

# CRISPR/Cas-системы: характеристика и возможности использования для редактирования геномов бактерий

И.А.Блатов<sup>1</sup>, А.С.Щурова<sup>1</sup>, Д.Ю.Гущин<sup>1</sup>, С.Д.Зверева<sup>1</sup>, А.В.Попова<sup>1,2</sup>

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

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

CRISPR/Cas – адаптивная иммунная система бактерий и архей. Начиная с 2012 г., когда была реализована первая возможность использования системы CRISPR/Cas для редактирования генома, число исследований в этой области стремительно растет. На сегодняшний день редактирование, целью которого является модификация конкретных участков геномов различных организмов, рассматривается как одна из ключевых методологий современной биологии. Данный обзор посвящен истории открытия, классификации, структуре и механизмам работы CRISPR/Cas-систем, а также стратегиям CRISPR/Cas-редактирования геномов различных видов бактерий.

**Ключевые слова:** геномное редактирование, геном, система CRISPR-Cas, бактерии

**Для цитирования:** Блатов И.А., Щурова А.С., Гущин Д.Ю., Зверева С.Д., Попова А.В. CRISPR/Cas-системы: характеристика и возможности использования для редактирования геномов бактерий. Бактериология. 2020; 5(2): 38–48. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-38-48

## CRISPR/Cas-Systems: characteristics and possibilities of use for editing bacterial genomes

I.A.Blatov<sup>1</sup>, A.S.Shchurova<sup>1</sup>, D.Y.Guschin<sup>1</sup>, S.D.Zvereva<sup>1</sup>, A.V.Popova<sup>1,2</sup>

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

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

CRISPR-Cas is the adaptive immune system of bacteria and archaea. Since 2012, when the first opportunity to use the CRISPR/Cas system for genome editing was realized, the number of studies in this area has been growing rapidly. Today, genomic editing to modify specific regions of the genomes of various organisms is considered one of the key methodologies of modern biology. This review is devoted to the history of discovery, classification, structure, operational mechanisms of CRISPR-Cas systems and strategies for editing the genomes of various bacterial species using this technology.

**Key words:** genome editing, genome, CRISPR-Cas system, bacteria

**For citation:** Blatov I.A., Shchurova A.S., Guschin D.Yu., Zvereva S.D., Popova A.V. CRISPR/Cas-Systems: characteristics and possibilities of use for editing bacterial genomes. Bacteriology. 2020; 5(2): 38–48. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-38-48

### Краткая история открытия CRISPR/Cas-систем

В 1987 г. группа ученых под руководством Atsuo Nakata (Osaka University, Япония), изучая геном бактерии *Escherichia coli*, обнаружила необычные последовательности, состоящие из набора повторяющихся палиндромных фрагментов, разделенных уникальными участками [1].

В начале 1990-х гг. испанский исследователь Francisco Mojica (University of Alicante, Испания) установил наличие по-

вторяющихся последовательностей в геномах архей. По своей структуре эти последовательности оказались похожи на те, что были открыты японскими учеными [2]. На основании этого наблюдения Mojica сделал вывод, что последовательности могут участвовать в реализации важных для микроорганизмов функций, и назвал их SRSR (Short Regularly Spaced Repeats). Позже по его же предложению их переименовали в CRISPR (Clustered Regularly Short Palindromic

#### 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: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9г  
Телефон: (495) 408-4554  
E-mail: popova\_nastya86@mail.ru

#### For correspondence:

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

Address: 9g Institutskiy lane, Moscow Region, Dolgoprudny, 141701, Russian Federation  
Phone: (495) 408-4554  
E-mail: popova\_nastya86@mail.ru

Статья поступила 05.08.2020 г., принята к печати 15.09.2020 г.

The article was received 05.08.2020, accepted for publication 15.09.2020

Repeats; кластеризованные, регулярно разделенные, короткие палиндромные повторы). В 2005 г. Mojica сообщил о том, что изучаемые последовательности совпадают с фрагментами геномов бактериофагов [3]. Это послужило основой для предположения, что наличие повторяющихся последовательностей в геномах микроорганизмов может быть связано с работой «иммунной системы» бактерий и архей. Другая группа, работающая независимо, примерно в то же время опубликовала аналогичные результаты [4].

В 2002 г. исследовательская группа из Голландии обнаружила группу генов, примыкающую к CRISPR-локусу, за счет чего данные гены были названы *cas* (CRISPR-associated genes) [5].

В 2005 г. Alexander Bolotin (French National Institute for Agricultural Research, Франция), изучая геном бактерии *Streptococcus thermophilus*, выявил ранее не описанный ген *cas*, кодирующий большой белок с нуклеазной активностью, который теперь известен как Cas9. Кроме того, было обнаружено, что спейсеры, гомологичные вирусным генам, имеют общую последовательность на одном из концов. Эта последовательность (PAM, protospacer adjacent motif, прилегающий мотив протоспейсера) необходима для распознавания нуклеазой конкретного участка вирусной ДНК [6].

В 2005 г. группа под руководством Eugene Koonin (US National Center for Biotechnology Information, США) предложила в качестве иммунного CRISPR-механизма РНК-интерференцию [7].

В 2007 г. Philippe Horvath (Danisco France SAS, Франция) и коллеги экспериментально показали, что CRISPR действительно является частью адаптивной иммунной системы бактерий. Они продемонстрировали, что при включении в CRISPR-кассету новых фрагментов фаговой ДНК бактериальные клетки *S. thermophilus* становятся невосприимчивыми к фагам, в геномах которых присутствуют идентичные последовательности [8]. Кроме того, они показали, что единственного белка Cas9 достаточно для осуществления процесса интерференции.

В 2008 г. John van der Oost (University of Wageningen, Нидерланды) et al. в своем исследовании показали, что спейсерные последовательности в геноме *E. coli* транскрибируются в малые РНК, называемые криспРНК (crRNA), которые направляют белки Cas к определенным ДНК-мишеням [9].

В том же году Luciano Marraffini и Erik Sontheimer (Northwestern University, США) продемонстрировали, что мишенью для CRISPR-системы является ДНК [10].

В 2010 г. Sylvain Moineau (University of Laval, Канада) и его коллеги показали, что CRISPR-Cas9 продуцирует двухцепочечные разрывы в конкретном месте ДНК-мишени в непосредственной близости от сайта PAM [11]. Они также подтвердили, что Cas9 является единственным белком-нуклеазой в системе CRISPR-Cas9. Это отличительная особенность систем CRISPR II типа, в которых интерференция осуществляется при участии одного большого белка в сочетании с криспРНК.

В 2010–2011 гг. Emmanuelle Charpentier (Umea University, Швеция, и University of Vienna, Австрия) и Jörg Vogel обнаружили недостающий компонент CRISPR-механизма, а именно короткую РНК, которую они назвали транс-активирующей

CRISPR-РНК (тракрРНК, tracrRNA) [12, 13]. Они же показали, что тракрРНК образует дуплекс с криспРНК и что именно этот дуплекс и направляет нуклеазу Cas9 к определенной мишени.

В 2011 г. Virginijus Šikšnys (Vilnius University, Литва) и его коллеги клонировали весь локус CRISPR-Cas из *S. thermophilus* (система типа II), экспрессировали его в *E. coli* и показали, что наличие приобретенного локуса обеспечивает невосприимчивость к определенным плазмидам [14]. Это позволило предположить, что системы CRISPR являются автономными модулями, и подтвердило, что все необходимые компоненты системы типа II были уже известны. В 2012 г. Virginijus Šikšnys и его группа продемонстрировали возможность перепрограммирования Cas9 путем изменения последовательности криспРНК [15]. К аналогичным выводам пришли Emmanuelle Charpentier и Jennifer Doudna (University of California, США), которые также сообщили, что криспРНК и тракрРНК могут быть слиты вместе для создания единой гидовой РНК, что еще больше упрощает систему [16].

Таким образом, именно 2012 г. является началом отсчета для возможности использования систем CRISPR/Cas как биотехнологического инструмента.

### Структура и механизм работы CRISPR/Cas-систем

CRISPR/Cas – адаптивная иммунная система бактерий и архей – представлена CRISPR-локусом, экспрессирующим некодирующие РНК, и генами *cas* (CRISPR-associated), кодирующими Cas-нуклеазы, обеспечивающие гидролиз целевой ДНК [17].

CRISPR-локус состоит из лидерной последовательности, задающей направление транскрипции CRISPR-касеты, коротких палиндромных повторов и участков уникальной ДНК – спейсеров, гомологичных последовательностям чужеродных ДНК (протоспейсерам), обеспечивающих специфичность действия системы [8] (рис. 1).

Лидерные последовательности, ответственные за регуляцию транскрипции CRISPR-кассет и, следовательно, за функционирование всей CRISPR/Cas-системы, представлены АТ-богатыми участками (длиной 400 п.н.), которые не содержат открытых рамок считывания [5, 19].

CRISPR-касеты – участки геномов, содержащие CRISPR-повторы, разделенные спейсерами. Повторы имеют частичную симметрию, благодаря которой при транскрипции их концы могут комплементарно взаимодействовать, образуя устойчивые вторичные структуры – шпильки [20], играющие важную роль при взаимодействии с Cas-белками [21]. Спейсеры, как правило, имеют одинаковый размер (30–40 п.н.) и комплементарны выборочным участкам вирусных и плазмидных геномов [3, 4, 6].

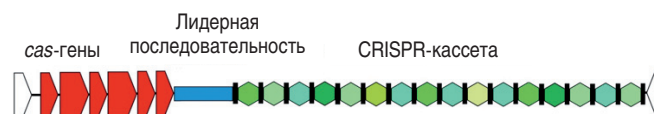


Рис. 1. Схема системы CRISPR/Cas: CRISPR-кассета представлена повторами (черные прямоугольники), разделенными уникальными спейсерами (шестиугольники зеленого цвета); красным цветом обозначены *cas*-гены, синим – лидерная последовательность CRISPR-касеты ([18] с модификациями).

В непосредственной близости от CRISPR-кассет находят локусы *cas*-генов. Кодируемые ими Cas-белки содержат функциональные домены, обеспечивающие различные взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами, что способствует реализации молекулярных механизмов адаптивного иммунитета [22].

Работу систем CRISPR-Cas можно разделить на три этапа (рис. 2): адаптация – процесс, в результате которого формируются новые спейсеры; экспрессия криспрПНК (от англ. *crisprRNA*) – транскрипция прекрПНК с последующим процессингом коротких криспрПНК, нацеленных на определенную мишень в чужеродной ДНК, и интерференция – процесс деградации ДНК [8] или РНК [23], содержащей протоспейсер, комплементарный спейсеру [24].

В процессе адаптации осуществляется выбор нового спейсера и его интеграция в CRISPR-кассету. Маркером протоспейсера в чужеродной ДНК является короткий прилегающий мотив – PAM [25], позволяющий CRISPR/Cas-системе бактерий отличить собственную ДНК от чужеродной. Например, в системах CRISPR/Cas второго класса типа IIA к 3'-концу протоспейсера прилегает мотив NGG (реже – NGA, где N – любой нуклеотид).

Следующим этапом является транскрипция CRISPR-локуса, в результате которой образуется длинная некодирующая пре-криспрПНК, в состав которой входят множественные повторы и спейсеры. В результате процессинга первичного транскрипта образуются короткие зрелые криспрПНК, каждая из которых содержит один спейсер, фланкированный фрагментами повторов. Так, зрелые криспрПНК *Streptococcus pyogenes* содержат 20 нуклеотидов спейсера, расположенных с 5'-конца, и 19–22 нуклеотидов повтора на 3'-конце [12].

В ходе третьего этапа, интерференции, зрелая криспрПНК вместе с белками Cas формирует эффекторный комплекс, который распознает последовательность протоспейсера в чужеродной ДНК или РНК за счет образования комплементарных пар между мишенью и спейсером криспрПНК. Узнавание ДНК-мишени приводит к ее разрезанию и последующей деградации. При этом нуклеазная активность обеспечивается либо непосредственно эффекторным комплексом, либо за счет привлечения дополнительных Cas-белков [26].

### Классификация CRISPR/Cas-систем

Современная классификация систем CRISPR/Cas, основанная на составе белков эффекторного комплекса, а также способе генерации криспрПНК, включает в себя шесть типов систем CRISPR/Cas (I–VI) и тридцать три подтипа, объединенных в два класса [28]. К первому классу относятся системы CRISPR/Cas с мультибелковыми эффекторными комплексами (типы I, III и IV), в системах второго класса эффекторный комплекс состоит из одного белка (типы II и V и VI). Внутри каждого класса выделяют несколько типов, для которых характерно присутствие в составе эффекторного комплекса ключевого белка, который отсутствует в системах других типов [29, 30]. Каждый тип дополнительно подразделяют на несколько подтипов. Подтипы принято обозначать римской цифрой I и буквой латинского алфавита.

К первому классу относят системы I (характерной чертой является наличие гена *cas3*) и III (ген *cas10*) типов [29, 30].

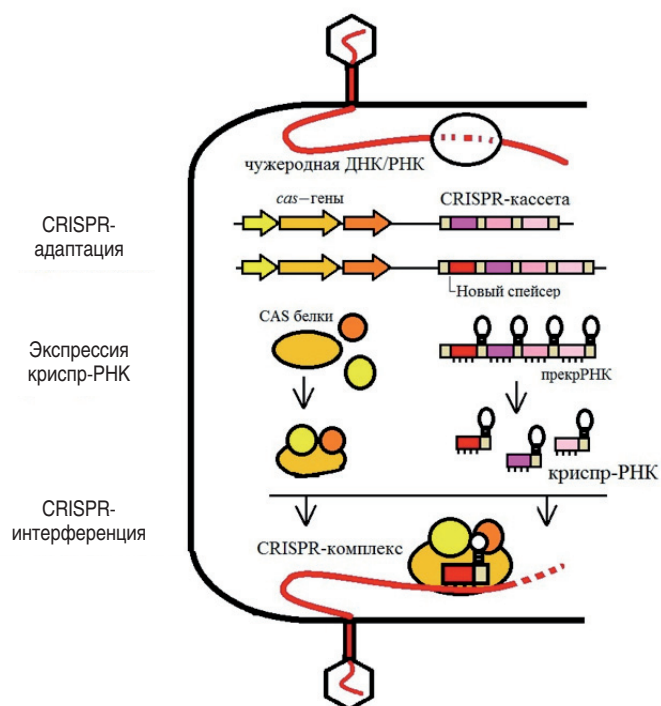


Рис. 2. Схема функционирования систем CRISPR/Cas ([27], с модификациями). Три основные функции CRISPR/Cas-систем: адаптация – встраивание новых спейсеров в CRISPR-кассету, экспрессия – созревание криспрПНК, интерференция – распознавание и деградация чужеродной ДНК или РНК.

Кроме того, выделяют функционально не охарактеризованный IV тип систем CRISPR/Cas (ген *cas1*) [30].

Ко второму классу относят системы II (ген *cas9*), V (ген *cas12*) и VI (ген *cas13*) типов [29–32]. В системах второго класса эффекторный комплекс представлен единственным мультидоменным белком [30]. Системы CRISPR-Cas II типа являются одними из наиболее изученных. Характерной чертой данного типа является наличие нуклеазы Cas9 – мультидоменного белка, который образует вместе с криспрПНК эффекторный комплекс и расщепляет ДНК-мишень, а также участвует в процессе адаптации [33–35].

### Стратегии CRISPR/Cas-редактирования геномов бактерий

Современный подход редактирования геномов бактерий в большинстве случаев основан на использовании программируемых нуклеаз из CRISPR/Cas-систем 2-го класса, прежде всего нуклеазы Cas9 (II типа) из *S. pyogenes* (spCas9), которые в комплексе с направляющей (гидовой) РНК (гРНК) распознают мишень ДНК, фланкированную специфической последовательностью PAM, и вносят двухцепочечный разрыв в последовательность ДНК, точно соответствующую гРНК [13, 36].

Матрица для гомологичной рекомбинации обычно представлена последовательностью, которая содержит модификации сайта-мишени (например, мутации в PAM), а также фланкирующие участки ДНК (плечи, гомологичные редактируемой последовательности, необходимые для осуществления рекомбинации). Разрыв ДНК-мишени нуклеазами системы CRISPR-Cas9 без редактирования чаще всего приводит к гибели бактериальных клеток, что позволяет фактически ис-

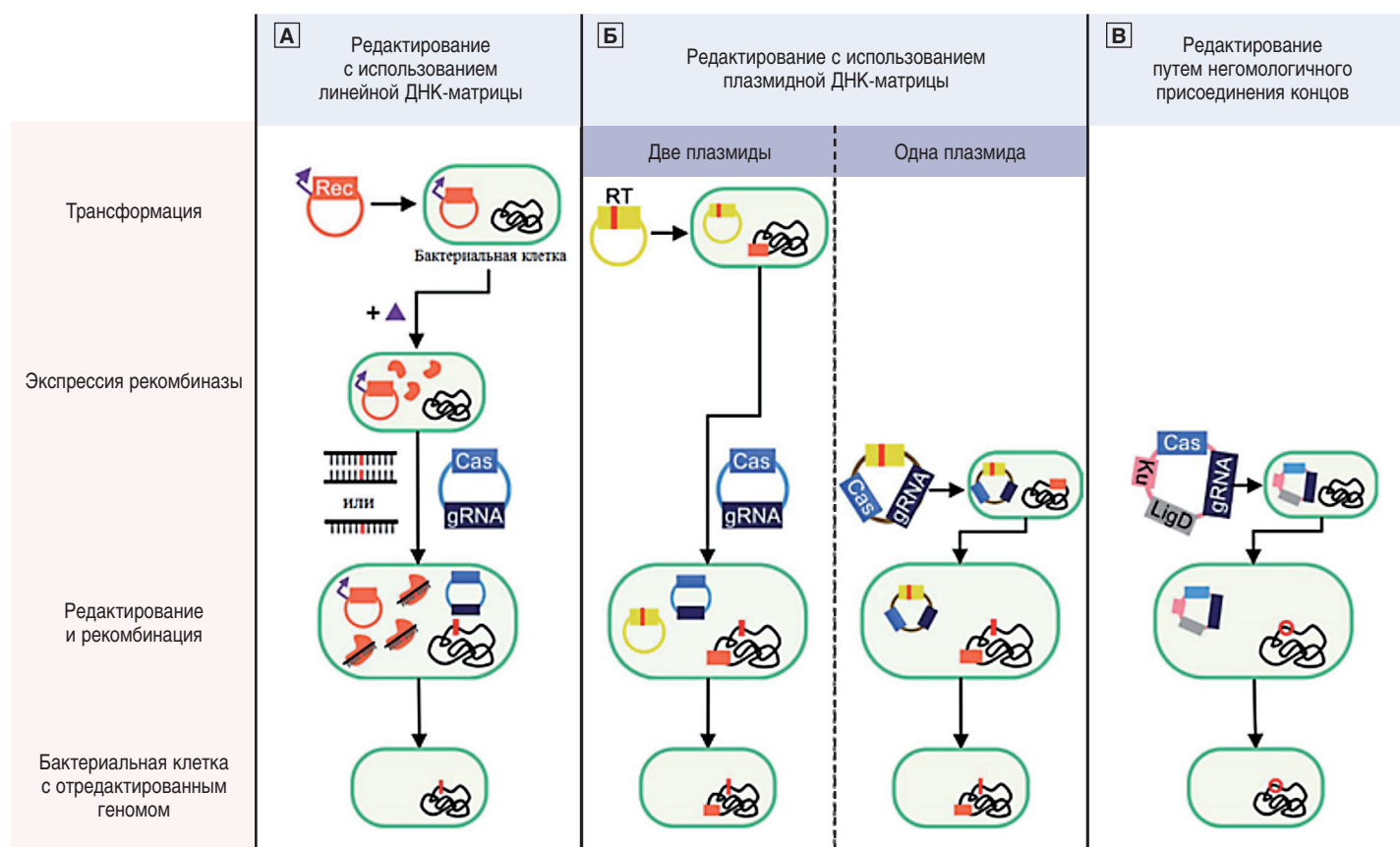


Рис. 3. Различные стратегии CRISPR/Cas-редактирования бактериальных геномов: А. CRISPR/Cas-редактирование путем рекомбинации с использованием линейной ДНК-матрицы и последующей селекцией Cas-нуклеазой. Бактериальную клетку последовательно трансформируют сначала плазмидой, кодирующей гетерологичную рекомбиназу (*Rec*), и после индукции ее экспрессии линейной ДНК-матрицей и плазмидой, кодирующей Cas-нуклеазу. Б. CRISPR/Cas-редактирование путем рекомбинации с использованием плазмидной матрицы (*RT*) и гетерологичной рекомбиназы (или без нее). Матрица для рекомбинации может быть локализована в составе плазмиды, несущей компоненты CRISPR/Cas-системы, или в составе отдельной плазмиды. В. CRISPR/Cas-редактирование путем нехомологичного присоединения концов (*NHEJ*). В зависимости от штамма в состав плазмидного вектора с компонентами CRISPR/Cas-системы, трансформируемого в бактериальную клетку, могут быть включены гены *ku* и/или *ligD* [36], с модификациями).

пользовать этот феномен для селекции тех бактерий, у которых произошла рекомбинация [36]. После внесения двухцепочечного разрыва редактирование генома бактерий может быть осуществлено посредством гомологичной рекомбинации или, в некоторых случаях, нехомологичного присоединения концов (*NHEJ*, non-homologous end joining) [36, 37].

Впервые возможность CRISPR/Cas-редактирования геномов прокариотических организмов была продемонстрирована на примере *Streptococcus pneumoniae* и *E. coli* [38], после чего методология начала активно применяться для решения различных исследовательских задач, связанных с редактированием геномов других видов бактерий. Существующие стратегии редактирования варьируют в зависимости от используемой нуклеазы, механизма рекомбинации, типа ДНК-матрицы для рекомбинации и количества используемых плазмид. Несмотря на это разнообразие, опубликованные алгоритмы работы могут быть отнесены к одной из трех различных стратегий, выбор которой обусловлен типом матрицы, используемой для рекомбинации [36].

Первая стратегия связана с использованием линейной ДНК в качестве матрицы для рекомбинации, а также гетерологичной ДНК-рекомбиназы фагового происхождения (рис. 3А).

Данная стратегия подразумевает первоначальную трансформацию бактериальной клетки плазмидой, содержащей систему для осуществления рекомбинации, затем индукцию экспрессии рекомбиназы и, наконец, совместную трансформацию линейной матрицы ДНК (часто короткого олигонуклеотида, но иногда и двухцепочечного фрагмента ДНК) и плазмиды, или нескольких плазмид, кодирующих Cas-нуклеазы и гидовую РНК. Одним из ключевых требований при этом является наличие гетерологичной рекомбиназы, которая обеспечивает эффективную рекомбинацию в интересующем штамме. На сегодняшний день в исследовательской практике используются несколько рекомбиназ. Например, в самой первой работе, посвященной редактированию генома *E. coli* с помощью нуклеазы *spCas9*, авторы использовали рекомбиназу системы  $\lambda$ -Red, чтобы внести изменения в геном с использованием линейной двухцепочечной матрицы ДНК [38]. Впоследствии системы  $\lambda$ -Red использовались для редактирования геномов других бактерий (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*), где для осуществления рекомбинации был необходим только  $\beta$ -белок системы  $\lambda$ -Red [39]. Для внесения точечных мутаций с высокой эффективностью в геномы некоторых грамположительных бактерий (*Lactobacillus reuteri*) также использовались

рекомбиназы RecT [40]. Однако необходимо учитывать, что рекомбиназы RecT должны быть получены только из родственных для бактерии фагов. Кроме того, помимо функционально активной рекомбиназы, эффективность трансформации штамма должна быть достаточно высокой, чтобы по крайней мере в одной бактериальной клетке, трансформированной линейной ДНК-матрицей и плазмидами с компонентами CRISPR-Cas, произошла успешная рекомбинация. CRISPR/Cas-редактирование с использованием линейных ДНК-матриц можно достаточно эффективно применять для внесения в геном точечных мутаций и небольших делеций, однако в случае необходимости получения более крупных делеций эффективность редактирования при таком подходе сильно снижается [41].

Вторая стратегия подразумевает использование в качестве матрицы для рекомбинации плазмидную ДНК (рис. 3Б). При этом матрица для осуществления рекомбинации содержится либо на той же плазмиде, что и компоненты системы CRISPR/Cas, либо на отдельной плазмиде. Для осуществления рекомбинации могут быть использованы как гетерологичные рекомбиназы (например, система  $\lambda$ -Red) [39, 42], так и собственные механизмы рекомбинации бактериальных клеток. Например, внесение точечной мутации в ген *lacZ* *E. coli* с помощью нуклеазы spCas9 и плазмиды с матрицей, содержащей гомологичные плечи (размером примерно 1000 п.н.), происходило без гетерологичной рекомбиназы с помощью RecA-зависимого механизма гомологичной рекомбинации [43]. Тем не менее в другом исследовании, посвященном редактированию генома *E. coli*, авторы констатировали, что гетерологичная рекомбиназа все-таки необходима при использовании плазмидой матрицы, однако в этом случае осуществлялась вставка целого гена [44]. Помимо *E. coli*, с использованием плазмидой матрицы без гетерологичной рекомбиназы также удалось успешно провести редактирование геномов и других микроорганизмов – представителей родов *Bacillus* [45], *Clostridium* [46], *Lactobacillus* [40, 47], *Pseudomonas* [48], *Streptomyces* [49] и *Staphylococcus* [50]. Несомненно, использование эндогенного механизма для гомологичной рекомбинации упрощает процесс редактирования, поскольку для этого требуется использование только одного или двух плазмидных векторов, содержащих матрицу для рекомбинации и компоненты системы CRISPR-Cas. Однако этот механизм может отсутствовать или быть недостаточно активен у некоторых бактерий, что потребует идентификации рекомбиназ, функционирующих у конкретного вида бактерии, и использования гетерологичных рекомбиназ [36].

Третья стратегия CRISPR/Cas-редактирования подразумевает модификацию геномов бактерий путем негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ) – основного способа репарации двухцепочечных разрывов ДНК, вызванных системой CRISPR-Cas (рис. 3В). Такой подход может быть достаточно эффективным для введения мутаций, обуславливающих снижение жизнеспособности клетки. У бактерий реализация механизма NHEJ связана с двумя белками: Ku и LigD. Белок Ku связывает, а белок LigD лигирует концы разрезанной ДНК, что часто приводит к неспецифическим мутациям, вставкам или делециям [37]. В одной из работ Sun et al. [51] достигли частоты NHEJ 70% путем трансформации

штамма *Mycobacterium smegmatis*, несущего функциональные копии генов *ku* и *ligD*, плазмидой, кодирующей нуклеазу Cas12a из *Francisella tularensis* (FnCas12a) и гидовую РНК. Tong et al. [52] показали, что возможно генерировать различные делеции в штамме *Streptomyces coelicolor*, несущем функциональный ген *ku*, путем введения гена *ligD* из близкородственного *Streptomyces carneus*. Li et al. [53] генерировали небольшие делеции и, относительно редко, крупные делеции путем трансформации *S. coelicolor* без функционально активного механизма NHEJ плазмидой, содержащей гены *ligD* и *ku*, а также ген, кодирующий FnCas12a и гидовую РНК. Однако стоит отметить, что только четверть прокариот, по различным оценкам, кодируют белки Ku [54]. Кроме того, гиперэкспрессия генов *ligD* и *ku* может быть цитотоксична для бактерий [53] и приводить к мутациям вне мишени из-за репарации спонтанных разрывов двухцепочечной ДНК. Наконец, экспрессия этих генов может не приводить к делециям [43]. В целом необходимы дополнительные исследования, использующие эту стратегию, чтобы полностью реализовать ее потенциал для редактирования бактериальных геномов.

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

Поскольку программируемое расщепление ДНК и редактирование генома *E. coli* впервые было показано с использованием нуклеазы spCas9 (Cas9) [16, 38], то именно эта нуклеаза наиболее часто использовалась в экспериментах по редактированию геномов других бактерий. Эту тенденцию частично можно объяснить тем, что spCas9 представляет собой одну из первых хорошо охарактеризованных односубъединичных эффекторных нуклеаз (для осуществления двухцепочечного разрыва ДНК требуется только экспрессия Cas9 и гидовой РНК) с относительно простой последовательностью РАМ и стабильной экспрессией в клетках различных организмов. Однако избыточная экспрессия spCas9 может быть цитотоксичной для бактериальных клеток, что создает потенциальный барьер для широкого использования данной нуклеазы с целью геномного редактирования. Так, в одном из исследований было показано, что избыточная экспрессия каталитически неактивной формы spCas9 (dCas9) в *E. coli* стала причиной аномальной морфологии и снижения скорости роста бактериальных клеток, что предположительно указывает на то, что цитотоксичность spCas9 может быть связана не только с нуклеазной активностью [55]. В другом исследовании было показано, что экспрессия spCas9 без гидовой РНК в *Corynebacterium glutamicum* приводила к отсутствию роста бактериальных колоний, таким образом, spCas9 может быть цитотоксичным сам по себе [56].

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 [57]. В одной из работ авторы получили конструкцию, в которой перед геном spCas9 находился индуцируемый маннозой

промотор, чтобы минимизировать внесение разрывов в ДНК *Bacillus subtilis* до того, как трансформированные клетки будут высеяны на питательную среду с маннозой [45]. В другом исследовании было показано, что экспрессия spCas9 под контролем индуцируемого тетрациклином промотора приводит к значительно более эффективному редактирова-

нию генома *Clostridium acetobutylicum*, чем в случае конститутивной экспрессии spCas9 [57].

В случае мутации одного из каталитических остатков spCas9 нуклеаза становилась способной разрезать только одну нить ДНК и получила название «никаза» (nCas9) [13]. Однако на сегодняшний день требуется проведение допол-

Таблица. Примеры редактирование геномов бактерий с использованием систем CRISPR-Cas

№	Штамм	Нуклеаза	Система рекомбинации	Матрица для рекомбинации	Тип модификации генома	Ссылки
1	<i>Bacillus subtilis</i> 168	SpCas9	–	Плаزمида	Делеция, замена нуклеотида (SNP)	[45]
					Делеция, вставка, SNP	[68]
2	<i>Bacillus smithii</i> ET 138	SpCas9	–	Плазмида	Делеция, вставка, SNP	[69]
3	<i>Bacillus licheniformis</i> DW2	nCas9	–	Плазмида	Делеция, вставка	[70]
4	<i>Cl. acetobutylicum</i> ATCC 824	nCas9	–	Плазмида	Делеция	[71]
		SpCas9	–	Плазмида	Делеция, вставка, SNP	[57]
5	<i>Cl. beijerinckii</i> NCIMB 8052	nCas9	–	Плазмида	Делеция	[71]
				Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	[65]
6	<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10	nCas9	–	Плазмида	Делеция, вставка	[72]
7	<i>Clostridium difficile</i> R20291	SpCas9	–	Плазмида	SNP	[73]
	<i>Cl. difficile</i> 630				Делеция, вставка	[74]
8	<i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM 13528	SpCas9	–	Плазмида	Делеция	[59]
					Делеция	[46]
9	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Cas12a	RecT	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP	[56]
	<i>C. glutamicum</i> B1					
9	<i>C. glutamicum</i> B226	Cas12a	–	Плазмида	Делеция, вставка	[75]
	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032			Двухцепочечная линейная ДНК или плазмида	Делеция	
10	<i>Corynebacterium acetoacidophilum</i> B230	Cas12a	RecT	Одноцепочечный олиго-нуклеотид	SNP	[56]
	<i>C. acetoacidophilum</i> B299					
11	<i>Corynebacterium pekinense</i> B3	Cas12a	RecT	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP	[56]
12	<i>Corynebacterium crenatum</i> B6	Cas12a	RecT	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP	[56]
13	<i>E. coli</i> MG1655	SpCas9	λ-Red	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP	[38]
				Плазмида	вставка, делеция, SNP	[76]
13	<i>E. coli</i> MG1655	nCas9	–	–	вставка, делеция, SNP	[42]
		Делеция	[77]			
13	<i>E. coli</i> MG1655	Cas12a	λ-Red	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция, SNP	[60]
				Двухцепочечная линейная ДНК	Замена гена	
13	<i>E. coli</i> BW25113	dCas9	–	Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	[62]
				Делеция	[78]	
14	<i>E. aerogenes</i> IAM1183	SpCas9	λ-Red	Двухцепочечная линейная ДНК	Делеция	[78]
		nCas9	–	Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутации	
15	<i>K. pneumoniae</i> KP_1.6366	SpCas9	λ-Red	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция	[64]
				Двухцепочечная линейная ДНК	Делеция, вставка	
15	<i>K. pneumoniae</i> KP_3744	SpCas9	λ-Red	Плазмида	Делеция	[64]
				Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	
15	<i>K. pneumoniae</i> KP_5573	nCas9	–	Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	

Таблица. Примеры редактирование геномов бактерий с использованием систем CRISPR-Cas (окончание)						
16	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC367	SpCas9	RecE/T	Плазмида	Делеция	[79]
17	<i>Lactobacillus casei</i> LC2W	nCas9	–	Плазмида	Делеция, вставка	[80]
18	<i>Lactobacillus lactis</i> MG1363	SpCas9	–	Плазмида	Делеция	[47]
	<i>L. lactis</i> NZ9000	SpCas9	RecT	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP, делеция, вставка	[81]
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1		RecE/T	Двухцепочечная линейная ДНК или плазмида	Делеция, вставка	[79]
	<i>L. plantarum</i> WJL	SpCas9	RecT	ss oligo	SNP	[40]
	<i>L. plantarum</i> NIZO2877		–	Плазмида	SNP, делеция	
20	<i>L. reuteri</i> 6475	SpCas9	RecT	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP	[82]
21	<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	SpCas9	–	Плазмида	SNP	[83]
		nCas9	–			
22	<i>M. smegmatis</i> mc2155	Cas12a	–	Отсутствует (NHEJ)	SNP, делеция, вставка	[51]
			gp60, gp61	Одноцепочечный олигонуклеотид		[60]
23	<i>P. aeruginosa</i> PAK			Плазмида	Делеция, вставка	[63]
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	SpCas9	λ-Red	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция	
				Двухцепочечная линейная ДНК		
		nCas9	–	Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	
24	<i>Pseudomonas fluorescens</i> GcM5-1A	nCas9	–	Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	[63]
25	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	SpCas9	λ-Red	Плазмида	Делеция, вставка, SNP	[84]
			Redβ	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция, SNP	[39]
			Ssr	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция, SNP	[41]
			–	Плазмида	Делеция	[48]
26	<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000	nCas9	–	Отсутствует (редактирование оснований)	С-Т мутация	[63]
27	<i>Streptomyces albus</i> J1074	SpCas9	–	Плазмида	Делеция	[85]
28	<i>S. coelicolor</i> A3	SpCas9		Отсутствует (NHEJ)	Делеция	[52]
			Плазмида	Делеция, SNP		
	<i>S. coelicolor</i> M145	Cas12a	–	Плазмида	Делеция, SNP	[49]
				Отсутствует (NHEJ)	Делеция	[53]
29	<i>Streptomyces lividans</i> 66	SpCas9	–	Плазмида	Делеция	[85]
30	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> SIPI-KF	Cas12a	–	Плазмида	Делеция	[53]
31	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> HCCB10218	SpCas9	–	Плазмида	Делеция	[49]
32	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> DSM 40736	SpCas9	–	Плазмида	Делеция	[85]
33	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		EF2132	Одноцепочечный олигонуклеотид	Делеция, SNP	[86]
	<i>S. aureus</i> RN4220	SpCas9			Делеция, вставка, SNP	[50]
	<i>S. aureus</i> Newman		–	Плазмида		
	<i>S. aureus</i> USA300				Делеция	
34	<i>S. pneumoniae</i> crR6	SpCas9	–	Двухцепочечная линейная ДНК	SNP	[38]
<i>S. pneumoniae</i> R6_8232.5						
35	<i>Tatumella citrea</i> DSM 13699	SpCas9	λ-Red	Плазмида	Делеция	[42]
36	<i>Yersinia pestis</i> KIM6+	Cas12a	λ-Red	Одноцепочечный олигонуклеотид	SNP	[60]

нительных исследований, чтобы понять механизм редактирования генома с помощью nCas9 и исследовать возможности по улучшению редактирования с ее использованием.

Другой альтернативой spCas9 является использование нуклеаз типа V-A, Cas12a. Эти нуклеазы обладают существен-

ными различиями по сравнению с Cas9, такими как распознавание T-богатого PAM или образование 5'-липкого конца при разрезании ДНК [58]. Jiang et al. описали случай неудачной попытки трансформировать клетки *C. glutamicum* плазмидным вектором для экспрессии spCas9 или nSpCas9, в то

время как плаزمид с нуклеазой Cas12a из *Francisella novicida* (FnCas12a) была успешно использована для трансформации с последующим редактированием [54]. Впоследствии нуклеаза Cas12a также была использована как совместно с гетерологичной рекомбиназой, так и без нее для осуществления делеций, вставок и введения мутаций в геномы некоторых других видов бактерий [56, 59, 60]. В целом нуклеаза Cas12a может являться удобным инструментом для эффективного геномного редактирования, хотя необходимо проведение дополнительных исследований для более полного понимания преимуществ и ограничений использования данной нуклеазы.

Недавно был разработан альтернативный подход для редактирования геномов, подразумевающий использование модифицированных нуклеаз, называемых редакторами оснований. Редакторы оснований, как правило, содержат химеры dCas9 или nCas9 и домена цитидин-деаминазы и преобразуют цитидины в урацилы на нецелевой цепи в определенном участке рядом с PAM [61]. Редакторы оснований были использованы для редактирования бактериальных геномов *E. coli* [62], *Pseudomonas aeruginosa* [63], *K. pneumoniae* [64] и *Clostridium beijerinckii* [65] с целью внесения точечных мутаций или вставки преждевременных стоп-кодонов. Метод с использованием редакторов оснований достаточно прост, поскольку он требует трансформации только одной плазмиды, содержащей модифицированную нуклеазу и гРНК.

Еще одна стратегия для решения проблемы цитотоксичности spCas9 заключается в использовании эндогенной CRISPR-Cas-системы бактериального хозяина. По предварительной оценке, до половины всех видов бактерий могут содержать эндогенные системы CRISPR-Cas [66], и использование этих систем может обеспечить эффективное редактирование без необходимости экспрессии гетерологичной нуклеазы [67]. Однако чтобы использовать эндогенные системы для редактирования геномов, они должны быть достаточно хорошо охарактеризованы, включая идентификацию PAM и обеспечение активной экспрессии генов *cas*.

В таблице представлены примеры CRISPR/Cas-редактирования геномов различных видов бактерий.

В заключение необходимо подчеркнуть, что для осуществления редактирования генома бактерий с помощью системы CRISPR/Cas необходимо соблюдение ряда условий: во-первых, бактерия должна быть культивируемой, кроме того, эффективность трансформации в интересующем штамме должна быть достаточно высокой, чтобы обеспечить доставку как компонентов CRISPR/Cas, так и компонентов, необходимых для гомологичной рекомбинации. В связи с этим использование эффективных рекомбиназ, а также регулируемых промоторов в интересующем штамме может способствовать повышению эффективности геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas.

### 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

The work was carried out with the financial support of the grant Ministry of Science and Higher Education of the Russian

Federation Russian Federation (Agreement No. 075-15-2019-1671 of October 31, 2019) and the Industry 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

1. 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
2. Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol.* 1993;9(3):613-621. DOI:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x
3. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005;60(2):174-182. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3
4. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiolog.* 2005;151:653-663. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0
5. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1565-1575. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
6. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 2005;151:2551-2561. DOI: 10.1099/mic.0.28048-0
7. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct.* 2006;1:7. DOI: 10.1186/1745-6150-1-7
8. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709-1712. DOI: 10.1126/science.1138140
9. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders AP, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science.* 2008;321(5891):960-964. DOI: 10.1126/science.1159689
10. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science.* 2008;322:1843-1845. DOI: 10.1126/science.1165771
11. Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 2010;468(7320):67-71. DOI: 10.1038/nature09523
12. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 2011;471:602-607. DOI: 10.1038/nature09886
13. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-821. DOI: 10.1126/science.1225829
14. Sapranauskas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucl Acids Res.* 2011;39(21):9275-9282. DOI: 10.1093/nar/gkr606
15. Siksnys V, Gasiunas G, Karvelis T. RNA-directed DNA cleavage by the Cas9-crRNA complex from CRISPR3/Cas immune system of *Streptococcus thermophilus*. U.S. Provisional Patent Application 61/613,373, filed March 20, 2012; later published as US2015/0045546.



16. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21. DOI: 10.1126/science.1225829
17. Смирнов АВ, Юнусова АМ, Лукьянчикова ВА, Баттулин НР. Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):493-510. DOI: 10.18699/VJ16.175 / Smirnov AV, Yunusova AM, Lukiyanchikova VA, Battulin NR. CRISPR/Cas9, a universal tool for genomic engineering. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):493-510. DOI: 10.18699/VJ16.175 (In Russian).
18. Пугач КС, Лопатина АВ, Северинов КВ. CRISPR-системы адаптивного иммунитета прокариот. Молекулярная биология. 2012;46(2):195-203. / Pougach KS, Lopatina AV, Severinov KV. Crispr adaptive immunity systems of prokaryotes. *Molecular Biology*. 2012;46(2):175-182. (In Russian).
19. Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR – a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(3):181-186. DOI: 10.1038/nrmicro1793
20. Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol*. 2007;8(4):R61. DOI: 10.1186/gb-2007-8-4-r61
21. Jackson RN, Golden SM, van Erp PB, Carter J, Westra ER, Brouns SJ, et al. Structural biology. Crystal structure of the CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Escherichia coli*. *Science*. 2014;345(6203):1473-1479. DOI: 10.1126/science.1256328
22. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*. 2005;1(6):e60. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0010060
23. Hale CR, Coczaki 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
24. 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
25. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading)*. 2009;155(Pt 3):733-740. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0
26. Закиян СМ, Медведев СП, Дементьева ЕВ, Покушалов ЕА, Власов ВВ. Редактирование генов и геномов. Рос. акад. наук, Сиб. отделение, ФИЦ Ин-т цитологии и генетики. 2018;1(2):369. / Zakiyan SM, Medvedev SP, Dementeva EV, Pokushalov EA, Vlasov VV. Editing genes and genomes. Russian Academy of Sciences. Siberian Branch, Institute of Cytology and Genetics. 2018;1(2):369. (In Russian).
27. Savitskaya EE, Musharova OS, Severinov KV. Diversity of CRISPR-Cas-Mediated Mechanisms of Adaptive Immunity in Prokaryotes and Their Application in Biotechnology. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81(7):653-661. DOI: 10.1134/S0006297916070026
28. 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
29. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(6):467-477. DOI: 10.1038/nrmicro2577
30. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(11):722-736. DOI: 10.1038/nrmicro3569
31. Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol Cell*. 2015;60:385-397.
32. Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2017b;15:169-182.
33. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):E2579-E2586. DOI: 10.1073/pnas.1208507109
34. Heler R, Samai P, Modell JW, Weiner C, Goldberg GW, Bikard D, et al. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature*. 2015;519(7542):199-202. DOI: 10.1038/nature14245
35. Wei Y, Terns RM, Terns MP. Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR-Cas adaptation. *Genes Dev*. 2015;29(4):356-361. DOI: 10.1101/gad.257550.114
36. Vento JM, Crook N, Beisel CL. Barriers to genome editing with CRISPR in bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2019;46(9-10):1327-1341. DOI: 10.1007/s10295-019-02195-1
37. Shuman S, Glickman MS. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(11):852-861. DOI: 10.1038/nrmicro1768
38. Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*. 2013;31(3):233-239. DOI: 10.1038/nbt.2508
39. Wu Z, Chen Z, Gao X, Li J, Shang G. Combination of ssDNA recombineering and CRISPR-Cas9 for *Pseudomonas putida* KT2440 genome editing. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(6):2783-2795. DOI: 10.1007/s00253-019-09654-w
40. Leenay RT, Vento JM, Shah M, Martino ME, Leulier F, Beisel CL. Genome Editing with CRISPR-Cas9 in *Lactobacillus plantarum* Revealed That Editing Outcomes Can Vary Across Strains and Between Methods. *Biotechnol J*. 2019;14(3):e1700583. DOI: 10.1002/biot.201700583
41. Aparicio T, de Lorenzo V, Martínez-García E. CRISPR/Cas9-Based Counterselection Boosts Recombineering Efficiency in *Pseudomonas putida*. *Biotechnol J*. 2018;13(5):e1700161. DOI: 10.1002/biot.201700161
42. Jiang Y, Chen B, Duan C, Sun B, Yang J, Yang S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system [published correction appears in *Appl Environ Microbiol*. 2016 Jun 15;82(12):3693]. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(7):2506-2514. DOI: 10.1128/AEM.04023-14
43. Cui L, Bikard D. Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(9):4243-4251. DOI: 10.1093/nar/gkw223
44. Bassalo MC, Garst AD, Halweg-Edwards AL, et al. Rapid and Efficient One-Step Metabolic Pathway Integration in *E. coli*. *ACS Synth Biol*. 2016;5(7):561-568. DOI: 10.1021/acssynbio.5b00187
45. Altenbuchner J. Editing of the *Bacillus subtilis* Genome by the CRISPR-Cas9 System. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(17):5421-5427. Published 2016 Aug 15. DOI: 10.1128/AEM.01453-16
46. Huang H, Chai C, Li N, Rowe P, Minton NP, Yang S, et al. CRISPR/Cas9-Based Efficient Genome Editing in *Clostridium ljungdahlii*, an Autotrophic Gas-Fermenting Bacterium. *ACS Synth Biol*. 2016;5(12):1355-1361. DOI: 10.1021/acssynbio.6b00044
47. Van der Els S, James JK, Kleerebezem M, Bron PA. Versatile Cas9-Driven Subpopulation Selection Toolbox for *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84(8):e02752-17. DOI: 10.1128/AEM.02752-17
48. Wirth NT, Kozaeva E, Nikel PI. Accelerated genome engineering of *Pseudomonas putida* by I-SceI-mediated recombination and CRISPR-Cas9 counterselection. *Microb Biotechnol*. 2020;13(1):233-249. DOI: 10.1111/1751-7915.13396
49. Huang H, Zheng G, Jiang W, Hu H, Lu Y. One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2015;47(4):231-243. DOI: 10.1093/abbs/gmv007
50. Chen W, Zhang Y, Yeo WS, Bae T, Ji Q. Rapid and efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system. *J Am Chem Soc*. 2017;139(10):3790-3795. DOI: 10.1021/jacs.6b13317
51. Sun B, Yang J, Yang S, Ye RD, Chen D, Jiang Y. A CRISPR-Cpf1-Assisted Non-Homologous End Joining Genome Editing System of *Mycobacterium smegmatis*. *Biotechnol J*. 2018;13(9):e1700588. DOI: 10.1002/biot.201700588

52. Tong Y, Charusanti P, Zhang L, Weber T, Lee SY. CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes. *ACS Synth Biol.* 2015;4(9):1020-1029. DOI: 10.1021/acssynbio.5b00038
53. Li L, Wei K, Zheng G, Liu X, Chen S, Jiang W, Lu Y. CRISPR-Cpf1-assisted multiplex genome editing and transcriptional repression in *Streptomyces*. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(18):e00827-18. Published 2018 Aug 31. DOI: 10.1128/AEM.00827-18
54. McGovern S, Baconnais S, Roblin P, Nicolas P, Drevet P, Simonson H, et al. C-terminal region of bacterial Ku controls DNA bridging, DNA threading and recruitment of DNA ligase D for double strand breaks repair. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(10):4785-4806. DOI: 10.1093/nar/gkw149
55. Cho S, Choe D, Lee E, Kim SC, Palsson B, Cho BK. High-Level dCas9 Expression Induces Abnormal Cell Morphology in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol.* 2018;7(4):1085-1094. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00462
56. Jiang Y, Qian F, Yang J, Liu Y, Dong F, Xu C, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun.* 2017;8:15179. DOI: 10.1038/ncomms15179
57. Wasels F, Jean-Marie J, Collas F, López-Contreras AM, Lopes Ferreira N. A two-plasmid inducible CRISPR/Cas9 genome editing tool for *Clostridium acetobutylicum*. *J Microbiol Methods.* 2017;140:5-11. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.06.010
58. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 2015;163(3):759-771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038
59. Hong W, Zhang J, Cui G, Wang L, Wang Y. Multiplexed CRISPR-Cpf1-Mediated Genome Editing in *Clostridium difficile* toward the Understanding of Pathogenesis of *C. difficile* Infection. *ACS Synth Biol.* 2018;7(6):1588-1600. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00087
60. Yan MY, Yan HQ, Ren GX, Zhao JP, Guo XP, Sun YC. CRISPR-Cas12a-Assisted Recombineering in Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(17):e00947-17. DOI: 10.1128/AEM.00947-17
61. Komor AC, Badran AH, Liu DR. Editing the Genome Without Double-Stranded DNA Breaks. *ACS Chem Biol.* 2018;13(2):383-388. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00710
62. Banno S, Nishida K, Arazoe T, Mitsunobu H, Kondo A. Deaminase-mediated multiplex genome editing in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol.* 2018;3(4):423-429. DOI: 10.1038/s41564-017-0102-6
63. Chen W, Zhang Y, Zhang Y, Pi Y, Gu T, Song L, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in *Pseudomonas aeruginosa* and cytidine deaminase-mediated base editing in *Pseudomonas* species. *iScience.* 2018;6:222-231. DOI: 10.1016/j.isci.2018.07.024
64. Wang Y, Wang S, Chen W, Song L, Zhang Y, Shen Z, et al. CRISPR-Cas9 and CRISPR-Assisted Cytidine Deaminase Enable Precise and Efficient Genome Editing in *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(23):e01834-18. DOI: 10.1128/AEM.01834-18
65. Li Q, Seys FM, Minton NP, Yang J, Jiang Y, Jiang W, Yang S. CRISPR-Cas9D10A nickase-assisted base editing in the solvent producer *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol Bioeng.* 2019;116(6):1475-1483. DOI: 10.1002/bit.26949
66. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics.* 2007;8:172. DOI: 10.1186/1471-2105-8-172
67. Hidalgo-Cantabrana C, Goh YJ, Barrangou R. Characterization and Repurposing of Type I and Type II CRISPR-Cas Systems in Bacteria. *J Mol Biol.* 2019;431(1):21-33. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.09.013
68. So Y, Park SY, Park EH, et al. A Highly Efficient CRISPR-Cas9-Mediated Large Genomic Deletion in *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol.* 2017;8:1167. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01167
69. Mougias I, Bosma EF, Weenink K, Vossen E, Goijvaerts K, van der Oost J, van Kranenburg R. Efficient Genome Editing of a Facultative Thermophile Using Mesophilic spCas9. *ACS Synth Biol.* 2017;6(5):849-861. DOI: 10.1021/acssynbio.6b00339
70. Li K, Cai D, Wang Z, He Z, Chen S. Development of an Efficient Genome Editing Tool in *Bacillus licheniformis* Using CRISPR-Cas9 Nickase. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(6):e02608-17. DOI: 10.1128/AEM.02608-17
71. Li Q, Chen J, Minton NP, Zhang Y, Wen Z, Liu J, Yang H, et al. CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol J.* 2016;11(7):961-972. DOI: 10.1002/biot.201600053
72. Xu T, Li Y, Shi Z, Hemme CL, Li Y, Zhu Y, et al. Efficient Genome Editing in *Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 Nickase. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(13):4423-4431. DOI: 10.1128/AEM.00873-15
73. McAllister KN, Bouillaut L, Kahn JN, Self WT, Sorg JA. Using CRISPR-Cas9-mediated genome editing to generate *C. difficile* mutants defective in selenoproteins synthesis. *Sci Rep.* 2017;7(1):14672. Published 2017 Nov 7. DOI: 10.1038/s41598-017-15236-5
74. Wang S, Hong W, Dong S, Zhang ZT, Zhang J, Wang L, Wang Y. Genome engineering of *Clostridium difficile* using the CRISPR-Cas9 system. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(10):1095-1099. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.03.026
75. Zhang J, Yang F, Yang Y, Jiang Y, Huo YX. Optimizing a CRISPR-Cpf1-based genome engineering system for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact.* 2019;18(1):60. DOI: 10.1186/s12934-019-1109-x
76. Li Y, Lin Z, Huang C, Zhang Y, Wang Z, Tang YJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Metab Eng.* 2015;31:13-21. DOI: 10.1016/j.ymben.2015.06.006
77. Standage-Beier K, Zhang Q, Wang X. Targeted Large-Scale Deletion of Bacterial Genomes Using CRISPR-Nickases. *ACS Synth Biol.* 2015;4(117):1217-1225. DOI: 10.1021/acssynbio.5b00132
78. Wu Y, Hao Y, Wei X, Shen Q, Ding X, Wang L, et al. Impairment of NADH dehydrogenase and regulation of anaerobic metabolism by the small RNA RyhB and NadE for improved biohydrogen production in *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10:248. DOI: 10.1186/s13068-017-0938-2
79. Huang H, Song X, Yang S. Development of a RecE/T-assisted CRISPR-Cas9 toolbox for *Lactobacillus*. *Biotechnol J.* 2019;14(7):e1800690. DOI: 10.1002/biot.201800690
80. Song X, Huang H, Xiong Z, Ai L, Yang S. Erratum for Song et al. CRISPR-Cas9D10A Nickase-Assisted Genome Editing in *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(6):e00146-18. DOI: 10.1128/AEM.00146-18
81. Guo T, Xin Y, Zhang Y, Gu X, Kong J. A rapid and versatile tool for genomic engineering in *Lactococcus lactis*. *Microb Cell Fact.* 2019;18(1):22. DOI: 10.1186/s12934-019-1075-3
82. Oh JH, van Pijkeren JP. CRISPR-Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(17):e131. DOI: 10.1093/nar/gku623
83. Tapscott T, Guarnieri MT, Henard CA. Development of a CRISPR/Cas9 system for *Methylococcus capsulatus in vivo* gene editing. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(11):e00340-19. Published 2019 May 16. DOI: 10.1128/AEM.00340-19
84. Sun J, Wang Q, Jiang Y, Wen Z, Yang L, Wu J, Yang S. Genome editing and transcriptional repression in *Pseudomonas putida* KT2440 via the type II CRISPR system. *Microb Cell Fact.* 2018;17(1):41. DOI: 10.1186/s12934-018-0887-x
85. Cobb RE, Wang Y, Zhao H. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synth Biol.* 2015;4(6):723-728. DOI: 10.1021/sb500351f
86. Penewit K, Holmes EA, McLean K, Ren M, Waalkes A, Salipante SJ. Efficient and scalable precision genome editing in *Staphylococcus aureus* through conditional recombineering and CRISPR/Cas9-mediated counterselection. *mBio.* 2018;9(1):e00067-18. DOI: 10.1128/mBio.00067-18 [published correction appears in *mBio.* 2018 Oct 2;9(5):e01839-18. DOI: 10.1128/mBio.01839-18] [published correction appears in *mBio.* 2019 Jan 15;10(1):e02698-18. DOI: 10.1128/mBio.02698-18].

#### Информация об авторах:

Блатов Игорь Александрович, инженер ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»  
Адрес: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9г  
Телефон: (495) 408-4554  
E-mail: iblatov@bk.ru

Щурова Анастасия Сергеевна, инженер ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»  
Адрес: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9г  
Телефон: (495) 408-4554  
E-mail: schurova.nastya@yandex.ru

Гущин Дмитрий Юрьевич, старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»  
Адрес: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9г  
Телефон: (495) 408-4554  
E-mail: albanec2@gmail.com

Зверева Светлана Дмитриевна, старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»  
Адрес: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9г  
Телефон: (495) 408-4554  
E-mail: sv.zvereva.2014@gmail.com

#### Information about authors:

Igor A. Blatov, engineer, Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University)  
Address: 9g Institutskiy lane, Moscow Region, Dolgoprudny, 141701, Russian Federation  
Phone: (495) 408-4554  
E-mail: iblatov@bk.ru

Anastasia S. Shchurova, engineer, Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University)  
Address: 9g Institutskiy lane, Moscow Region, Dolgoprudny, 141701, Russian Federation  
Phone: (495) 408-4554  
E-mail: schurova.nastya@yandex.ru

Dmitry Yu. Guschin, senior researcher, Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University)  
Address: 9g Institutskiy lane, Moscow Region, Dolgoprudny, 141701, Russian Federation  
Phone: (495) 408-4554  
E-mail: albanec2@gmail.com

Svetlana D. Zvereva, senior researcher, t Moscow State Institute of Physics and Technology (National Research University)  
Address: 9g Institutskiy lane, Moscow Region, Dolgoprudny, 141701, Russian Federation  
Phone: (495) 408-4554  
E-mail: sv.zvereva.2014@gmail.com

## НОВОСТИ НАУКИ

### Новые эффективные вакцины против болезни Лайма

Болезнь Лайма вызывается *Borrelia burgdorferi*, бактерией, передающейся через укус зараженного клеща. Единственной профилактической мерой, доступной в настоящее время людям, является «руководство» по предотвращению укусов клещей. Неэффективность этой стратегии подтверждается оценкой 300 000 диагностированных случаев болезни Лайма, которые происходят ежегодно в Соединенных Штатах, наряду с более чем 100 000 в Европе.

Ранняя диагностика и лечение могут бороться с инфекцией, однако, если ее не лечить, возрастает риск того, что инфекция может распространиться на суставы, сердце и нервную систему. Даже те, кто был успешно диагностирован и вылечен, могут быть повторно инфицированы, если укушены снова. Авторы этого нового документа использовали обсуждения на совещании в Центре Банбери для определения наиболее перспективных новых стратегий противодействия инфекции. «Мы можем представить разработку стратегий гибридных вакцин, направленных как на микроба-нарушителя, так и на его переносчика клещей для предотвращения болезни Лайма», – сказала доктор Мария Гомес-Солецки, ведущий автор статьи и исследователь Университета Теннесси. «Это двусторонний подход». В дополнение к описанию новых научных подходов авторы рассматривают социальные последствия новой вакцины. «Вакцинация от болезни Лайма – это личный выбор человека», – отмечают авторы. «Концепция личной иммунизации против незаразной болезни против широко распространенной вакцинации для предотвращения распространения заразной инфекции должна быть частью общественного просвещения и обсуждения». Доктор Ребекка Лешан, исполнительный директор Центра Банбери, отмечает, что предыдущее совещание по усовершенствованной диагностике уже имело серьезные последствия с одобрением FDA ряда тестов, которые вносят ясность в поле. По ее словам, результаты последних встреч продолжают определять правильный курс действий.



*New effective vaccines for Lyme disease are coming – Outbreak News Today [Electronic resource].  
URL: <http://outbreaknewstoday.com/new-effective-vaccines-for-lyme-disease-are-coming-82130/>*