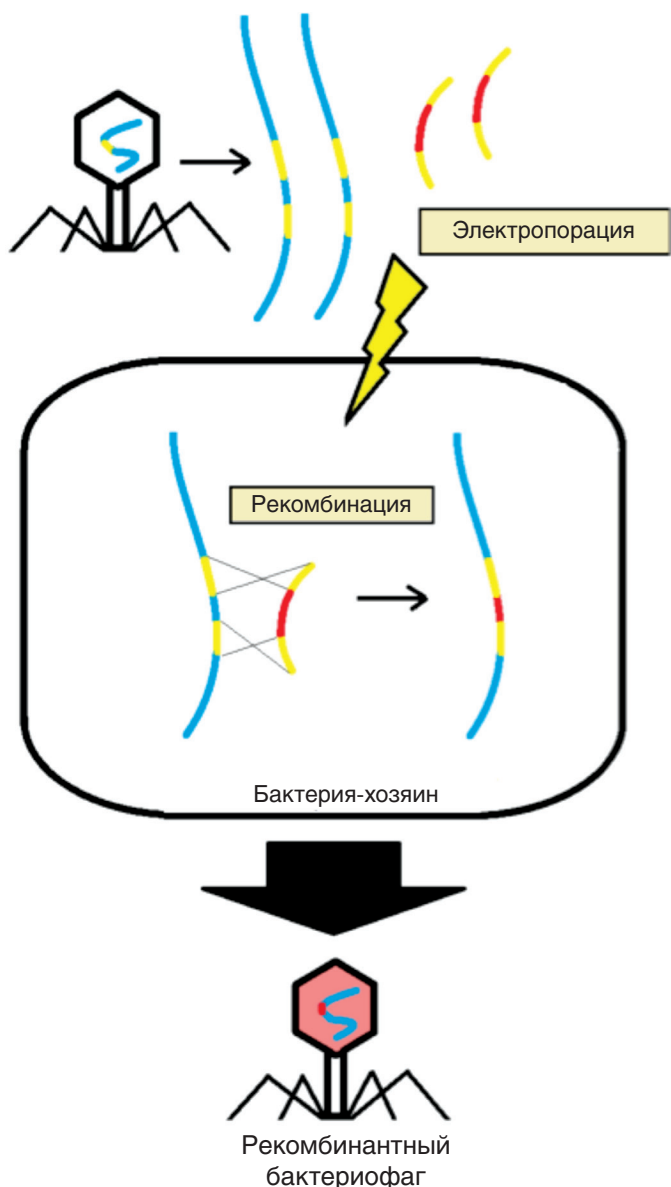


Рис. 3. Получение рекомбинантных фагов путем BRED.

При этом для фагов с небольшими геномами, таких как phiX174 (5386 п.н.), геномная ДНК может быть собрана *in vitro* с помощью полимеразной циклической сборки (polymerase cycle assembly, PCA) с использованием перекрывающихся синтетических оцДНК – олигонуклеотидов, покрывающих весь геном [57, 58]. Для фагов с геномами большего размера, таких как T7 (39937 п.н.), геномная ДНК может быть собрана *in vitro* путем лигирования отдельных фрагментов, образованных при обработке фаговой ДНК эндонуклеазами рестрикции [59].

Сборку и редактирование фаговых геномов также осуществляют с помощью трансформационно-ассоциированной рекомбинации (transformation-associated recombination, TAR) при участии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, выступающих в качестве промежуточных хозяев для генетических манипуляций. Данный подход основан на том, что участки генома бактериофага амплифицируются с помощью ПЦР таким образом, чтобы соседние фрагменты содержали перекрывающиеся гомологичные последовательности, а первый и последний фрагменты генома фага содержали

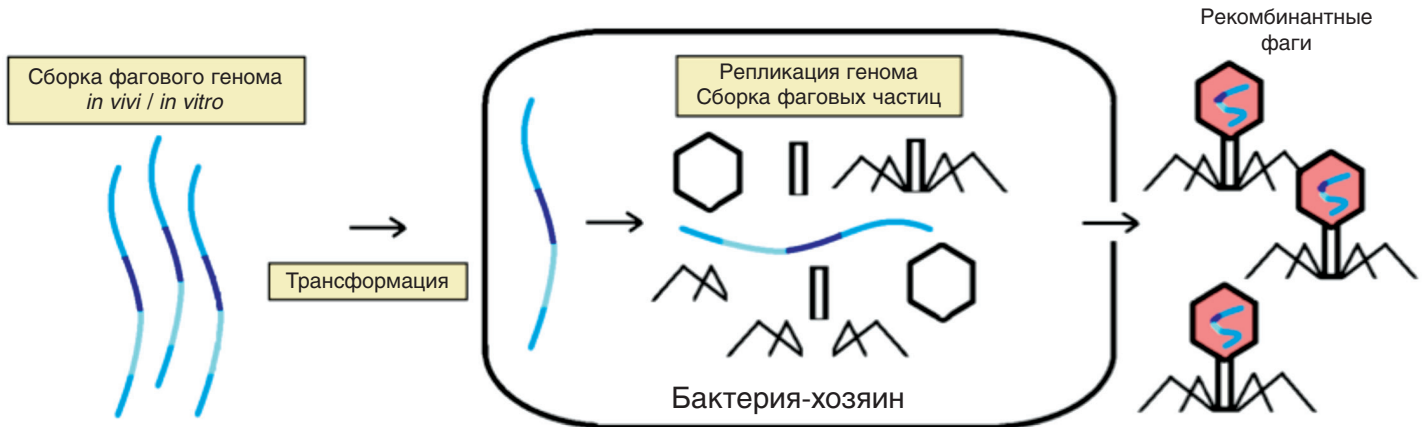


Рис. 4. Получение рекомбинантных фагов после сборки генома *in vitro* / *in vivo*. Модифицированная ДНК фага, несущая желаемые мутации/вставки/делеции/замены, трансформируется в бактерию-хозяина с последующей сборкой рекомбинантных фаговых частиц.

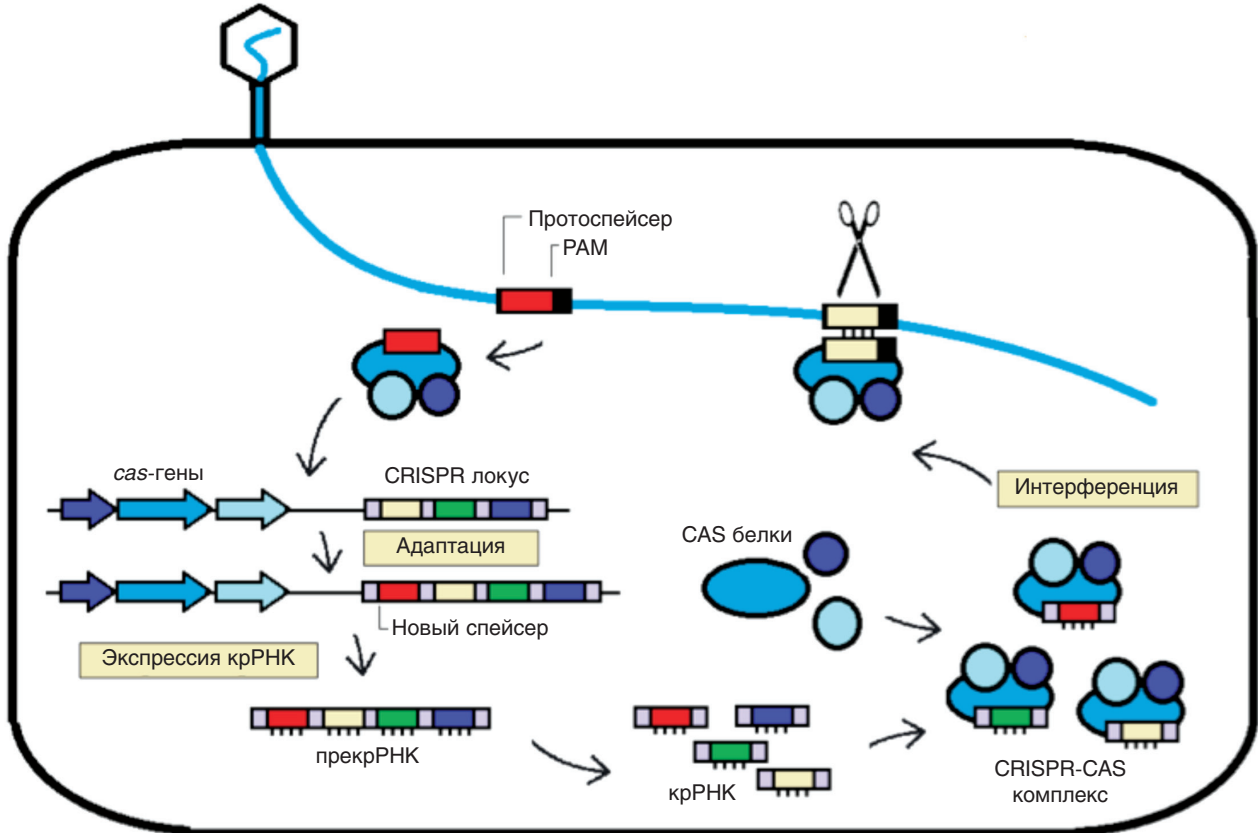


Рис. 5. Три основных этапа функционирования CRISPR-Cas систем (Samson JE et al. [29], с модификацией): адаптация (добавление новых спейсеров в CRISPR-кассету), экспрессия крПНК (транскрипция CRISPR-локуса в длинный первичный транскрипт прекрПНК – основу для формирования коротких крПНК) и интерференция (деградация чужеродной ДНК или РНК, комплементарной крПНК, за счет комплекса CRISPR-Cas).

участки, гомологичные последовательностям векторов, способных реплицироваться в дрожжах. При трансформации в дрожжевые клетки данные фрагменты объединяются в полную нуклеотидную последовательность фагового генома в составе дрожжевого вектора. Затем ДНК извлекается из дрожжей и трансформируется в бактериальные клетки-хозяева с целью образования новых рекомбинантных фаговых частиц. Таким способом может быть модифицирован любой участок генома (например, введена точечная мутация или произведены обмен/вставка нуклеотидной последовательности) [60, 61]. В частности, такой подход был использован в работе Ando et al. для модификации геномов фагов *E. coli* T3 и T7 и клебсиеллезного фага K11, в которой были представлены результаты по обмену между данными фагами генов, кодирующих хвостовые фибриллы и их компоненты, с получением пула рекомбинантных фагов с измененным кругом бактериальных хозяев [61]. В целом метод трансформационно-ассоциированной рекомбинации подходит для сборки геномов размером до 300000 п.н [62, 63].

**Редактирование геномов при помощи систем CRISPR-Cas**

Применение методологии, основанной на использовании систем CRISPR-Cas, является новым и стремительно развивающимся направлением геномной инженерии.

Еще в 1987 г. было обнаружено, что геномы *E. coli* содержат необычные короткие (30–40 п.н.) палиндромные повторяющиеся последовательности равной длины, разделенные участками уникальной ДНК – спейсерами (20–80 п.н.) [64]. Позднее было обнаружено, что аналогичные структуры встречаются в геномах 95% архей и 60% бактерий [65]. Такие группы повторов получили название CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). У прокариот CRISPR являются компонентом адаптивной «иммунной системы», которая обеспечивает защиту от

проникновения чужеродного генетического материала вирусов и плазмид.

CRISPR-система состоит из двух компонентов: CRISPR-кассет и Cas-белков (CRISPR-associated proteins) [29]. Каждая функциональная кассета содержит элементы трех типов: АТ-богатую лидерную последовательность, которая задает направление транскрипции кассеты, уникальные спейсеры, гомологичные последовательностям чужеродных ДНК (протоспейсерам), и повторы, концы которых при транскрипции могут комплементарно взаимодействовать между собой с образованием устойчивых вторичных структур – различных шпильек. Шпильки необходимы для взаимодействия с Cas-белками, обеспечивающими функционирование CRISPR-систем, в том числе и гидролиз целевой ДНК за счет своей эндонуклеазной активности [66]. Гены, кодирующие данные белки (cas-гены), локализованы в непосредственной близости от большинства CRISPR-кассет.

Система предоставляет собой защиту против вирусной ДНК [67] и РНК [68] через трехстадийный процесс, включающий в себя следующие этапы: адаптация – добавление новых спейсеров в CRISPR-кассету; экспрессия криспрРНК (крПНК, от англ. crisprRNA) – транскрипция прекрПНК с последующим процессингом коротких крПНК, нацеленных на определенную мишень, и интерференция – распознавание и деградация чужеродной ДНК или РНК (рис. 5) [29].

CRISPR-адаптация является одним из немногих механизмов направленного изменения генома в клетке: протоспейсер чужеродной ДНК встраивается в CRISPR-кассету и становится новым спейсером, при одновременной дупликации CRISPR-повтора. В большинстве случаев протоспейсеры расположены рядом с короткими мотивами длиной 2–3 нуклеотида, так называемыми PAM-последовательностями (Protospacer Adjacent Motif) [69]. PAM-мотивы могут служить

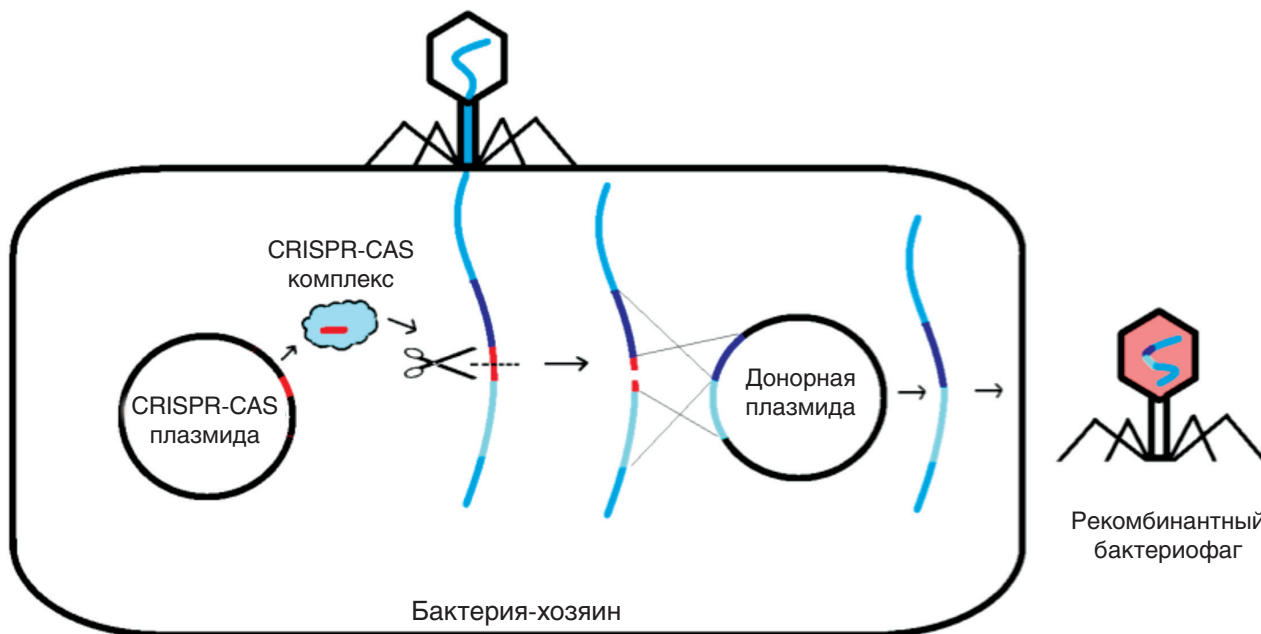


Рис. 6. Схема эксперимента по редактированию генома бактериофага (делеция гена) с помощью системы CRISPR-Cas. После проникновения фаговой ДНК в клетку CRISPR-Cas-комплекс (нуклеаза, направляемая sgРНК) осуществляет разрез в дцДНК (в том месте, где находится последовательность, комплементарная sgРНК), который впоследствии устраняется при помощи гомологичной рекомбинации с донорной плазмидой.

маркерами, позволяющими CRISPR-системе бактерий отличить собственную ДНК от чужеродной [70].

На сегодняшний день на основании различного набора генов *cas* и способа генерации крПНК системы CRISPR-Cas разделяют на 2 класса, 6 типов и 33 подтипа [71]. Для редактирования геномов преимущественно используются системы CRISPR-Cas класса 2 типа II вследствие относительной

простоты организации эффекторного комплекса. В таких системах внесение двуцепочечных разрывов обеспечивается всего одним белком – Cas9 – в том определенном участке генома (протоспейсере), который комплементарен спейсерной последовательности, присутствующей в крПНК [71].

Система CRISPR-Cas широко используется в экспериментах для модификации геномов эукариотических и прокарио-

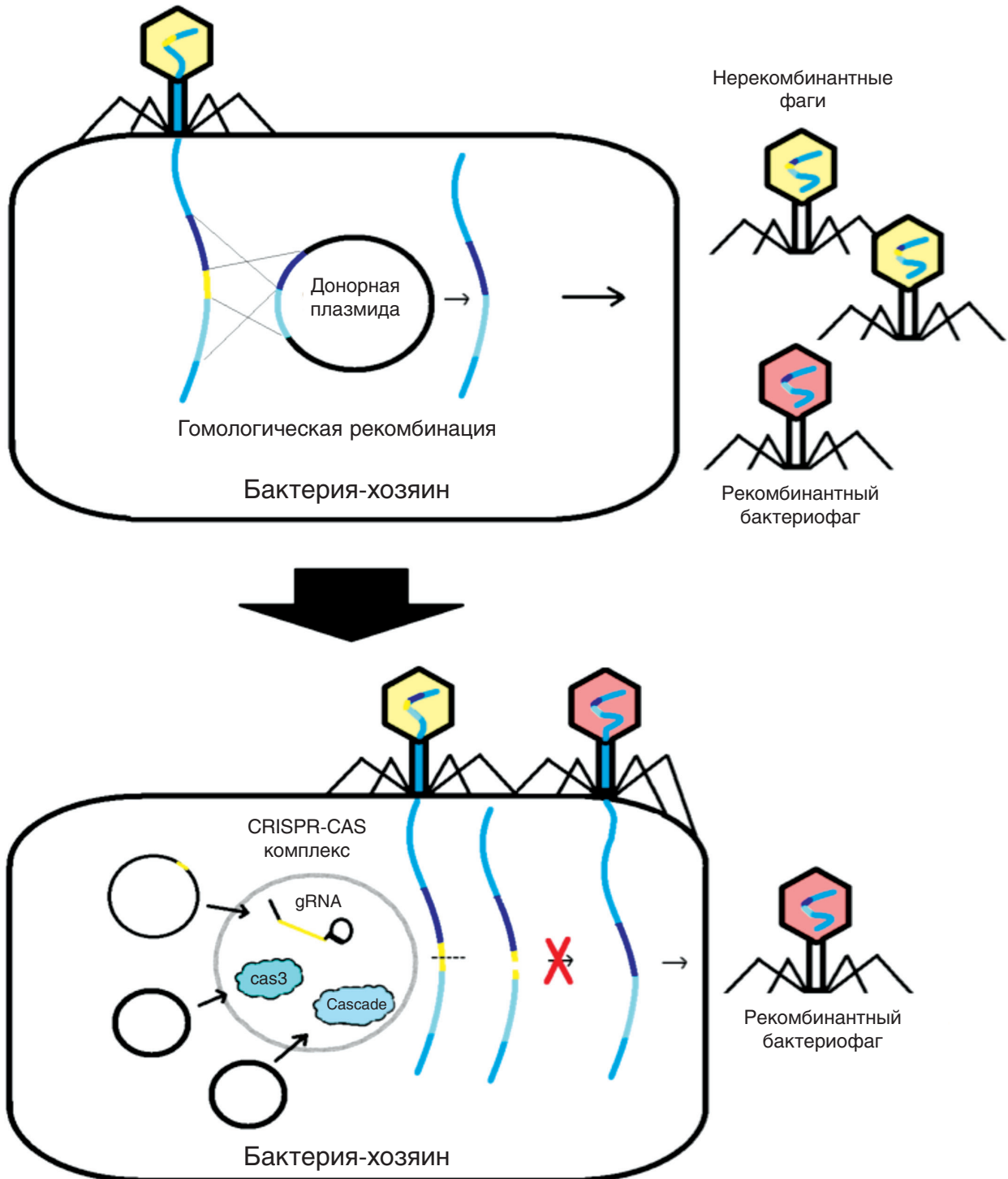


Рис. 7. Редактирование геномов бактериофагов (делеция) и отбор рекомбинантных фаговых частиц с помощью системы CRISPR-Cas I-E. После инфицирования фагом бактериальных клеток-хозяев, несущих донорные плазмиды-матрицы, происходит гомологичная рекомбинация с генетическим материалом фага. После лизиса бактериальных клеток высвобождается фаговое потомство, часть из которого представлена фагами дикого типа, а часть – рекомбинантными фагами. Для дальнейшей селекции рекомбинантных фагов полученной смесью заражают бактериальные клетки, содержащие плазмиды с компонентами комплекса CRISPR-Cas, нацеленного на область в геноме, присутствующую только у фагов дикого типа, в результате чего происходит их элиминация.



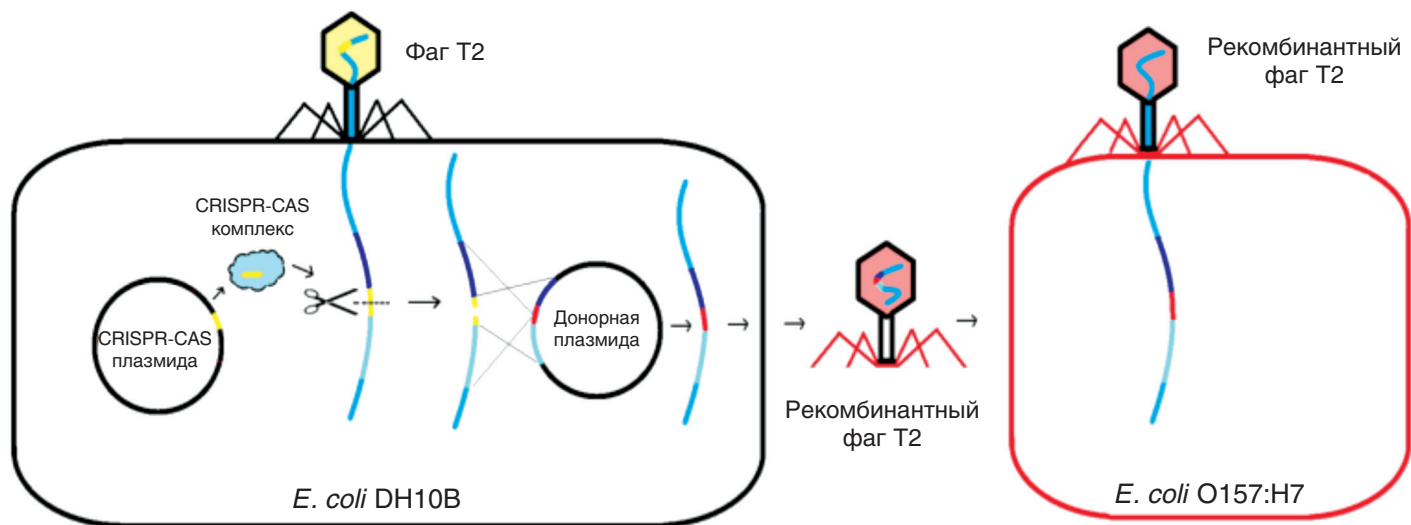


Рис. 8. Модификация генома фага T2 путем замены генов хвостовых фибрилл с помощью системы CRISPR-Cas9. При инфицировании фагом T2 штамма *E. coli* DH10B, несущего плазмиду с генами хвостовых фибрилл фага PP01, а также плазмиду с компонентами комплекса CRISPR-Cas9, в результате гомологичной рекомбинации образуются фаговые частицы, способные инфицировать штамм *E. coli* O157:H7 (штамм-хозяин фага PP01).

тических организмов. Тем не менее в настоящий момент опубликовано сравнительно мало работ, посвященных редактированию геномов бактериофагов. Ограничениями использования систем CRISPR-Cas для модификации геномов фагов могут являться различные анти-CRISPR-механизмы, обнаруженные у фагов, короткий литический цикл бактериофагов или модификация фаговой ДНК. Однако несомненным преимуществом является то, что с помощью CRISPR-Cas-систем можно вносить целенаправленные изменения в геном бактериофага в процессе заражения бактериальной клетки: точечные мутации, делеции, вставки новых генов и замены, а также осуществлять эффективный отбор рекомбинантных клонов [5, 6].

Для редактирования генома бактериофага с использованием систем CRISPR-Cas бактериальную клетку-хозяина трансформируют одной или несколькими плазмидами, содержащими гены, кодирующие: 1) эффекторный белок системы CRISPR-Cas (например, нуклеаза Cas9); 2) одиночную направляющую или гидовую РНК (sgРНК), которая связывает комплементарный ей участок целевой ДНК длиной 20 нуклеотидов (протоспейсер), обеспечивая направленную доставку нуклеазы к мотиву, прилегающему к протоспейсеру (сайт PAM, NGG, где N – любой нуклеотид), взаимодействие которого с нуклеазой приводит к эффективному разрезанию целевой последовательности ДНК. Кроме того, в бактериальную клетку электропорировать донорную плазмиду/матрицу, содержащую фрагмент ДНК со вставкой/делецией/мутацией/заменой для дальнейшей рекомбинации с фаговой ДНК внутри бактериальной клетки и последующей сборки рекомбинантных фаговых частиц (рис. 6).

Представленная на рис. 6 схема была использована для редактирования с помощью системы CRISPR-Cas9 (тип II-A) модифицированного (содержащего гликозилированный гидроксиметилцитозин) и немодифицированного генома фага T4, инфицирующего *E. coli*, а именно для внесения точечных мутаций, вставок и делеций в определенных областях генома [72]. В другой работе, используя данную схему,

была произведена делеция девяти разных генов (в том числе гена, кодирующего холин) и одного предполагаемого промотора вирулентного бактериофага *Klebsiella* phiKpS2 семейства *Podoviridae* [73].

В 2014 г. Kiro et al. опубликовали работу, в которой при помощи системы CRISPR-Cas тип I-E осуществили модификацию генома бактериофага T7 – делецию гена полинуклеотидкиназы 1.7 [74]. Кроме того, эта же система была использована для эффективного отбора рекомбинантных фагов: вновь образованные фаговые частицы добавляли к бактериальным клеткам, содержащим плазмиды, кодирующие компоненты системы CRISPR-Cas. В результате действия эффекторного комплекса, направляемого sgРНК, была проведена избирательная элиминация тех фагов, геномы которых содержали ген 1.7. При этом рекомбинантные фаги, в геномах которых отсутствовал ген полинуклеотидкиназы, оставались жизнеспособными (рис. 7).

В другой работе было показано, что система CRISPR-Cas тип I-E, идентифицированная у штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара, сохраняет функциональную активность и у представителей биовара Эль Тор. Также с помощью данной системы была показана возможность эффективного редактирования геномов литических фагов, инфицирующих *V. cholerae* [75].

В работе Hupfeld M. et al. были охарактеризованы два CRISPR-локуса (LivCRISPR-1 и LivCRISPR-2), идентифицированных в геноме *Listeria ivanovii* [76]. Сконструированная на основе LivCRISPR-1 сиквенс-специфичная программируемая нуклеазная система позволила эффективно редактировать геномы вирулентных бактериофагов, инфицирующих представителей рода *Listeria*. В результате был получен генно-инженерный листериозный бактериофаг (модифицированный фаг A511), способный индуцировать продукцию и высвобождение гидролазы, разрушающей клеточную стенку представителей рода *Staphylococcus*. Это позволило элиминировать не только листерии, но и стафилококки при совместном культивировании бактерий. Как и в работах, опи-

санных выше, редактирование и отбор мутантных фагов производили в два этапа: размножение фага на бактериях, несущих плазмиду для гомологичной рекомбинации, и отбор рекомбинантных фагов на бактериях, несущих плазмиды, кодирующие комплекс CRISPR-Cas9.

В 2018 г. Тобиас Шиллинг и соавт. разработали приложение CutSPR (<https://github.com/sdietri/cutspr>) – биоинформатический инструмент, позволяющий осуществить дизайн праймеров и генетических конструкций на основе плазмидного вектора pJOE8999 для специфического мутагенеза с помощью систем CRISPR-Cas9 [77]. С помощью данного ресурса были получены генетические конструкции с компонентами системы CRISPR-Cas, которые использовали для делеции и вставки генов в геном фага vB\_BsuP-Goe1, инфицирующего *Bacillus subtilis*.

В феврале 2019 г. была опубликована работа, посвященная редактированию генома фага T2 с использованием системы CRISPR-Cas9 с целью расширения/изменения спектра его антибактериальной активности путем замены генов, кодирующих как длинные, так и короткие хвостовые фибриллы, на соответствующие гены фага PP01, способного инфицировать *E. coli* O157:H7 [78]. В результате был получен рекомбинантный фаг T2, также способный инфицировать *E. coli* O157:H7 (рис. 8).

### Заключение

Таким образом, бактериофаги и закодированные в их геномах белки и ферменты являются кандидатами для разработки антибактериальных средств, активных против различных бактериальных возбудителей. Изучение геномного и структурного разнообразия бактериальных вирусов и использование различных методологических подходов: гомологичной рекомбинации, совместной электропорации фаговой ДНК и матрицы для рекомбинации, сборки фаговой ДНК *in vitro* и *in vivo*, в том числе с использованием промежуточного хозяина *S. cerevisiae*, а также стремительно развивающегося в последнее десятилетие CRISPR/Cas-редактирования являются основой для создания генно-инженерных фаговых частиц с заданными свойствами, включая рекомбинантные фаги с измененным/расширенным спектром антибактериальной активности, перспективные для дальнейшего практического использования.

### Информация о финансировании

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1671 от 31 октября 2019 г.) и отраслевой программы Роспотребнадзора.

### Financial support

This work was supported by a grant from the Ministry of science and higher education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2019-1671 of October 31, 2019) and the branch program of Rosпотребнадзор.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

### Литература/References

- Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces. J Clin Microbiol. 1997 Jun;35(6):1394-7.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter Baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008 Jul;21(3):538-82. DOI: 10.1128/CMR.00058-07
- Towner KJ. *Acinetobacter*: An Old Friend, but a New Enemy. J Hosp Infect. 2009 Dec;73(4):355-63. DOI: 10.1016/j.jhin.2009.03.032. Epub 2009 Aug 22.
- Potera C. Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance. Environ Health Perspect. 2013 Feb;121(2):a48-53. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.121-a48>.
- Pires DP, Cleto S, Sillankorva S, Azeredo J, Lu TK. Genetically Engineered Phages: A Review of Advances Over the Last Decade Microbiol Mol Biol Rev. 2016 Jun 1;80(3):523-43. DOI: 10.1128/MMBR.00069-15. Print 2016 Sep.
- Chen Y, Batra H, Dong J, Chen C, Rao VB, Tao P. Genetic Engineering of Bacteriophages Against Infectious Diseases. Front Microbiol. 2019 May 3;10:954. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00954. eCollection 2019
- Hendrix RW. Bacteriophages: evolution of the majority. Theor. Popul. Biol. 2002 Jun;61(4):471-80. DOI: 10.1006/tpbi.2002.1590.
- Миросникова КА, Чертков ОВ, Назаров ПА, Мезянжинов ВВ. Пептидогликанлизирующие ферменты бактериофагов – перспективные противобактериальные агенты. Успехи биологической химии. 2006;46:65-98. / Miroshnikov KA, Chertkov OV, Nazarov PA, Mesyanzhinov VV. Peptidoglykanlizinguyushchie fermenty bakteriofagov – perspektivnye protivobakterial'nye agenty. Uspekhi biologicheskoi khimii. 2006;46:65-98. (In Russian).
- Prigent M, Leroy M, Confalonieri F. A diversity of bacteriophage forms and genomes can be isolated from the surface sands of the Sahara Desert. Extremophiles. 2005 Aug;9(4):289-96. DOI: 10.1007/s00792-005-0444-5. Epub 2005 Jun 10.
- Srinivasiah S, Bhavsar J, Thapar K. Phages across the biosphere: contrasts of viruses in soil and aquatic environments. Research in Microbiology. 2008 Jun;159(5):349-57. DOI: 10.1016/j.resmic.2008.04.010. Epub 2008 May 8.
- Bergh O, Borsheim KY, Bratbak G, Haldal M. High abundance of viruses found in aquatic environments. Nature. 1989;340(6233):467-468. DOI: 10.1038/340467a0
- Hatfull GF. Dark Matter of the Biosphere: the Amazing World of Bacteriophage Diversity. J Virol. 2015;89(16):8107-8110. DOI: 10.1128/JVI.01340-15
- Twort FW. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. The Lancet. 1915;186:1241-1243.
- d'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences. 1917;165:373-375.
- <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Ленгелер Й, Древис Г, Шлегель Г. Современная микробиология: Прокариоты. 2005;2:496. / Lengeler I, Drevis G, Shlegel' G. Sovremennaya mikrobiologiya: Prokarioty. 2005;2:496. (In Russian).
- Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 1951;62(3):293-300.
- Reyes A, Semenkovich NP, Whiteson K, Rohwer F, Gordon JI Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. Nature Reviews Microbiology. 2012;10(9):607-617. DOI: 10.1038/nrmicro2853
- Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. Bacteriophage. 2011; 1(2):66-85. DOI: 10.4161/bact.1.2.15845
- Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. Trends Microbiol. 1997; 5(7):268-271. DOI: 10.1016/S0966-842X(97)01054-8
- Burrowes B, Harper DR, Anderson J, McConville M, Enright MC. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2011;9(9):775-785. DOI: 10.1586/eri.11.90

22. Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, et al. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010; 11(1):69-86. DOI: 10.2174/138920110790725401
23. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr Protein Pept Sci.* 2012; 13(8):699-722. DOI: 10.2174/138920312804871193
24. Pires DP, Oliveira H, Melo LD, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(5):2141-2151. DOI: 10.1007/s00253-015-7247-0
25. <http://www.bacteriofa.ru/>.
26. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage.* 2011;1(2):111-114. DOI: 10.4161/bact.1.2.14590
27. Hyman P, Abedon ST. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol.* 2010;70:217248. DOI: 10.1016/S0065-2164(10)70007-1
28. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(5):317-327. DOI: 10.1038/nrmicro2315
29. Samson JE, Magadán AH, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(10):675-687. DOI: 10.1038/nrmicro3096
30. Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14(5):524-531. DOI: 10.1016/j.mib.2011.07.028
31. Hatfull GF. Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(5):447-453. DOI: 10.1016/j.mib.2008.09.004
32. Klumpp J, Fouts DE, Sozhamannan S. Next generation sequencing technologies and the changing landscape of phage genomics. *Bacteriophage.* 2012; 2(3):190-199. DOI: 10.4161/bact.22111
33. Barbirz S, Müller JJ, Uetrecht C, Clark AJ, Heinemann U, Seckler R. Crystal structure of *Escherichia coli* phage HK620 tailspike: podoviral tailspike endoglycosidase modules are evolutionarily related. *Mol Microbiol.* 2008; 69(2):303-316. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06311.x
34. Vegge CS, Brøndsted L, Neve H, Mc Grath S, van Sinderen D, Vogensen FK. Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *J Bacteriol.* 2005; 187(12):4187-4197. DOI: 10.1128/JB.187.12.4187-4197.2005
35. Spinelli S, Bebeacua C, Orlov I, et al. Cryo-electron microscopy structure of lactococcal siphophage 1358 virion. *J Virol.* 2014;88(16):8900-8910. DOI: 10.1128/JVI.01040-14
36. Murphy J, Bottacini F, Mahony J, et al. Comparative genomics and functional analysis of the 936 group of lactococcal *Siphoviridae* phages. *Sci Rep.* 2016; 6:21345. DOI: 10.1038/srep21345
37. Legrand P, Collins B, Blangy S, et al. The Atomic structure of the phage Tuc2009 baseplate tripod suggests that host recognition involves two different carbohydrate binding modules. *mBio.* 2016;7(1):e01781-15. DOI: 10.1128/mBio.01781-15
38. Tremblay DM, Tegoni M, Spinelli S, et al. Receptor-binding protein of *Lactococcus lactis* phages: identification and characterization of the saccharide receptor-binding site. *J Bacteriol.* 2006;188(7):2400-2410. DOI: 10.1128/JB.188.7.2400-2410.2006
39. Farenc C, Spinelli S, Vinogradov E, et al. Molecular insights on the recognition of a *Lactococcus lactis* cell wall pellicle by the phage 1358 receptor binding protein. *J Virol.* 2014;88(12):7005-7015. DOI: 10.1128/JVI.00739-14.
40. Spinelli S, Vesler D, Bebeacua C, Cambillau C. Structures and host-adhesion mechanisms of lactococcal siphophages. *Front Microbiol.* 2014;5:3. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00003
41. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Water P. 2007. *Molecular biology of the cell*, 5<sup>th</sup> ed. Garland Science, New York, NY.
42. Snyder L, Peters JE, Henkin TM, Champness W. 2013. *Molecular genetics of bacteria*, 4<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington, DC.
43. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature.* 2003;421(6921):436-440. DOI: 10.1038/nature01408
44. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000. Recombination between homologous DNA sites, section 12.5. In Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (ed), *Molecular cell biology*, 4<sup>th</sup> ed. W H Freeman, New York, NY.
45. Loessner MJ, Rees CE, Stewart GS, Scherer S. Construction of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for rapid and sensitive detection of viable *Listeria* cells. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(4):1133-1140.
46. Sarkis GJ, Jacobs WR Jr, Hatfull GF. L5 luciferase reporter mycobacteriophages: a sensitive tool for the detection and assay of live mycobacteria. *Mol Microbiol.* 1995;15(6):1055-1067. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02281.x
47. Tanji Y, Furukawa C, Na SH, Hijikata T, Miyanaga K, Unno H. *Escherichia coli* detection by GFP-labeled lysozyme-inactivated T4 bacteriophage. *J Biotechnol.* 2004;114(1-2):11-20. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.05.011
48. Oda M, Morita M, Unno H, Tanji Y. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by using green fluorescent protein-labeled PP01 bacteriophage. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(1):527-534. DOI: 10.1128/aem.70.1.527-534.2004
49. Yoichi M, Abe M, Miyanaga K, Unno H, Tanji Y. Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect *Escherichia coli* O157:H7. *J Biotechnol.* 2005;115(1):101-107. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.003
50. Mahichi F, Synnott AJ, Yamamichi K, Osada T, Tanji Y. Site-specific recombination of T2 phage using IP008 long tail fiber genes provides a targeted method for expanding host range while retaining lytic activity. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 295(2):211-217. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01588.x
51. Marinelli LJ, Hatfull GF, Piuri M. Recombineering: A powerful tool for modification of bacteriophage genomes. *Bacteriophage.* 2012; 2(1):5-14. DOI: 10.4161/bact.18778
52. Marinelli LJ, Piuri M, Swigonová Z, et al. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *PLoS One.* 2008; 3(12):e3957. DOI: 10.1371/journal.pone.0003957
53. Fehér T, Karcagi I, Blattner FR, Pósfai G. Bacteriophage recombineering in the lytic state using the lambda red recombinases. *Microb Biotechnol.* 2012;5(4):466-476. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00292.x
54. Shin H, Lee JH, Yoon H, Kang DH, Ryu S. Genomic investigation of lysogen formation and host lysis systems of the *Salmonella* temperate bacteriophage SPN9CC. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(1):374-384. DOI: 10.1128/AEM.02279-13
55. Poteete AR. What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;201(1):9-14. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10725.x
56. Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, Court DL. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat Protoc.* 2009; 4(2):206-223. DOI: 10.1038/nprot.2008.227.
57. Smith HO, Hutchison CA 3rd, Pfannkoch C, Venter JC. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(26):15440-15445. DOI: 10.1073/pnas.2237126100
58. Mamedov TG, Padhye NV, Viljoen H, Subramanian A. Rational *de novo* gene synthesis by rapid polymerase chain assembly (PCA) and expression of endothelial protein-C and thrombin receptor genes. *J Biotechnol.* 2007;131(4):379-387. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.08.010
59. Chan LY, Kosuri S, Endy D. Refactoring bacteriophage T7. *Mol Syst Biol.* 2005; 1:2005.0018. DOI: 10.1038/msb4100025.
60. Jaschke PR, Lieberman EK, Rodriguez J, Sierra A, Endy D. A fully decompressed synthetic bacteriophage phiX174 genome assembled and archived in yeast. *Virology.* 2012;434(2):278-284. DOI: 10.1016/j.virol.2012.09.020.
61. Ando H, Lemire S, Pires DP, Lu TK. Engineering Modular Viral Scaffolds for Targeted Bacterial Population Editing. *Cell Syst.* 2015;1(3):187-196. DOI: 10.1016/j.cels.2015.08.013
62. Hou Z, Zhou Z, Wang Z, Xiao G. Assembly of long DNA sequences using a new synthetic *Escherichia coli*-yeast shuttle vector. *Virol Sin.* 2016;31(2):160-167. DOI: 10.1007/s12250-016-3730-8



63. Shang Y, Wang M, Xiao G, et al. Construction and Rescue of a Functional Synthetic Baculovirus. *ACS Synth Biol.* 2017; 6(7):1393-1402. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00028
64. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429-5433. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
65. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet.* 2011;45:273-297. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132430
66. Jore MM, Lundgren M, van Duijn E, et al. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(5):529-536. DOI: 10.1038/nsmb.2019
67. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709-1712. DOI: 10.1126/science.1138140
68. Hale CR, Coccozaki A, Li H, Terns RM, Terns MP. Target RNA capture and cleavage by the Cmr type III-B CRISPR-Cas effector complex. *Genes Dev.* 2014;28(21):2432-2443. DOI: 10.1101/gad.250712.114
69. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology.* 2009; 155(Pt 3):733-740. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0.
70. Stern A, Keren L, Wurtzel O, Amitai G, Sorek R. Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity? *Trends Genet.* 2010; 26(8):335-340. DOI: 10.1016/j.tig.2010.05.008
71. Makarova KS, Wolf YI, Irazo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(2):67-83. DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x
72. Tao P, Wu X, Tang WC, Zhu J, Rao V. Engineering of Bacteriophage T4 Genome Using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol.* 2017; 6(10):1952-1961. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00179
73. Shen J, Zhou J, Chen GQ, Xiu ZL. Efficient Genome engineering of a virulent *Klebsiella* bacteriophage using CRISPR-Cas9. *J Virol.* 2018;92(17):e00534-18. DOI: 10.1128/JVI.00534-18
74. Kiro R, Shritit D, Qimron U. Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system. *RNA Biol.* 2014;11(1):42-44. DOI: 10.4161/rna.27766
75. Box AM, McGuffie MJ, O'Hara BJ, Seed KD. Functional analysis of bacteriophage immunity through a type I-E CRISPR-Cas system in *Vibrio cholerae* and its application in bacteriophage genome engineering. *J Bacteriol.* 2015; 198(3):578-590. DOI: 10.1128/JB.00747-15
76. Lauer P, Chow MY, Loessner MJ, Portnoy DA, Calendar R. Construction, characterization, and use of two *Listeria monocytogenes* site-specific phage integration vectors [published correction appears in *J Bacteriol.* 2003 Feb; 185(4):1484]. *J Bacteriol.* 2002;184(15):4177-4186. DOI: 10.1128/jb.184.15.4177-4186.2002
77. Schilling T, Dietrich S, Hoppert M, Hertel R. A CRISPR-Cas9-based toolkit for fast and precise *in vivo* genetic engineering of *Bacillus subtilis* phages. *Viruses.* 2018;10(5):241. DOI: 10.3390/v10050241.
78. Hoshiga F, Yoshizaki K, Takao N, Miyanaga K, Tanji Y. Modification of T2 phage infectivity toward *Escherichia coli* O157:H7 via using CRISPR/Cas9. *FEMS Microbiol Lett.* 2019;366(4):fnz041. DOI: 10.1093/femsle/fnz041.

**Информация об авторах:**

Щурова Анастасия Сергеевна, студент шестого курса ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»  
Адрес: 141701, Институтский переулок, 9, г. Долгопрудный, Московская область

Баннов Василий Александрович, старший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область

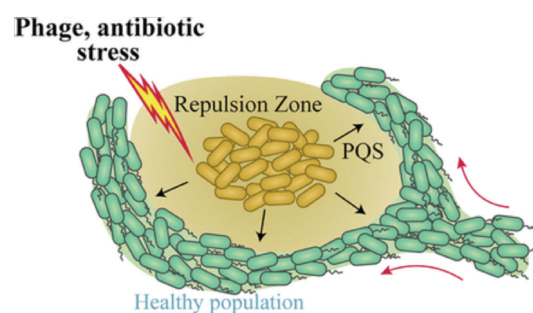
**Information about authors:**

Anastasia S. Schurova, sixth year student, the Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University)  
Address: 141701, 9 Institutskiy per., Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation

Vasily A. Bannov, senior researcher, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

**НОВОСТИ НАУКИ****Как бактерии «действуют как единое целое», чтобы избежать антибиотиков**

Исследовали влияние бактериофаговой инфекции и лечения антибиотиками на координацию роения, коллективной формы жгутико-опосредованной подвижности бактерий. Показано, что фаговая инфекция оппортунистического бактериального патогена *Pseudomonas aeruginosa* устраняет подвижность роя в зараженной субпопуляции и индуцирует высвобождение сигнальной молекулы PQS *Pseudomonas quinolone*, которая отталкивает неинфицированные субпопуляции от попадания в зараженную область. Эти механизмы имеют общий эффект ограничения инфекции субпопуляции, что способствует ее выживанию. Антибактериальная обработка *P. aeruginosa* вызывает тот же ответ, устраняя подвижность роя и отталкивая приближающиеся скопления от зоны, обработанной антибиотиком, через PQS-зависимый механизм. Рой полностью отталкивается от зоны *P. aeruginosa*, обработанной антибиотиками, что соответствует форме уклонения от антибиотиков, и не отталкивается только антибиотиками. PQS выполняет несколько функций, в том числе выполняет функции quorum-sensing молекулы, активирует реакцию окислительного стресса и регулирует высвобождение вирулентности и факторов, модифицирующих хозяина. PQS служит также сигналом предупреждения о стрессе, который заставляет большую популяцию физически избегать клеточного стресса. Реакция на стресс на коллективном уровне, наблюдаемая здесь у *P. aeruginosa*, согласуется с механизмом, способствующим выживанию бактериальных популяций.



Bru J.-L. et al.

*PQS Produced by the Pseudomonas aeruginosa Stress Response Repels Swarms Away from Bacteriophage and Antibiotics*  
*J Bacteriol.* 2019;201(23):e00383-19. DOI: 10.1128/JB.00383-19