

Н. Ю. Подвойская
АКТУАЛЬНОСТЬ ИЗУЧЕНИЯ CRISPR/CAS СИСТЕМ
МИКРООРГАНИЗМОВ

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. В. В. Слизень
Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии,
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Резюме. В последнее десятилетие широкое распространение в генетической инженерии получило целенаправленное редактирование генома с применением эндонуклеаз (Cas9) и CRISPR. Эти последовательности впервые были случайно открыты у *Escherichia coli*. Нами были обнаружены и описаны схожие последовательности у *S. enterica*, *S. dysenteriae*, *M. tuberculosis*.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, адаптивный иммунитет прокариот, редактирование генома.

Resume. In the last decade, targeted genome editing with the use of nucleases (Cas9) and CRISPR has become widespread in genetic engineering. These sequences were first discovered accidentally in *E. coli*. We have detected and described such sequences in *S. enterica*, *S. dysenteriae*, *M. tuberculosis*.

Keywords: CRISPR/Cas9, prokaryotic adaptive immune system, genome editing.

Актуальность: CRISPR и CRISPR-ассоциированные гены (Cas) имеют большое значение в адаптивном иммунитете многих бактерий и архей, позволяя микроорганизмам реагировать на чужеродный генетический материал и устранять его. Изначально открытие этих повторов было сделано случайно у *Escherichia coli* в 1987 году, но их функция была подтверждена только в 2007 году Barrangou и соавторами, которые показали, что *Streptococcus thermophilus* может приобретать устойчивость к бактериофагам, интегрируя фрагмент их генома в локус CRISPR [1].

Цель: систематизация данных о прокариотических CRISPR/Cas-системах, анализ перспектив применения этих систем в микробиологии и генетической инженерии.

Задачи:

1. Провести анализ современных представлений о механизмах функционирования CRISPR/Cas-систем микроорганизмов.
2. Показать возможные направления применения комплекса CRISPR/Cas9.
3. Провести скрининг геномов некоторых медицински значимых микроорганизмов на предмет присутствия последовательностей CRISPR.

Материал и методы. Изучены сходство и различие CRISPR *Escherichia coli* с нуклеотидными последовательностями в геномах *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Mycobacterium tuberculosis*. Первичная структура генов в формате .fasta получена из баз проекта HumanMicrobiomeProject (<http://www.hmpdacc.org>) и NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Оценка сходства и различий последовательностей проводилась с использованием BLAST.NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Поиск и отображение CRISPR осуществлялся с помощью CRISPR-finder tool (<http://www.crispr.i2bc.paris-saclay.fr>).

Результаты и их обсуждение. Типичные локусы CRISPR состоят из нескольких несмежных прямых повторов, разделённых участками варибельных последовательностей – спейсерами, представляющими собой сегменты захваченных плазмидных и вирусных участков ДНК [2].

Было произведено исследование сходства нуклеотидных последовательностей в геноме *S. enterica* с CRISPR *E. coli*. В геноме *S. enterica* была выявлена CRISPR-кассета длиной 385 пн с 6 спейсерами и CRISPR-повторами размером 29 пн, проявляющими 100% идентичность с последовательностями у *E. coli* (рис. 1).

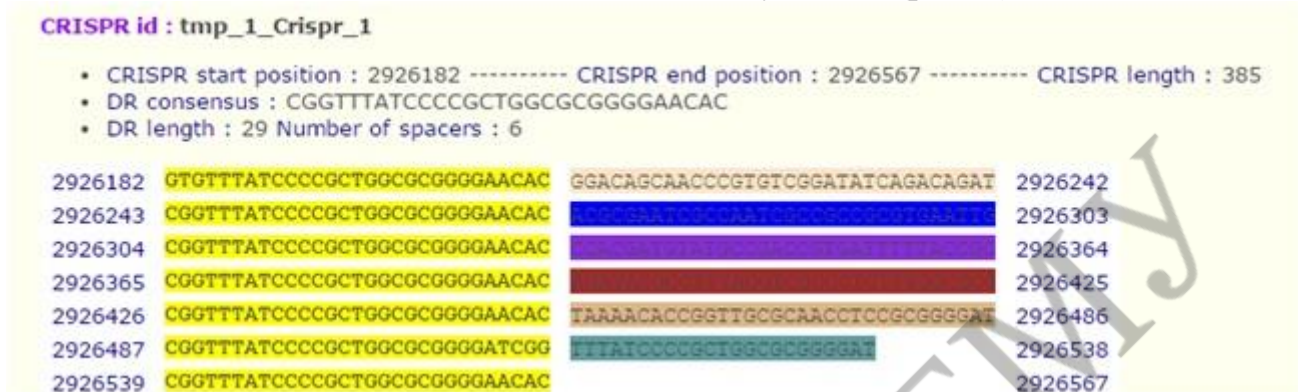


Рисунок 1 – CRISPR-кассета *S. enterica*

Малое число спейсеров и длина CRISPR-касеты *S. dysenteriae* не позволяют с достаточной уверенностью отнести представленную последовательность к истинной CRISPR (рис. 2).



Рисунок 2 – возможная CRISPR-кассета *S. dysenteriae*

В геноме *M. tuberculosis* не обнаружено последовательностей, идентичных CRISPR-структуре *E. coli*. Однако имеется CRISPR с уникальными спейсерами. Длина CRISPR-повторов – 36 пн, число спейсеров – 17, длина всей CRISPR-касеты – 1283 пн (рис. 3).

Около локуса CRISPR имеется лидерная последовательность (выполняет роль промотора) и CRISPR-ассоциированные гены (Cas), которые кодируют неоднородное семейство белков, несущих функциональные домены нуклеаз, хеликаз, полимераз, ДНК-связывающих белков. После транскрипции CRISPR образуется длинная молекула РНК (пре-crРНК), разрезаемая затем на фрагменты, которые называются CRISPR РНК (crРНК). В процессе разрезания участвует tracrРНК – небольшая РНК, комплементарная повторам. Она ориентирует белок Cas9 (нуклеаза), к которому подсоединяется РНКаза III – фермент, нарезающий пре-crРНК. После выполнения своей задачи РНКаза III уходит, и остается комплекс crРНК и tracrРНК с белком Cas9. Сам по себе Cas9 неактивен, но, связавшись с tracrРНК, он изменяет свою трехмерную структуру, приобретая способность взаимодействовать с ДНК-мишенью [3].

CRISPR id : tmp_1_Crispr_6

- CRISPR start position : 3119185 ----- CRISPR end position : 3120468 ----- CRISPR length : 1283
- DR consensus : GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC
- DR length : 36 Number of spacers : 17

| | | | |
|---------|-------------------------------------|--|---------|
| 3119185 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | TCGGGCACGGCCGAAACACCGCGCGAAAGGCGGTTCA | 3119258 |
| 3119259 | GTTTCGGTCCCTCTCGTGGTTTTGGGTCTGACGAC | CGGAGGATGTCACTCGGACATGCTGTCACCGGCGT | 3119334 |
| 3119335 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGAGGAC | ATGGAGCAGTAGCGTGGCTGTGGTGTGGCGGGGATATG | 3119410 |
| 3119411 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | CGTTCGACCTCCCGCACCGGCTGATTCGCGTCC | 3119483 |
| 3119484 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCCGACGAC | | 3119555 |
| 3119556 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | TACCTGATASAAGCCGGAAAGCTCCGTCGCGCTCAG | 3119626 |
| 3119627 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | | 3119700 |
| 3119701 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | CGGATCGTTACCGCACCGCAITTAGTGGCGGCTCG | 3119776 |
| 3119777 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | ACTTGGCGGCACACCGCATCCGCCATCCAGCGGG | 3119847 |
| 3119848 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | | 3119920 |
| 3119921 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | TTGAACACGCCGATACCTATTTGGTGGGAGTGATAAA | 3119994 |
| 3119995 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | | 3120067 |
| 3120068 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | | 3120140 |
| 3120141 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | GGGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT | 3120212 |
| 3120213 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | | 3120284 |
| 3120285 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | | 3120358 |
| 3120359 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | ATGCTGAGCTGAGCGGGGCGATGATGGTGGTGGTGAAG | 3120432 |
| 3120433 | GTTTCGGTCCCTCTCGGGGTTTTGGGTCTGACGAC | | 3120468 |

Рисунок 3 – CRISPR-кассета *M. tuberculosis*

Все многообразие систем CRISPR/Cas объединяют три ключевых этапа работы CRISPR-опосредованного иммунитета: адаптация (приобретение), экспрессия, интерференция.

На стадии адаптации ДНК бактериофага проникает в бактериальную клетку. Белки Cas1 и Cas2 вырезают протоспейсер, распознают лидерную последовательность и вставляют новый спейсер с копией повтора рядом с ней.

Во время стадии экспрессии CRISPR-кассета служит матрицей для синтеза первичного РНК-предшественника. Одновременно начинается синтез Cas-белков. Комплекс из Cas-белков разрезает пре-crРНК на короткие crРНК, которые соответствуют последовательности одного спейсера, обрамленной неодинаковыми по длине участками повторов. Между субъединицами белкового комплекса образуется спиральная бороздка, куда вкладывается crРНК.

Интерференция заключается в узнавании эффекторными Cas-crРНК-комплексами “якорного участка”, изменении своей конформации и ориентации белка Cas3 на ДНК. По мере возрастания количества одноцепочечных разрывов в ДНК-мишени сродство эффекторного комплекса к ней снижается, что приводит к отсоединению и распаду на субъединицы [4].

Системы CRISPR/Cas, относящиеся к типу II, используют в роли эффекторов нуклеазы семейства Cas9, управляемые при помощи РНК-гидов [5].

Гетерокомплекс CRISPR/Cas9 дает возможность производить однонуклеотидные замены. С использованием заранее известной нуклеотидной последовательности создается РНК, применяемая для нахождения необходимой позиции в ДНК, после чего специальный белок-нуклеаза разрывает обе цепочки ДНК. В клетке начинается процесс репарации, в ходе которого используется “подсказка” — правильная последовательность нуклеотидов, заранее доставленная в клетку вместе с белком [6].

Однако технология, основанная на использовании CRISPR/Cas9, пока работает неточно, так как нуклеаза Cas9 не всегда подставляет замену в нужном месте или делает разрыв. Внеплановые разрывы могут приводить к ошибкам в ходе репарации и способствовать возникновению новых мутаций.

Выводы:

1. Биоинформационный анализ геномов *S. enterica*, *S. dysenteriae*, *M. tuberculosis* показал, что эти микроорганизмы содержат схожие с CRISPR/Cas последовательности, при этом в геноме *M. tuberculosis* присутствует CRISPR-кассета размером 1283 пн с уникальными спейсерами.

2. Показан принцип работы CRISPR/Cas-систем, что позволяет использовать их в биотехнологии и биомедицине для конструирования бактериальных штаммов, предотвращения вирусных инфекций, для изучения и лечения различных заболеваний и создания лекарственных препаратов.

N. Yu. Podvoiskaya

THE RELEVANCE OF STUDYING CRISPR/CAS SYSTEMS OF MICROORGANISMS

Tutor: Candidate of Medical Sciences, Associate Professor V. V. Slizen

*Department of Microbiology, Virology, Immunology,
Belarusian State Medical University, Minsk*

Литература

1. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes / R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau et al. // *Science*. – 2007. – Vol. 315. – P. 1709-1712.
2. Starling S. Bacterial physiology: phage injection establishes CRISPR immunity / S. Starling // *Nature Reviews. Microbiology*. – 2017. – №15. – P.225.
3. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease / RE. Haurwitz, M. Jinek, B. Wiedenheft et al. // *Science*. – 2010. – Vol. 329. – P. 1355-1358.
4. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems / KS. Makarova, DH. Haft, R. Barrangou et al. // *Nature Reviews Microbiology*. – 2011. – №8. – P. 467-477.
5. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems / L. Cong, FA. Ran, D. Cox et al. // *Science*. – 2013. – Vol. 339. – P. 819-823.
6. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system / FA Ran, PD. Hsu, J. Wright et al. // *Nature protocols*. – 2013. – Vol. 8. – P. 2281-2308.