

## Новые подходы и возможности в применении генетического редактирования бактерий

**С** RISPR-Cas-системы быстро вошли в исследовательскую практику как технологическая платформа редактирования геномов бактерий и эукариот, основанная на адаптивной иммунной системе бактерий. В основе этой системы лежат особые участки бактериальной ДНК – короткие палиндромные кластерные повторы, или CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Между повторами находятся различные фрагменты ДНК, называемые спайсерами, которые во многих случаях соответствуют участкам геномов вирусов, с которыми встречалась данная бактерия. При вирусной инвазии чужеродная нуклеиновая кислота вируса выявляется с помощью специальных Cas-белков (CRISPR-associated sequence, ассоциированной с CRISPR), связанных с CRISPR РНК. Если фрагмент генома вируса существует в спейсере CRISPR РНК, Cas-белки разрезают вирусную ДНК и уничтожают ее. Выявленные к настоящему времени системы CRISPR-Cas подразделяют на два основных класса, 5 типов и 16 подтипов на основании наличия или отсутствия определенных генов *cas*, строения оперона *cas*, аминокислотных последовательностей белков Cas и механизмов работы CRISPR-адаптивного иммунитета.



Такова основная схема работы системы, которая в настоящее время широко используется в гено-инженерных разработках для создания диагностических технологий, средств лечения наследственных заболеваний, конструирования продуцентов нужных молекул, элиминации генов резистентности из бактерий и многого другого.

В данном сообщении приводятся некоторые новые сведения о работе и использовании CRISPR-Cas-систем.

### Диагностика

На основе CRISPR-Cas разработана быстрая, высокочувствительная и малозатратная технология выявления нуклеиновых кислот, позволяющая осуществить детекцию патогена с одновременным генотипированием. Управляемый РНК, меченый РНК CRISPR-эффektor Cas13a обладает «побочным эффектом» разнородной активности РНКазы, позволяющей распознать мишень. Соединение эффекта Cas13a с изотермической амплификацией (LAMP) для установления основанного на CRISPR диагноза обеспечивает быструю детекцию ДНК или РНК с атомольярной чувствительностью и практически абсолютной специфичностью. Используют Cas13a молекулярную детекционную платформу, называемую SHERLOCK (специфичное высокочувствительное ферментативное репортерное разблокирование, Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing), для детекции штаммов вирусов и бактерий, генотипирования ДНК человека, идентификации опухолевых ДНК-мутаций. Реакционные реагенты SHERLOCK хорошо хранятся в лиофилизированном состоянии, что допускает их использование в полевых условиях [1]. В ГНЦ ПМБ подобная, но несколько модифицированная технология с LAMP-амплификацией реализуется для высокочувствительной детекции особо опасных инфекций, что показано на возбудителе туляремии.

### Проблемы при использовании редактирования

Применение генного редактирования весьма эффективно для эукариот, в частности для лечения наследственных заболеваний. Однако этот процесс часто сопровождается появлением нежелательных мутаций, которые могут иметь значение для развития патологических состояний. В настоящее время разработаны методологии оценки данных геномики и транскриптомики отдельных клеток при применении CRISPR-Cas9, позволяющие оценить мутации в преимплантационных эмбрионах человека, которые невозможно было бы выявить традиционными методами генотипирования. Было выяснено, что непреднамеренные результаты редактирования генома присутствуют примерно в 16% проанализированных клеток человеческого эмбриона и охватывают 4–20 т.п.н.

Это говорит о том, что при использовании редактирования генома человеческих клеток, как соматических, так и зародышевых, с помощью CRISPR-Cas9 необходимо иметь в виду непредвиденные последствия и выявлять нежелательные мутации, которые могут привести, в том числе, и к появлению новообразований [2].

### Решение проблемы избыточных мутаций при редактировании

Учитывая предыдущие замечания об избыточных мутациях при применении редактирования, следует принять к сведению новую научную информацию. Исследователям удалось модифицировать систему редактирования генома CRISPR-Cas9, снизив количество ошибок практически до нуля. Система CRISPR-Cas9 состоит из эндонуклеазы Cas9, которая способна разрезать двухцепочечную молекулу ДНК, и связанной с ней молекулы РНК, которая по принципу комплементарности позволяет белку найти нужный участок в геноме. Такая система дает возможность редактировать определенные участки ДНК, нацеливаясь на них последовательностью направляющей РНК. Ущербность системы заключается в том, что Cas9 может неспецифично связываться с ДНК в участках, которые не полностью комплементарны направляющей РНК. Фермент может нарушить последовательности важных генов, что было основной преградой к применению системы CRISPR-Cas9 на человеке. Для решения данного вопроса были заменены три аминокислотных остатка в Cas9 из бактерии *Streptococcus pyogenes*, что привело к сильному снижению частоты неспецифических разрезов этим ферментом. Удалось предсказать, что замена некоторых положительно заряженных аминокислот в одном из регионов на нейтральные сделает неспецифическое связывание более слабым. При исследовании нескольких замен было установлено, что мутации трех аминокислотных остатков настолько снижают число неспецифических разрезов, что они не обнаруживаются вовсе. Новый фермент под названием eSpCas9 в ближайшее время планируется сделать общедоступным [3].

**Нейросети CRISPR/Cas.** Появились сообщения о том, что российскими биоинформатиками из Сколтеха была разработана новая конфигурация нейронной сети, способная предсказать, насколько точно выбрана РНК для редактирования генома с помощью CRISPR-Cas. Применено глубокое обучение, гауссовские процессы и другие методы для более точного выбора оптимальных направляющих РНК. В результате была создана нейросеть, способная к обучению благодаря наличию «памяти» и адаптирующаяся к режимам тренировок. Данная нейросеть оценивает вероятности разрезания ДНК-мишеней в необходимом месте для заданных гидовых РНК. Это может служить основой для выбора инструмента редактирования в технологии, основанной на CRISPR-Cas [4].

Компьютерное моделирование является еще одним подходом к решению проблем с избыточными мутациями при применении генетического редактирования.

**Обнаружение CRISPR-ассоциированных транспозонов.** Обнаружено большое количество генных кластеров, которые используют CRISPR для собственного копирования. Исследователи определили кластеры генов, которые используют CRISPR для встраивания в разные места генома организма, как CRISPR-ассоциированные транспозоны (CAST), которые можно использовать для включения в геном целого гена или большой последовательности бактериальной ДНК. До использования сверхмощного компьютера было известно около 12 CAST, сейчас их обнаружено порядка 1500. Имея такую базу данных, можно выбирать наиболее точный инструмент для редактирования генома и создавать новые более эффективные системы редактирования.

Использование суперкомпьютеров для решения задач редактирования открывает совершенно новые перспективы для решения задач по вставке в геном «генных кассет», кодирующих множество функций, и лечения сложных генетических заболеваний.

### **Использование ретронов для редактирования**

Разработан еще один метод генетического редактирования, имеющий выраженные прикладные перспективы. В отличие от существующих методов, основанных на CRISPR-Cas-направленных разрывах генома для редактирования генома, эта стратегия использует одноцепочечную ДНК, продуцируемую ретронным элементом для рекомбинации. Это позволяет создавать библиотеки из миллионов элементов и использовать естественную ДНК или случайные вариации в качестве входных данных.

Метод основан на еще одном защитном механизме бактерий с использованием ретронов, которые представляют собой фрагмент одноцепочечной ДНК, прикрепленный к фрагменту РНК в результате реакции обратной транскрипции. Путем последовательных экспериментов по оптимизации постановки реакции и изменения фенотипа бактерий в отношении синтеза ряда ферментов эффективность метода удалось повысить до 90% и более, что выше, чем при CRISPR-редактировании. Кроме того, таким способом можно маркировать мутантные клетки для их идентификации при экспериментах, что показано на мутациях кишечной палочки в отношении индукции антибиотикорезистентности. Одним из вариантов применения метода с использованием ретронов является индукция небольших мутаций в геноме для определения возможностей адаптации бактериальных клеток к внешним условиям [5].

**Редактирование микробиома.** Микробиом кишечника человека играет роль в возникновении аутоиммунных заболеваний, диабета, рака, сердечно-сосудистых заболеваний, болезни Паркинсона, Альцгеймера, рассеянного склероза, влияет на когнитивные функции, формирование памяти и т.д. Нарушение кишечной микробиоты чаще всего происходит при воздействии на организм патогенных микроорганизмов (бактерий и вирусов), антибиотиков, консервантов, при отравлении химическими веществами, в т.ч. дезинфектантами. Уже хорошо известны методы направленной элиминации из кишечника патогенных бактерий, несущих гены антибиотикорезистентности, когда не затрагиваются полезные микроорганизмы. Эти работы находятся еще в стадии лабораторных исследований, но уже имеют выраженные перспективы практического применения.

Кишечная палочка выполняет важные функции в кишечнике человека, однако имеются разнообразные патогенные варианты, несущие токсины, которые могут вызывать тяжелые заболевания, поражающие кровь и почки, – энтерогеморрагические и энтероагрегативные формы.

В одном из исследований был разработан бактериофаг M13, специфично поражающий кишечную палочку. Эффект основан на доставке с помощью бактериофага системы CRISPR-Cas9 целевым бактериям, что сопровождается разрушением хромосомы. Лабораторные мыши были заражены вирулентным штаммом, который преобладал в кишечной микробиоте. Через 2 нед. после начала лечения разработанным методом его в кишечнике осталось менее 1%, что говорит о высокой эффективности элиминации. Это пока феноменологический эффект, показывающий принципиальную возможность подхода. Существует множество механизмов у кишечной палочки для противостояния такому фагу, приводящих даже к потере CRISPR-Cas9-системы. Но наличие эффекта от подобной платформы обнадеживает в отношении использования других фагов для повышения эффективности воздействия на патогены, что может послужить также одним из методов борьбы с резистентными клонами [3].

**Редактирование микробных сообществ.** На сегодняшний день ферменты CRISPR используются для редактирования геномов одного типа клеток за один раз: они вырезают, удаляют или добавляют гены у определенного вида клеток в ткани или органе, например, или у одного вида микроорганизмов. Появились сообщения о возможности технологии редактирования генома с CRISPR-Cas9-системой, позволяющей изменять гены в сообществе многих различных видов одновременно, что может быть определено как «редактирование сообщества микроорганизмов». Это важное направление может оказаться наиболее эффективным при восстановлении микробиоты человека после воздействий патогенов, антибиотиков или химических веществ, а также при лечении дисбиозов. До настоящего времени нет убедительных данных о взаимоотношениях нормальной микробиоты в организме человека, о специализации отдельных видов и их работы для поддержания собственной многокомпонентной популяции и ее значения для обеспечения многих жизненно важных функций человека посредством метаболитов.

При создании концепции редактирования сообщества был разработан подход, позволяющий определить, какие микроорганизмы в сообществе могут быть подвергнуты редактированию генов. Исследователи использовали в качестве зонда транспозон, который внедрялся

случайным образом в геномы бактерий. Секвенированием ДНК до и после введения транспозона можно было точно определить, какой вид микробов включил ген транспозона. Была разработана система адресной доставки под названием «ДНК-редактирующая РНК-направленная CRISPR-Cas-транспозаза», которая использует фермент CRISPR-Cas, подобный CRISPR-Cas9, для наведения на определенную последовательность ДНК и вставки транспозона. Из выделенных бактерий было создано стабильное сообщество из 14 различных типов микроорганизмов. При этом исследователи смогли отредактировать часть штаммов *Escherichia coli* в этом сообществе, воздействуя на гены, связанные с развитием заболеваний [6].

Этот первый опыт редактирования микробных сообществ позволяет рассчитывать на развитие данной методологии, что представляется важным для создания новых технологий лечения заболеваний кишечника, включая воздействие патогенных штаммов, резистентных к антимикробным препаратам.

Оценивая сегодняшнее состояние проблемы использования генного редактирования для медицинских целей, следует отметить интенсивно развивающиеся методологии, направленные на создание действенных инструментов, способных эффективно применяться для лечения инфекционных болезней у людей, обогащая одновременно теоретическую базу понимания взаимодействия множества микроорганизмов в микробиоме человека и влиянии данных процессов на его жизнедеятельность на метаболическом уровне.

*Директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии  
и биотехнологии» Роспотребнадзора, академик РАН  
И.А.Дятлов*

## **Литература**

1. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017 Apr 28;356(6336):438-442. DOI: 10.1126/science.aam9321
2. Alanis-Lobato G, Zohren J, McCarthy A, Fogarty NME, Kubikova N, Hardman E, et al. Frequent loss of heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jun 1;118(22):e2004832117. DOI: 10.1073/pnas.2004832117
3. Lam KN, Spanogiannopoulos P, Soto-Perez P, Alexander M, Nalley MJ, Bisanz JE, et al. Phage-delivered CRISPR-Cas9 for strain-specific depletion and genomic deletions in the gut microbiome. *Cell Rep*. 2021 Nov 2;37(5):109930. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109930
4. Kirillov B, Savitskaya E, Panov M, Ogurtsov AY, Shabalina SA, Koonin EV, Severinov KV. Uncertainty-aware and interpretable evaluation of Cas9-gRNA and Cas12a-gRNA specificity for fully matched and partially mismatched targets with Deep Kernel Learning. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jan 25;50(2):e11. DOI: 10.1093/nar/gkab1065
5. Schubert MG, Goodman DB, Wannier TM, Kaur D, Farzadfar F, Lu TK, et al. High-throughput functional variant screens via *in vivo* production of single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 May 4;118(18):e2018181118. DOI: 10.1073/pnas.2018181118
6. Rubin BE, Diamond S, Cress BF, Crits-Christoph A, Lou YC, Borges AL, et al. Species- and site-specific genome editing in complex bacterial communities. *Nat Microbiol*. 2022 Jan;7(1):34-47. DOI: 10.1038/s41564-021-01014-7