

УДК 577.21

# Современные подходы к геномному редактированию биосинтетических кластеров антибиотиков в актиномицетах

Ю. А. Буюклян<sup>1</sup>, Ю. В. Закалюкина<sup>1,2</sup>, И. А. Остерман<sup>1,3</sup>, М. В. Бирюков<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр трансляционной медицины, Сочи, 354340 Россия<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия<sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

\*E-mail: metrim@gmail.com

Поступила в редакцию 13.07.2023

Принята к печати 19.08.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.23426

**РЕФЕРАТ** Рост числа случаев инфицирования людей и животных патогенами, устойчивыми к наиболее распространенным в терапевтической практике антибиотикам, бросает вызов современным технологиям поиска новых лекарственных средств. Представители филума Actinomycetota являются одним из основных источников вторичных метаболитов, в том числе антибиотиков различных классов, однако, несмотря на весь богатый биосинтетический потенциал штаммов актиномицетов, удается получить лишь небольшую долю вторичных метаболитов. Оставшееся разнообразие молекул с антибактериальной активностью, закодированных в геноме, находится в «молчащем», репрессированном состоянии. В связи с этим возникает необходимость применения методов геномного редактирования и метагеномного анализа для идентификации новых биосинтетических кластеров антибиотиков и изменения экспрессии соответствующих генов, приводящих к синтезу потенциально новых молекул с антибактериальной активностью.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** биосинтетические кластеры антибиотиков, редактирование генома, сайт-направленный мутагенез, актиномицеты, антибиотики.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** BGC – biosynthetic gene clusters (биосинтетические кластеры генов); PCR – polymerase chain reaction (полимеразная цепная реакция); NRPS – nonribosomal peptide (нерибосомные пептиды); PKS – polyketide synthase (поликетидсинтаза); UDG – Uracil-DNA glycosylase (урацил-ДНК-гликозилаза); DSB – double-strand DNA break (двухцепочечные разрывы ДНК).

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных источников биологически активных веществ выступают представители филума Actinomycetota – грамположительные микроорганизмы с высоким содержанием GC-пар в геноме [1, 2]. Современные исследования с применением методов высокопроизводительного секвенирования позволяют обнаружить в геномах многих актиномицетов десятки биосинтетических кластеров потенциальных антибиотиков [3], однако, используя в лабораторных условиях традиционные методы скрининга [4, 5], заложенные еще в 40-х годах XX века Waksman, удается получить не более 5% вторичных метаболитов от всего кодирующего потенциала штаммов-продуцентов [6, 7]. При этом антибиотики, входящие в эту долю, зачастую оказыва-

ются ранее описанными соединениями. Происходит непрерывное «переоткрытие» известных антибиотиков, а новые молекулы на общем фоне практически незаметны. Сложившимися подходами, направленными на повышение продукции новых антибиотиков, являются: подбор оптимальных условий культивирования посредством модификации состава питательных сред [8], методы совместного культивирования [9], микрофлюидики [10], а также использование различных транскрипционных факторов для активации молчащих генов [11, 12]. К сожалению, такие инструменты не являются универсальными для различных штаммов актиномицетов, носят стохастический характер и потому не всегда приводят к успешным результатам. Гораздо более эффективно использование генно-инженерных тех-

нологий, поскольку они позволяют осуществлять направленное и контролируемое изменение продукции целевых метаболитов [13]. Одним из примеров таких технологий является геномное редактирование биосинтетических кластеров антибиотиков посредством мутагенеза [14–16]. Этот целенаправленный подход позволяет изменять экспрессию генов [17], подавлять продукцию ранее охарактеризованных молекул и тем самым способствовать синтезу других неизвестных вариантов антибиотиков. Кроме того, методы мутагенеза могут быть с успехом применены как на новых штаммах-продуцентах, так и на генах ранее известных изолятов с целью обнаружения новых компаундов.

### ГЕНОМ АКТИНОМИЦЕТОВ

Геном актиномицетов представлен кольцевой или линейной молекулой ДНК (*Streptomyces* spp.) длиной 5–10 млн п.н., имеющей GC-богатый контент, достигающий у некоторых родов более 70% [18–20]. У актиномицетов – представителей прокариот – процесс реализации генетической информации, а именно транскрипции и трансляции, сопряжен во времени и пространстве, ввиду отсутствия внутренней компарментализации клетки [21]. С мРНК, еще синтезируемой РНК-полимеразой, может связываться рибосома и начинать синтез белка.

Как правило, в геномах актиномицетов гены, кодирующие биоактивные соединения, организованы в биосинтетические кластеры (BGC) [22, 23]. BGC представляют собой группу из двух или более генов, имеющих общий старт транскрипции, которые вместе кодируют конкретный биосинтетический путь, обеспечивающий синтез специализированного метаболита. Данные гены содержат информацию о регуляторных белках, контролирующих время и уровень экспрессии и секрецию конкретного метаболита.

Существуют различные структурные классы BGC, включая нерибосомные пептидные синтетазы (NRPS), поликетидные синтетазы (PKS), терпены и бактериоцины [24]. NRPS и PKS являются часто используемыми маркерами для обнаружения вторичных метаболитов, поскольку они синтезируют разнообразные по структуре молекулы, проявляющие антибиотические и иммуносупрессорные свойства с огромным фармацевтическим потенциалом [25, 26]. Эти регионы могут использоваться для выявления новых путей биосинтеза антибиотиков [27] (рис. 1).

Согласно биоинформатическим данным, собранным DOE Joint Genome Institute, все продуценты антибиотиков содержат десятки потенциальных биосинтетических кластеров, то есть имеют намного

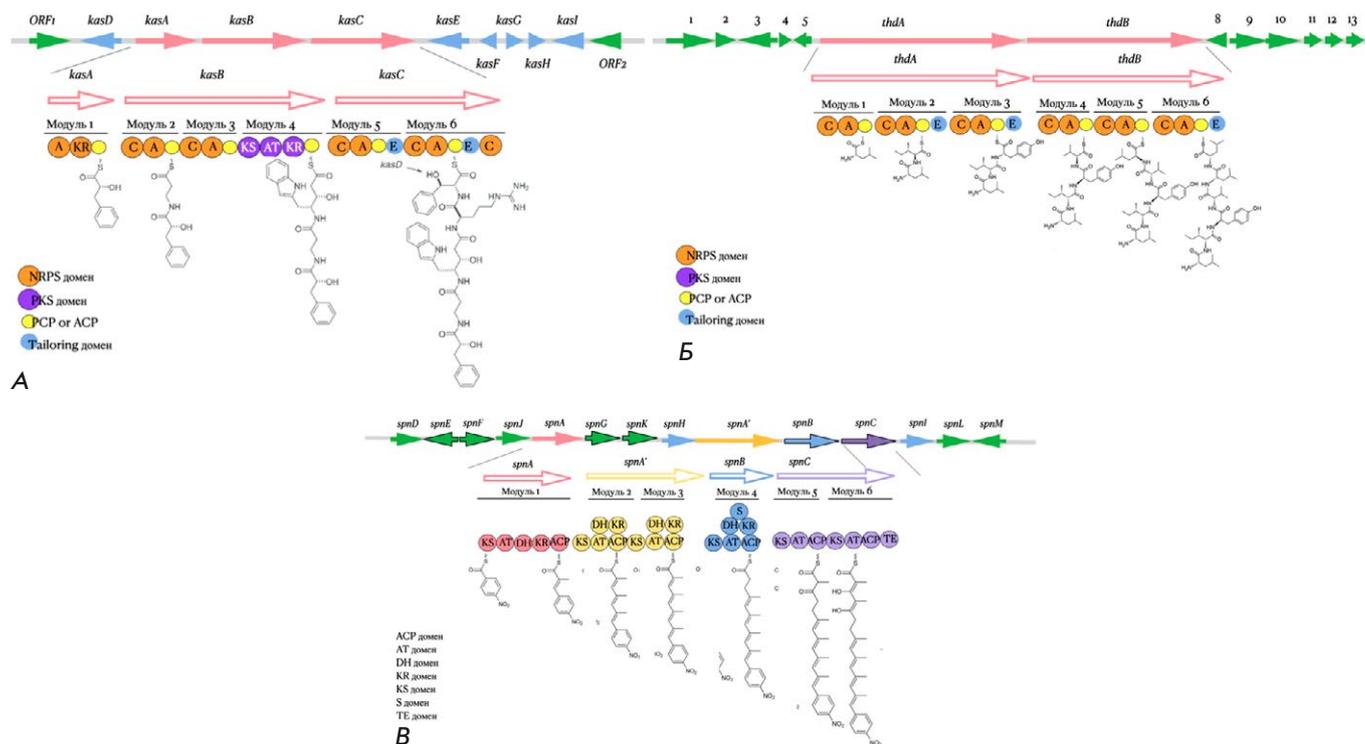


Рис. 1. Схема кластеров биосинтеза антибиотиков: А — термоактиноамид А из *Thermoactinomyces* sp. [28]; Б — касугамицин из *St. kasugaensis* [29]; В — спинозин из *St. albus* J1074 [30]

большой биосинтетический потенциал, чем можно выявить при рутинном культивировании [27].

На сегодняшний день существуют различные подходы к активации молчащих кластеров [31], которые можно разделить на две группы: в основе первой лежит гетерологическая экспрессия кластеров в штаммах модельных организмов *Escherichia coli* или *Saccharomyces cerevisiae* [32, 33], а вторая опирается на редактирование геномов непосредственно в штаммах-продуцентах [34, 35]. Каждый из этих подходов имеет свои достоинства и недостатки. Говоря о гетерологической экспрессии кластеров в штаммах *E. coli* или *S. cerevisiae* [36], можно выделить следующие преимущества: простота, связанная с трансформацией и экспрессией генов в хорошо изученных модельных микроорганизмах, позволяющая регулировать уровень экспрессии генов синтеза антибиотиков. Такой контроль регуляции экспрессии генов может быть реализован на основе использования индуцибельных или конститутивных промоторов. Соответственно, синтез конкретных метаболитов будет происходить или в присутствии молекул-индукторов, или на постоянной основе в гетерологичном штамме. Кроме того, модельные организмы, особенно кишечная палочка, не содержат эндогенных вторичных метаболических путей, что не будет влиять на синтез целевого кластера. Несмотря на положительные стороны подхода, существует ряд ограничивающих факторов: во-первых, основной процесс, лежащий в основе переноса кластера, – гомологичная рекомбинация [37], точность которой снижается при увеличении количества происходящих актов. Во-вторых, существуют отличия в нуклеотидной последовательности триплетов, кодирующих аминокислоты в разных организмах. Поэтому возникает дополнительный этап, связанный с созданием кодон-оптимизированной последовательности для синтеза целевой молекулы антибиотика. Такие манипуляции необходимы, чтобы устранить смещение рамки считывания между родными штаммами и хозяевами. Помимо этого, для некоторых методов необходимы свои консенсусные последовательности по типу attP-attachment сайтов, опосредующие сайт-специфическую рекомбинацию [38], и особые плазмиды, что увеличивает сложность и трудоемкость работы [39].

Альтернативным подходом к активации молчащих кластеров является редактирование генома непосредственно в штаммах-продуцентах. Такой вариант позволяет вводить мутации в исходный штамм дикого типа, контролировать изменения непосредственно в нем [40]. Проведение генетических манипуляций таким образом позволяет изучить влия-

ние конкретной мутации на другие метаболические пути, не задействованные в биосинтезе конкретного метаболита [41]. Разумеется, в данном методе есть свои сложности, однако разрабатываются подходы к их преодолению, о которых речь пойдет ниже.

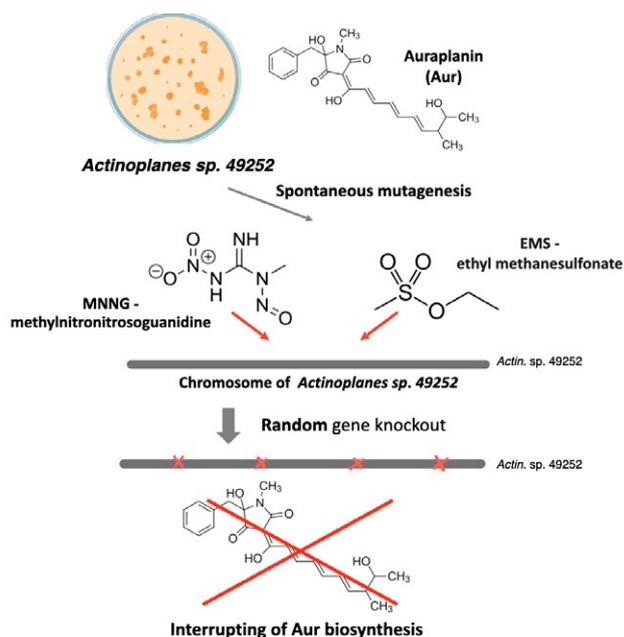
### ПОДХОДЫ К РЕДАКТИРОВАНИЮ ГЕНОМА АКТИНОМИЦЕТОВ

По сравнению с «традиционными» объектами для генетических модификаций, такими, как *E. coli* и *S. cerevisiae* [42], актиномицеты обладают сложным регуляторным аппаратом, препятствующим эффективной направленной трансформации их генома [43, 44]. Несмотря на это, разработаны подходы для внесения точечных мутаций в генетический аппарат штаммов-продуцентов. Все методы геномного редактирования можно разделить на две категории: спонтанный [45] и сайт-направленный мутагенез [46].

#### Спонтанный мутагенез

Метод спонтанного мутагенеза обусловлен введением случайным образом точечных мутаций в ДНК с помощью мутагена. Данный подход используется для решения нескольких задач: введения однонуклеотидных замен с целью получения новых продуктов биосинтеза [47], а так же как вспомогательный инструмент для уточнения нуклеотидной последовательности кластеров биосинтеза антибиотиков [48]. В качестве мутагенов используется MNNG (метилнитронитрозогуанидин) [49], вводящий алкильные группы по O<sup>6</sup> гуанину и O<sup>4</sup> тимину, что приводит к транзиции между GC- и AT-парами [50], и EMS (этилметансульфонат), приводящий к транзиции между GC- и AT-парами [51] (рис. 2). Помимо транзиций, возникающих между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, под воздействием мутагена возможно и изменение уровня экспрессии конкретных генов [52]. Поскольку такие однонуклеотидные замены вводятся случайным образом, то в различных регионах генома будет происходить алкилирование/метилование азотистых оснований. Так, например, модификация нуклеотидной последовательности в регуляторной области – промоторе – может подавлять экспрессию генов биосинтетического кластера [51], а мутации кодирующего региона BGC могут давать другие генетические продукты и, как следствие, новые вещества [48, 53].

Таким образом, метод спонтанного мутагенеза помогает решить некоторые задачи, связанные с поиском новых молекул, но данный процесс носит вероятностный характер и не гарантирует воспроизведение результатов, что не позволяет создать



**Рис. 2.** Схема внесения мутаций в геном актиномицетов с помощью спонтанного мутагенеза посредством химических мутагенов

на его основе полноценный метод получения новых антибиотиков.

### Сайт-направленный мутагенез

Ранее отмечалось, что актиномицеты реализуют лишь малую часть своей биосинтетической активности, причем один антибиотик, например, стрептогрицин, может обнаруживаться в каждом десятом изоляте, а такие антибиотики, как тетрациклин и актиномицин Д, встречаются с частотой один на 100–1000 изолятов [1]. Получить новые антибиотики, используя традиционный подход в виде платформы Waksmana [54], и их модификации, необходимо исследовать десятки миллионов изолятов. Такой рутинный вариант достаточно трудоемкий, время- и ресурсозатратный. Важно понимать, что даже известные штаммы скрывают в себе огромное разнообразие молекул с антибактериальной активностью [55], экспрессия генов которых маскируется уже известными антибиотиками, детектируемыми в первую очередь [1].

CuI<sub>r</sub> и соавт. предложена концепция, согласно которой нарушение консервативных генов биосинтеза ранее известных антибиотиков, продуцируемых штаммами, может облегчить обнаружение новых метаболитов, чья активность не была замечена ранее [56, 57]. Эту задачу решают с использованием различных генно-инженерных инструментов, на-

правленных в основном на внесение делеций в гены биосинтетических кластеров штаммов-продуцентов. Все методики можно разделить на три большие категории, отличающиеся молекулярными механизмами, которые лежат в их основе.

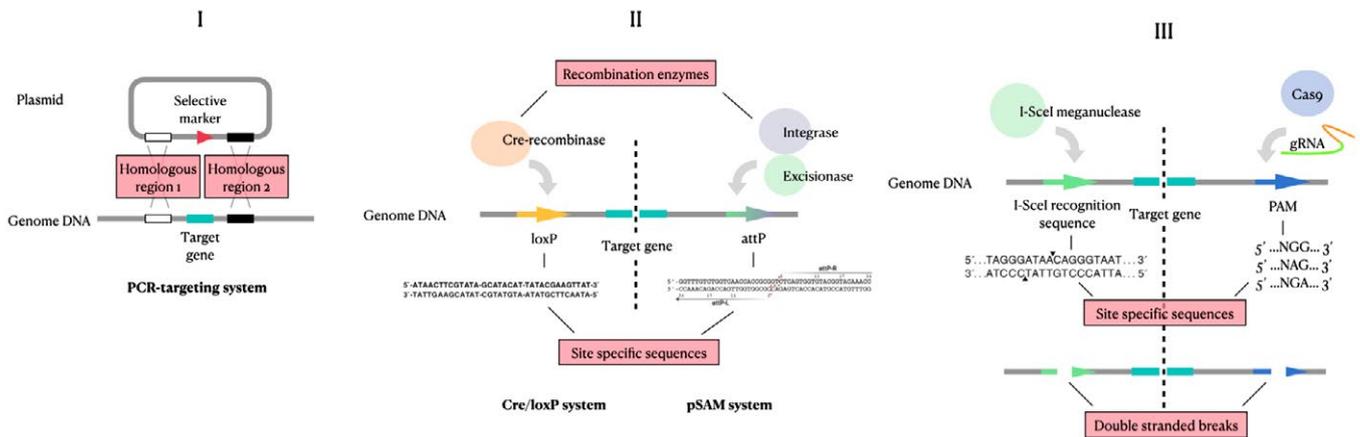
В качестве инструментов для введения мутаций используются три фундаментальных процесса: гомологичная рекомбинация, лежащая в основе PCR-Targeting System, где используются гомологичные последовательности, необходимые для рекомбинации, и в результате получают делеции. Второй молекулярный механизм – сайт-специфическая рекомбинация, применяемая в Cre-loxP Recombination System и pSAM2 Site-Specific Recombination System. Ключевой особенностью является наличие специальных сайтов: loxP-последовательности для Cre-рекомбиназы и attP-последовательности для системы pSAM2. В данном процессе участвуют не только специфические последовательности, но и ферменты, осуществляющие рекомбинацию в строго определенных участках генома, что повышает точность происходящего процесса. Третий процесс, лежащий в основе сайт-направленного мутагенеза – введение двухцепочечных разрывов такими нуклеазами, как I-SceI-мегануклеаза (I-SceI Meganuclease-Promoted Recombination System) и Cas-никаза (CRISPR/Cas-Based Genome Editing). Введенные в ДНК двухцепочечные разрывы в дальнейшем восстанавливаются системами репарации клетки (рис. 3).

### РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА НА ОСНОВЕ ПРОЦЕССА РЕКОМБИНАЦИИ

#### PCR-Targeting System

Первая система редактирования генома, разработанная для клеток *E. coli*, основана на гомологичной рекомбинации, осуществляемой с помощью λ-Red-системы [58]. Процесс гомологичной рекомбинации [59] – широко распространенное биологическое явление, происходящее в клетках живых организмов. Этот процесс носит высококонсервативный характер и включает разрыв и репарацию двухцепочечной ДНК (дцДНК) [60, 61]. Кроме того, гомологичная рекомбинация является инструментом для внесения точечных мутаций в геном бактерии [62]. На основе этого процесса разработан PCR-опосредованный метод геномного редактирования, суть которого заключается в замене целевого региона в геноме клетки на амплифицированный фрагмент гена селективного маркера (табл. 1).

Для успешного прохождения гомологичной рекомбинации необходимы фланкирующие последовательности в районе 2 т.п.н. Используя PCR-



**Рис. 3.** Схема молекулярных механизмов, лежащих в основе генно-инженерных методов введения мутаций в геном клеток. I процесс — гомологичная рекомбинация для осуществления делеций; II процесс — сайт-специфическая рекомбинация для осуществления делеций; III процесс — действие нуклеаз, приводящих к двухцепочечным разрывам, с последующим их восстановлением

**Таблица 1.** Селективные маркеры для генетической инженерии актиномицетов

№ п/п	Ген устойчивости	Устойчивость	Антибиотик	Плаزمида
1.	<i>aac(3)IV – aminoglycoside N(3)-acetyltransferase</i>	Устойчивость к антибиотикам, содержащим 2-дезоксистрептаминовое кольцо	Апрамицин	pCRISPomyces [63]; pStreptoBAC V [1]
2.	<i>aph(3)III – aminoglycoside modifying enzyme</i>	Устойчивость к аминогликозидным антибиотикам	Канамицин А и В, неомицин В и С	pCAP01 [64]; pESAC13 [65]
3.	<i>aadA – aminoglycoside (3<sup>rd</sup>) adenyltransferase</i>	Устойчивость к стрептограминам и аминогликозидам	Стрептомицин, спектиномицин	pIJ778 [66]
4.	<i>vph – phosphotransferase</i>	Устойчивость к виомицину	Виюмицин	pIJ780 [66]
5.	<i>ermE – methyltransferase - erythromycin resistance gene</i>	Устойчивость к макролидным антибиотикам	Эритромицин	pBF24 [67]
6.	<i>hyhB – hygromycin resistance gene</i>	Устойчивость к аминогликозидным антибиотикам	Гигромицин Б	pBF27 N [67]

опосредованный метод, впервые внесли делецию в гены биосинтетического кластера геосмина у штамма *St. coelicolor* A3(2) [66, 68] (рис. 4).

Такая контролируемая генная инженерия позволяет создавать антибиотики за счет комбинаторного биосинтеза в штамме-продуценте. Из штамма удаляют гены основных эндогенных вторичных метаболитов (в случае *St. avermitilis* это авермектин и филипин), гены транспозонов [69], а также IS-последовательности [70], которые не влияют на темпы роста штамма, но способствуют стабильности генома.

Несмотря на удачные результаты [66, 68], PCR-опосредованный метод геномного редактирования имеет свои ограничения, связанные с неуниверсальностью для разных штаммов актиномицетов.

### Cre-loxP Recombination System

Метод Cre-loxP-рекомбинации используется для внесения крупных делеций в геном бактериальных клеток [71, 72] с использованием Cre-рекомбиназы [73, 74]. Для внесения мутации необходимы две последовательности loxP (locus of crossing (x) over, P1), фланкирующие целевой ген, для осуществления сайт-специфической рекомбинации при участии рекомбиназы Cre (рис. 5) [75].

Механизм внесения мутации включает в себя последовательные этапы рекомбинации. Вначале в геном актиномицетов вводятся две loxP-последовательности таким образом, чтобы окаймлять целевой ген. Этот процесс опосредуется двумя актами гомологичной рекомбинации [68]. Далее происходит экспрессия гена белка Cre, рекомбина-

за распознает введенные loxP-последовательности и осуществляет сайт-специфическую рекомбинацию [60], приводящую к делеции целевого гена. По окончании процесса в геноме актиномицетов сохраняется одна из последовательностей loxP.

С помощью такого метода получена делеция порядка 1.4 млн п.н. в генах биосинтетического кластера геосмина в геноме *St. avermitilis* [68]. Данный метод более точен, чем PCR-опосредованный подход, где процесс рекомбинации обусловлен внутренней машинерией клетки и проходит по гомологичным фланкирующим областям целевого гена [59], что носит вероятностный характер. Специфичность и точность Cre/loxP-подхода основаны на наличии loxP-фланкирующих последовательностей, которые специфично распознаются рекомбиназой Cre [76]. Причем последовательность гена *cre* находится под индуцируемым промотором в отдельной плазмиде и тем самым экспрессия Cre-рекомбиназы носит контролируемый характер [77]. Негативной стороной такой системы является сохранение loxP-фрагментов в геноме с изменением геномного контента помимо целевой мутации – делеции.

### pSAM2 Site-Specific Recombination System

В основе системы pSAM2 [78], как и в Cre-loxP-подходе, лежит процесс сайт-специфической рекомбинации [79]. Но в данном случае специфичность обусловлена не активностью рекомбиназы, а определенными последовательностями в геноме – attachment-сайтами: attP (в плазмиде pSAM2) и attB (в геномной ДНК бактерии) [80–82]. Данные области attB, кодируемые нерепликативной плазмидой pSAM2, вводятся в геном актиномицетов посредством гомологичной рекомбинации [59]. Важно отметить, что при снятии селективного давления данная плаزمиды будет элиминироваться из клеток актиномицетов. Введенные в геномную последовательность att-сайты фланкируют целевой ген по обе стороны.

Процесс введения мутации посредством системы на основе pSAM2 включает в себя следующие этапы. На первом этапе происходит рекомбинация по сайтам attP/attB, сопровождаемая интеграцией плазмиды в геном актиномицетов. Далее осуществляется делеция целевого гена, опосредованная эксцизионазой Xis. Ген белка Xis находится в самореплицирующейся плазмиде и при снижении селективного давления удаляется из клеток актиномицетов [83, 84] (рис. 6).

Такой подход применили для делеции биосинтетического кластера рифампицина, размером 90 т.п.н. в клетках *A. mediterranei* DSM 40773 [78]. К основным достоинствам данного метода относится то, что мутантные штаммы содержат дополнительные

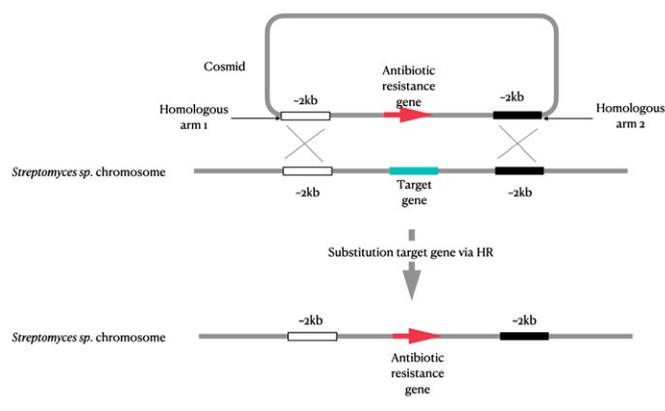


Рис. 4. Схема внесения мутаций в геном актиномицетов с помощью PCR-опосредованного метода геномного редактирования

вставки в районе 30–40 п.н. в геномной последовательности, что не нарушает рамку считывания [85].

### РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА НА ОСНОВЕ ДЕЙСТВИЯ НУКЛЕАЗ

#### I-SceI Meganuclease-Promoted Recombination System

Следующий метод редактирования генома основан на введении двухцепочечных разрывов посредством I-SceI Meganuclease-Promoted Recombination System [86]. В данном случае мегануклеаза I-SceI вносит двухцепочечный разрыв, распознавая уникальную последовательность из 18 п.н. и запускает процесс рекомбинации [87]. Мегануклеаза I-SceI была впервые найдена в митохондриях *S. cerevisiae* [88].

На практике для внесения делеций или замен в нуклеотидную последовательность штаммов актиномицетов необходима кодон-оптимизированная последовательность гена мегануклеазы I-SceI [89, 90], а также чувствительная к температуре плаزمиды pHZ1358 и ее производные (pKC1139 и pJTU1278) (рис. 7). Кроме того, необходима вставка 18 п.н. в геном штамма-продуцента. С помощью этого метода из клеток *St. coelicolor* A3(2) делетировали ген актинородина (*Act*) [86, 91].

Процесс включает в себя ряд актов гомологичной рекомбинации, необходимых для введения I-SceI сайт-специфической 18-нуклеотидной последовательности в геном актиномицетов. Данные сайты кодируются самореплицирующейся плазмидой pKMUSD. Далее происходит контролируемая экспрессия гена белка I-SceI, направляемая индуцибельным промотором *tipA* [92]. Мегануклеаза распознает специфическую последовательность в геноме актиномицетов и вносит двухцепочечные разрывы,



Ключевой недостаток подхода на основе мегануклеазы I-SceI – отсутствие в некоторых штаммах гена *tipA* для индукции генов нуклеазы. Кроме того, этот процесс сопровождается двухцепочечными разрывами ДНК, поэтому ошибки в репарационном аппарате могут приводить к мутациям, которые не связаны с целевой делецией. К положительным сторонам данного метода относится сохранение геномного контента без дополнительных нуклеотидных последовательностей по завершению генетических манипуляций.

### CRISPR/Cas-Based Genome Editing

Технология на основе кластерной регулярно взаимосвязанной системы коротких палиндромных повторов CRISPR/Cas, особенно системы CRISPR/Cas9, стала перспективным инструментом генной инженерии штаммов актиномицетов [95–97].

CRISPR/Cas – естественная система защиты клеток прокариот от чужеродной ДНК [98–100]. Эта технология широко используется для редактирования генома организмов, относящихся к самым разным таксономическим группам. В отличие от редактирования генома на основе мегануклеазы I-SceI [101], технология на основе CRISPR/Cas не требует предварительной интеграции в целевой геном уникальной последовательности, распознаваемой ферментом, а использует транскрибируемую направляющую РНК (sgРНК, химера crРНК и tracrРНК) или только crРНК, чтобы селективно связывать белки Cas в любом участке генома [102, 103]. Комплекс Cas9/crРНК/tracrРНК может нацеливаться на любую последовательность ДНК, известную как протоспейсер, при условии, что на 3'-конце присутствует необходимый три-нуклеотидный мотив, прилегающий к протоспейсеру (PAM) [104, 105], например, NGG в случае *Streptococcus pyogenes*, где N – любой нуклеотид [106].

Для редактирования генома стрептомицетов в основном используются два типа Cas-нуклеаз: Cas9 из *Str. pyogenes*, относящаяся к классу 2 типа II [107], а также Cpf1, также известная как Cas12a из *Francisella novicida*, относящаяся к классу 2 типа V (рис. 8) [103, 108, 109].

По сравнению с другими технологиями редактирования генома система CRISPR/Cas имеет явные преимущества: высокую эффективность, легкость в работе и быстрый результат [110].

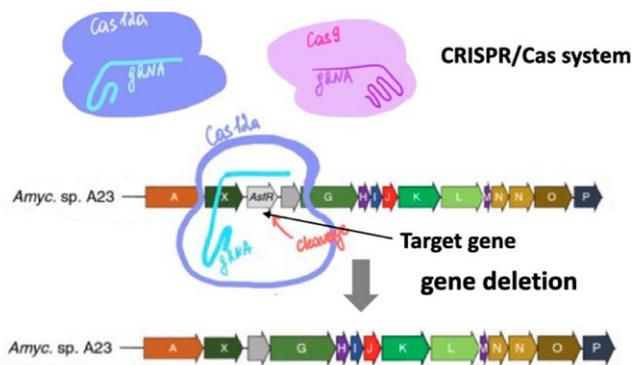
**Cas9-Based Genome Editing.** На основе системы CRISPR/Cas9 разработаны две версии плазмид для манипуляций с геномом стрептомицетов: pCRISPOmyces-1 и pCRISPOmyces-2 [63].

pCRISPOmyces-1 включает последовательности генов crРНК и tracrРНК, а также ген *cas9*. pCRISPOmyces-2 включает химерную кассету sgРНК и ген *cas9*. В обоих случаях для экспрессии элементов CRISPR/Cas используются сильные конститутивные промоторы, а также оптимизированная последовательность гена *cas9* для лучшей экспрессии в *Streptomyces* [111, 112].

Используя данный инструмент, Cobb и соавт. успешно получили делеции ДНК различных размеров 20–31.4 т.п.н., включая отдельные гены и кластеры биосинтеза антибиотиков с эффективностью 21–100% в трех разных видах стрептомицетов [63]. Внесение таких делеций в кластеры биосинтеза стрептомицина и стрептотрицина позволило идентифицировать в ранее известных штаммах-производителях новые антибиотики: тиолактомицин, амицетин, фенантровиридин, 5-хлор-3-формилиндола [113].

Кроме делеций, система CRISPR/Cas позволяет вносить мутации в промоторы. Таким образом удалось активировать молчащие гены биосинтетических кластеров разных классов в пяти штаммах *Streptomyces*, а также идентифицировать уникальные метаболиты, включая новый пятичленный циклический поликетид типа II в *St. viridochromogenes* [114].

Несмотря на очевидные преимущества, система pCRISPOmyces имеет ряд недостатков, связанных с токсичностью белка Cas9 для бактериальной клетки. Это обусловлено расщеплением нецелевой ДНК (off-target-эффект) [115, 116], а также затруднением ее применения у стрептомицетов с низкой трансформирующей эффективностью ДНК [94]. Wang и соавт. создали модифицированную CRISPR/Cas9-систему на основе плазмиды pWHU2653, где ген белка Cas9 находится под индуцируемым промотором, что обеспечивает контроль синтеза белка



**Рис. 8.** Схема внесения мутаций в геном актиномицетов CRISPR-Cas-опосредованным методом геномного редактирования

[117]. Кроме того, процесс репарации двухцепочечных разрывов является АТФ-зависимым, поэтому в плазмиду рWNU2653 для повышения эффективности редактирования был введен ген *AtpD*, кодирующий  $\beta$ -субъединицу АТФ-синтазы (табл. 2) [94].

***Cpf1-Assisted Genome Editing.*** Помимо указанных недостатков, система CRISPR/Cas9 обладает рядом ограничений. Как упоминалось ранее, геном актиномицетов имеет GC-богатый контент [118], а для распознавания белком Cas9 целевой последовательности необходима G-обогащенная (PAM) последовательность (5'-NGG-3'), так, например, у *St. coelicolor* это 260 мишеней на 1000 п.н. [119, 120]. Система на основе белка Cas12a из *F. novicida* обходит это ограничение, поскольку для внесения двухцепочечных разрывов нужна T-обогащенная PAM-последовательность (5'-TTV-3) [121], что повышает специфичность процесса [97]. Используя *Cpf1*-нуклеазу, Yeо и соавт. добились делеции гена в штамме *St. hygrosopicus* SIPI-KF, синтезирующем 5-оксомилбемицин А3/А4, который не мог быть отредактирован с помощью Cas9 из-за его высокой токсичности [120]. Таким образом, *Cpf1* и альтернативные технологии редактирования генома хорошим дополнением текущие инструменты на базе CRISPR/Cas и облегчают обнаружение новых биологически активных веществ у *Streptomyces* spp., а также у представителей других родов актиномицетов (табл. 2) [93].

***CRISPR-BEST (CRISPR-Base Editing System).*** Методы геномного редактирования на основе нуклеаз требуют внесения двухцепочечных разрывов в ДНК, что может приводить к нестабильности генома в связи с неэффективной работой систем репарации [122]. David Liu's разработал альтернативный метод на основе системы CRISPR/Cas, не требующей DSB. Этот метод заключается во введении точечных мутаций, приводящих к появлению стоп-кодона в кодирующей последовательности [123]. Он основан на использовании двух типов дезаминаз: цитидиндезаминаза [124] превращает цитозин в тимин, а адениндезаминаза [125] приводит к трансции, например А-G, С-T. Используя это различие, получены две разновидности генетических конструкций: CRISPR-cBEST, содержащая вариант гена цитидиндезаминазы *APOBEC1* крысы (*rAPOBEC1*), и CRISPR-aBEST с адениндезаминазой, контролируемой индуцируемым промотором *tipA* (*thiostrepton-responsive activator*) [124], поэтому ключевой момент – это наличие гена *tipA* в целевом штамме [125]. Кроме того, обе плазмиды содержат ген *nickase* Cas9 [126] и кодон-оптимизированную

последовательность sgРНК [103]. Использование данных плазмид приводит к экспрессии генов дезаминаз и к трансциям. При дезаминировании аденина в А:Т-паре или цитозина в С:G-паре в одной цепи ДНК возникают новые пары – I:T и U:G. Во время репликации в новой паре U:G урацил будет распознаваться как тимин, а в паре I:T инозин как гуанин; такое несоответствие приводит к активации систем репарации клетки [96, 127].

В первом случае действует урацил-ДНК-гликозилаза (UDG) [128], запускающая механизм эксцизионной репарации [129, 130], либо восстановление исходных пар происходит посредством системы мисматч-репарации [129, 131, 132]. Таким образом исходные пары восстанавливаются в дальнейшем процессе репликации и DSB не требуются.

Важно отметить, что эта система показала хорошие результаты на модельных штаммах *St. coelicolor*, а также на *St. griseofuscus* (табл. 2).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Геномный майнинг и манипуляции с геномом, особенно с генетическими кластерами антибиотиков, обладают огромным потенциалом для выявления новых молекул с антибактериальной активностью. Важно отметить, что открытие новых ВГС в геноме актиномицетов открывает широкие возможности для их редактирования, однако, приходится считаться с рядом ограничений, связанных с методами и инструментами для изменения метаболической активности штаммов.

Каждый из описанных подходов может использоваться для конкретных генно-инженерных задач. Так, например, спонтанный мутагенез находит свое применение в качестве дополнительного инструмента для идентификации ВГС потенциально нового антибиотика. Введение случайных мутаций в геном штамма-продуцента может изменять биосинтетическую активность исследуемого метаболита, а последующий геномный анализ позволяет выявить конкретный участок гена в биосинтетическом кластере, в котором произошло изменение. К ключевым преимуществам сайт-направленного мутагенеза относятся его мишень-ориентированность и эффективность: этот подход применяется на уже известных генных кластерах с целью изменения их экспрессии и последующей идентификации ранее замаскированных молекул в известных изолятах.

Как сказано ранее, большинство методов сайт-направленного мутагенеза, за исключением CRISPR-BEST, объединяет процесс рекомбинации. Причем рекомбинация может происходить либо за счет внутренних систем клетки, как в случае PCR-опосредованного метода, либо за счет

Таблица 2. Методы сайт-направленного мутагенеза в геноме актиномицетов

№ п/п	Метод	Преимущества	Недостатки	Эффективность
1.	PCR-Targeting System	Для введения мутаций не нужны дополнительные инструменты, кроме PCR.	Сложность протоколов, времязатратность, универсальность для разных штаммов актиномицетов, делеция сопровождается внесением в геном селективного маркера.	Эффективность показана только на BGC геосмина, модельного штамма <i>St. coelicolor</i> .
2.	Cre-loxP Recombination System	Возможность делетировать крупные участки генов порядка 1.4 млн п.н. [16]. Большая специфичность за счет участия Cre-рекомбиназы.	Времязатратность, изменение геномного контента, помимо целевой мутации (делеции), в результате сохранения <i>loxP</i> -фрагментов.	Положительный результат показан только на BGC геосмина в штамме <i>St. avermitilis</i> .
3.	pSAM2 Site-Specific Recombination System	Делеция целых BGC, минимальное изменение рамки считывания после эксцизии генетической конструкции.	Времязатратность, сохранение небольших последовательностей в геноме бактерии.	Подход эффективен не только на модельных штаммах стрептомицетов, но и на представителях таких редких родов, как <i>Actinoplanes mediterranei</i> . Метод показал результативность на BGC антибиотиков порядка 90 т.п.н. (кластер рифампицина).
4.	I-SceI Meganuclease-Promoted Recombination System	Осуществление делеций без дополнительного изменения геномного контента.	Для редактирования генома необходима кодон-оптимизированная последовательность гена мегануклеазы I-Sce, а также термочувствительная плаزمиды pKC1139.	Эффективность показана на модельном штамме <i>St. coelicolor</i> на BGC актинородина.
5.	Cas9-Based Genome Editing	Возможность вносить геномные делеции до 30 т.п.н. [16]; метод позволяет вносить мутации в последовательность промоторов.	Токсичность белка Cas9, вследствие эффекта off-target. Для внесения DSB необходима G-обогащенная PAM-последовательность (5'-NGG-3'). Внесенные DSB не всегда могут быть элиминированы внутриклеточными системами репарации.	Эффективность составляет от 21 до 100% как на модельных штаммах стрептомицетов, так и на трех представителях редких родов [16]. Широко используется для редактирования BGC антибиотиков различной длины.
6.	Cpf1-Assisted Genome Editing	Высокая специфичность, так как для внесения DSB нужна T-обогащенная последовательность PAM (5'-TTV-3).	Внесенные DSB не всегда могут быть элиминированы внутриклеточными системами репарации.	Эффективность системы показана на различных штаммах актиномицетов. Белок Cpf1 проявляет специфичность к T-обогащенной PAM-последовательности, что понижает вероятность off-target-эффекта на 26%, увеличивая тем самым результативность от 47 до 100% [44, 60].
7.	CRISPR-BEST (CRISPR-Base Editing System)	Для редактирования генома не требуются DSB, вводятся точечные мутации для появления стоп-кодона.		Метод применим как для модельных штаммов актиномицетов, таких, как <i>St. coelicolor</i> , так и для представителей редких родов. Этот метод относительно новый, его апробируют на известных BGC как актиноридин.

специальных ферментов: Cre-рекомбиназы, Xis-эксцизионазы и Int-интегразы. Несомненно, ферменты и распознаваемые ими специфические последовательности добавляют точности, но вместе с тем изменяют геномный контент.

Ряд методов сайт-направленного мутагенеза основан на введении двухцепочечных разрывов с последующим восстановлением DSB. К таким методам относятся система на основе мегануклеазы I-Sce и вариации CRISPR-Cas (Cas9-Based Genome

Editing и Cpf1-Assisted Genome Editing). Все три подхода могут использоваться для редактирования BGC актиномицетов. Однако геномные особенности этих бактерий накладывают ряд ограничений на использование CRISPR-Cas9, учитывая off-target-эффект и токсичность белка Cas9, а ограничение на применение I-Sce связано с оптимизацией генома для создания 18-нуклеотидной консенсусной последовательности для мегануклеазы. CRISPR-Cas-система на основе нуклеазы Cas12 (Cpf1) распознает иную T-обогащенную PAM-последовательность, что снижает вероятность случайного внесения двухцепочечных разрывов. Помимо специфического взаимодействия нуклеазы с целевой последовательностью, немаловажную роль играет внутренняя клеточная система репарации, связанная с восстановлением двухцепочечных разрывов.

Важно отметить, что для всех вышеописанных методов необходимы свои генетические конструкции с соответствующими нуклеотидными последовательностями, которыми трансформируют штаммы стрептомицетов. Отдельной проблемой всех этих подходов может быть низкая трансформируемость конкретного штамма. Тем не менее, несмотря на все ограничения описанных методологий, они помогли достичь хороших результатов: открыть новые антибиотики и повысить биосинтетический потенциал актиномицетов. Так, в 2003 году с использованием PCR-опосредованного метода редактирования проведены манипуляции на кластере геосмина модельного штамма *St. coelicolor* [36]. Через 7 лет после этого с помощью метода на основе Cre-рекомбиназы также в кластере геосмина получена делеция порядка 1.4 млн п.н., но в штамме *St. avermitilis* [46]. Говоря о сайт-специфическом подходе, нужно упомянуть еще и систему pSAM2. Несмотря на то, что данная плазида создана еще в 1989 году [12], удачный результат с ее использованием получен в 2022 году: была внесена мутация в кластер рифампицина в клетках *A. mediterranei* DSM 40773

[87]. С помощью подхода на основе мегануклеазы I-SceI в 2014 году была получена мутация в кластере актинородина в клетках *St. coelicolor* A3(2) [30]. Возможность применения всех описанных методов для манипуляций на геноме показана пока лишь для актиномицетов; самым эффективным оказался подход CRISPR-Cas, который не только показал результативность, связанную с введением мутаций, но и позволил выявить новые молекулы. Так, в 2019 году, используя метод на основе CRISPR-Cas9, была выявлена способность ранее изученных штаммов-продуцентов стрептомицина синтезировать новые молекулы антибиотиков – тиолактомицин, фенантровиридин, 5-хлор-3-формилиндола [21].

Дальнейшие перспективы использования методов геномного редактирования связаны с возможностью идентифицировать в геномах охарактеризованных штаммов BGC новых антибиотиков и индуцировать их с помощью направленного мутагенеза. Для этого необходимы сочетания предсказательных биоинформатических алгоритмов определения потенциальных BGC вторичных метаболитов и надежного инструментария для направленных мутаций регуляторных участков, введения индуцибельных промоторов и делеции генов-репрессоров. Перспективной представляется и возможность переноса BGC целевых антибиотиков в штаммы, более удобные для экспрессии. Особенно эффективным такой подход может быть в рамках крупномасштабного биотехнологического производства, когда продукцию целевого метаболита увеличивают с использованием специально созданного генно-инженерного штамма, что будет повышать рентабельность производства. ●

Финансирование работы осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-093; проект [BTH-RND-2127]).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aminov R. // *Bioc. Pharm.* 2017. V. 133. P. 4–19.
- Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.P., Clément C., van Wezel G.P. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016. V. 80. № 1. P. 1–43.
- Wright G.D. // *ACS Infect. Dis.* 2015. V. 1. № 2. P. 80–84.
- Cox G., Sieron A., King A.M., De Pascale G., Pawlowski A.C., Koteva K., Wright G.D. // *Cell. Chem. Biol.* 2017. V. 24. № 1. P. 98–109.
- Blin K., Shaw S., Steinke K., Villebro R., Ziemert N., Lee S.Y., Medema M.H., Weber T. // *Nucl. Acid. Res.* 2019. V. 47. № W1. P. W81–W87.
- Baltz R.H., Miao V., Wrigley S.K. // *Nat. Prod. Rep.* 2005. V. 22. № 6. P. 717–741.
- Ochi K. // *Microbiol. Res.* 2017. V. 1. P. 189–203.
- Tomm H.A., Ucciferri L., Ross A.C. // *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 2019. V. 46. № 9–10. P. 1381–1400.
- Matilla M.A. // *Microbiol. Biotech.* 2022. V. 15. № 2. P. 392–394.
- Maglangit F., Fang Q., Kyeremeh K., Sternberg J.M., Ebel R., Deng H.A. // *Mol.* 2020. V. 25. № 2. P. 256.
- Onaka H. // *J. Antib.* 2017. V. 70. № 8. P. 865–870.
- Wang B., Guo F., Dong S.H., Zhao H. // *Nat. Chem. Bio.* 2019. V. 15. № 2. P. 111–114.
- Zou X., Wang L., Li Z., Luo J., Wang Y., Deng Z., Du S., Chen S. // *Med. Res. Rev.* 2018. V. 38. № 1. P. 229–260.
- Mitousis L., Thoma Y., Musiol-Kroll E.M. // *Antib.* 2020. V. 9. № 8. P. 494.

15. Rutledge P.J., Challis G.L. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 13. № 8. P. 509–523.
16. Ochi K. // *J. Antib.* 2017. V. 70. № 1. P. 25–40.
17. Mao D., Okada B.K., Wu Y., Xu F., Seyedsayamdost M.R. // *Cur. Opin. Microbiol.* 2018. V. 45. P. 156.
18. Cimmino T., Metidji S., Labas N., Le Page S., Musso D., Raoult D., Rolain J.M. // *New. Microbiol. Infec.* 2016. V. 12. P. 1–5.
19. Cornell C.R., Marasini D., Fakhr M.K. // *Fron. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2282.
20. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007. V. 71. № 3. P. 495–548.
21. Blaha G.M., Wade J.T. // *An. Rev. Gen.* 2022. V. 56. P. 187–205.
22. Martin J.F. // *J. Indst. Microbiol.* 1992. V. 9. P. 73–90.
23. Walsh C.T., Fischbach M.A. // *J. Amer. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 8. P. 2469–2493.
24. Donadio S., Monciardini P., Sosio M. // *Nat. Prod. Rep.* 2007. V. 24. № 5. P. 1073–1109.
25. Schwecke T., Aparicio J.F., Molnar I., König A., Khaw L.E., Haydock S.F., Oliynyk M., Caffrey P., Cortés J., Lester J.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 17. P. 7839–7843.
26. Tillett D., Dittmann E., Erhard M., von Döhren H., Börner T., Neilan B.A. // *Chem. Biol.* 2000. V. 7. № 10. P. 753–764.
27. Ziemert N., Jensen P.R. // *Meth. Enzym.* 2012. V. 517. P. 161–182.
28. Della Sala G., Mangoni A., Costantino V., Teta R. // *Fron. Chem.* 2020. V. 8. P. 397.
29. Zhu C., Kang Q., Bai L., Cheng L., Deng Z. // *App. Micr. Biot.* 2016. V. 100. P. 1811–1821.
30. An Z., Tao H., Wang Y., Xia B., Zou Y., Fu S., Fang F., Sun X., Huang R., Xia Y., et al. // *Synt. Syst. Biot.* 2021. V. 6. № 4. P. 292–301.
31. Seyedsayamdost M.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 20. P. 7266–7271.
32. Li T., Du Y., Cui Q., Zhang J., Zhu W., Hong K., Li W. // *Mar. Drug.* 2013. V. 11. № 2. P. 466–488.
33. Myronovskiy M., Luzhetskiy A. // *Nat. Prod. Rep.* 2019. V. 36. № 9. P. 1281–1294.
34. Tocchetti A., Donadio S., Sosio M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2018. V. 365. № 9. P. fny064.
35. Zhang J.J., Yamanaka K., Tang X., Moore B.S. // *Meth. Enzym.* 2019. V. 621. P. 87–110.
36. Pyeon H.R., Nah H.J., Kang S.H., Choi S.S., Kim E.S. // *Microbiol. Cell Fact.* 2017. V. 16. № 1. P. 1–9.
37. Li X., Heyer W.D. // *Cell. Res.* 2008. V. 18. № 1. P. 99–113.
38. Astumian J.H., Waldman A.S., Scoocca J.J. // *J. Bact.* 1989. V. 171. № 3. P. 1747–1750.
39. Hume B.C., D'Angelo C., Smith E.G., Stevens J.R., Burt J., Wiedenmann J. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. № 1. P. 1–8.
40. Zhu H., Sandiford S.K., van Wezel G.P. // *J. Indst. Microbiol. Biotech.* 2014. V. 41. № 2. P. 371–386.
41. Sprusansky O., Zhou L., Jordan S., White J., Westpheling J. // *J. Bact.* 2003. V. 185. № 20. P. 6147–6157.
42. Orr-Weaver T.L., Szostak J.W., Rothstein R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. № 10. P. 6354–6358.
43. Bernheim A., Sorek R. // *Natr. Rev. Micr.* 2020. V. 18. № 2. P. 113–119.
44. Sánchez J., Barbès C., Hernandez A., de los Reyes Gavilán C.R.G., Hardisson C. // *Cand. J. Microbiol.* 1985. V. 31. № 10. P. 942–946.
45. Smith K.C. // *Mut. Res. Rev. Gen. Toxic.* 1992. V. 277. № 2. P. 139–162.
46. Riley L.A., Guss A.M. // *Biotech. Biof.* 2021. V. 14. P. 1–17.
47. Volff J.N., Altenbuchner J. // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 27. № 2. P. 239–246.
48. Stonesifer J., Baltz R.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. № 4. P. 1180–1183.
49. Gichner T., Velemínský J. // *Mut. Res. Rev. Gen. Toxic.* 1982. V. 99. № 2. P. 129–242.
50. Thiab R.S., Jasim H.M. // *Iraqi J. Biotech.* 2009. V. 8. № 1. P. 496–504.
51. Sega G.A.A. // *Mut. Res. Rev. Gen. Toxic.* 1984. V. 134. № 2–3. P. 113–142.
52. Drake J.W., Baltz R.H. // *Ann. Rew. Biotech.* 1976. V. 45. № 1. P. 11–37.
53. Ikenaga M., Ichikawa-Ryo H., Kondo S. // *J. Mol. Biol.* 1975. V. 92. № 2. P. 341–356.
54. Lewis K. // *Nature.* 2012. V. 485. № 7399. P. 439–440.
55. De Simeis D., Serra S. // *Antibiot.* 2021. V. 10. № 5. P. 483.
56. Culp E.J., Yim G., Waglechner N., Wang W., Pawlowski A.C., Wright G.D. // *Nat. Biotech.* 2019. V. 37. № 10. P. 1149–1154.
57. Letzel A.C., Pidot S.J., Hertweck C.A. // *Natr. Prod. Rep.* 2013. V. 30. № 3. P. 392–428.
58. Datsenko K.A., Wanner B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
59. Petit M.A. // *Trend. Micr.* 2009. V. 17. № 6. P. 226–232.
60. Smith G.R. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012. V. 76. № 2. P. 217–228.
61. Szostak J.W., Orr-Weaver T.L., Rothstein R.J., Stahl F.W. // *Cell.* 1983. V. 33. № 1. P. 25–35.
62. Thomason L., Court D.L., Bubunenko M., Costantino N., Wilson H., Datta S., Oppenheim A. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2007. V. 78. № 1.16. P. 1–1.16.
63. Cobb R.E., Wang Y., Zhao H. // *ACS Synt. Biol.* 2015. V. 4. № 6. P. 723–728.
64. Yamanaka K., Reynolds K.A., Kersten R.D., Ryan K.S., Gonzalez D.J., Nizet V., Dorrestein P.C., Moore B.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 5. P. 1957–1962.
65. Custodio A.B., Alcantara E.P. // *Asia-Pacific J. Mol. Biol. Biotech.* 2019. V. 27. № 2. P. 56–63.
66. Gust B., Challis G.L., Fowler K., Kieser T., Chater K.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 4. P. 1541–1546.
67. Fayed B., Ashford D.A., Hashem A.M., Amin M.A., El Gazayerly O.N., Gregory M.A., Smith M.C. // *App. Envir. Microbiol.* 2015. V. 81. № 24. P. 8402–8413.
68. Komatsu M., Uchiyama T., Omura S., Cane D.E., Ikeda H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 6. P. 2646–2651.
69. Babakhani S., Oloomi M. // *J. Bas. Microbiol.* 2018. V. 58. № 11. P. 905–917.
70. Ooka T., Ogura Y., Asadulghani M., Ohnishi M., Nakayama K., Terajima J., Watanabe H., Hayashi T. // *Gen. Res.* 2009. V. 19. № 10. P. 1809–1816.
71. Campo N., Daveran-Mingot M.L., Leenhouts K., Ritzenthaler P., Le Bourgeois P. // *App. Envir. Microbiol.* 2002. V. 68. № 5. P. 2359–2367.
72. Yoon Y.G., Cho J.H., Kim S.C. // *Gen. Anal. Biom. Engin.* 1998. V. 14. № 3. P. 89–95.
73. Hallet B., Sherratt D.J. // *FEMS Microbiol. Rev.* 1997. V. 21. № 2. P. 157–178.
74. Jayaram M., Grainge I. // *Dynm. Bact. Gen.* 2005. V. 2. № 2. P. 33–81.
75. Kühn R., Torres R. // *Transg. Techn. Princ. Prot.* 2002. V. 180. P. 175–204.
76. Tian X., Zhou B. // *J. Biol. Chem.* 2021. V. 296. P. 1–15.
77. Marx C.J., Lidstrom M.E. // *Biotech.* 2002. V. 33. № 5. P. 1062–1067.
78. Santos L.D., Caraty-Philippe L., Darbon E., Pernodet J.L. //

- Microorg. 2022. V. 10. № 4. P. 828.
79. Parks A.R., Peters J.E., Wells R.D. // *Mol. Life. Sci.* 2018. V. 1. P. 119–127.
80. Boccard F., Smokvina T., Pernodet J.L., Friedmann A., Guerineau M. // *EMBO J.* 1989. V. 8. № 3. P. 973–980.
81. Raynal A., Friedmann A., Tuphile K., Guerineau M., Pernodet J.L. // *Microbiol.* 2002. V. 148. № 1. P. 61–67.
82. Smokvina T., Mazodier P., Boccard F., Thompson C.J., Guérineau M. // *Gene.* 1990. V. 94. № 1. P. 53–59.
83. Combes P., Till R., Bee S., Smith M.C. // *J. Bact.* 2002. V. 184. № 20. P. 5746–5752.
84. Raynal A., Tuphile K., Gerbaud C., Luther T., Guérineau M., Pernodet J.L. // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 28. № 2. P. 333–342.
85. August P.R., Tang L., Yoon Y.J., Ning S., Müller R., Yu T.W., Taylor M., Hoffmann D., Kim C.G., Zhang X., et al. // *Chem. Biol.* 1998. V. 5. № 2. P. 69–79.
86. Fernández-Martínez L.T., Bibb M.J. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. № 1. P. 1–6.
87. Ouedraogo J.P., Arentshorst M., Nikolaev I., Barends S., Ram A.F. // *App. Micr. Biotech.* 2015. V. 99. P. 10083–10095.
88. Monteilhet C., Perrin A., Thierry A., Colleaux L., Dujon B. // *Nucl. Acid. Res.* 1990. V. 18. № 6. P. 1407–1413.
89. Niu Y., Tenney K., Li H., Gimble F.S. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. № 1. P. 188–202.
90. Siegl T., Petzke L., Welle E., Luzhetskyy A. // *App. Microbiol. Biotech.* 2010. V. 87. P. 1525–1532.
91. Lu Z., Xie P., Qin Z. // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2010. V. 42. № 10. P. 717–721.
92. Murakami T., Holt T.G., Thompson C.J. // *J. Bact.* 1989. V. 171. № 3. P. 1459–1466.
93. Zhao Y., Li G., Chen Y., Lu Y. // *Biomol.* 2020. V. 10. № 5. P. 734.
94. Muth G., Nußbaumer B., Wohlleben W., Pühler A. // *Mol. Genl. Gen. MGG.* 1989. V. 219. P. 341–348.
95. Li D., Zhou H., Zeng X. // *Cell Biol. Toxic.* 2019. V. 35. P. 403–406.
96. Li L., Wei K., Zheng G., Liu X., Chen S., Jiang W., Lu Y. // *App. Envir. Microbiol.* 2018. V. 84. № 18. P. 18.
97. Tao W., Yang A., Deng Z., Sun Y. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1660.
98. Barrangou R., Marraffini L. // *Cell.* 2014. V. 54. P. 234–244.
99. Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., et al. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 13. № 11. P. 722–736.
100. Yosef I., Goren M.G., Qimron U. // *Nucl. Acid. Res.* 2012. V. 40. № 12. P. 5569–5576.
101. Ouedraogo J.P., Arentshorst M., Nikolaev I., Barends S., Ram A.F. // *App. Microbiol. Biotech.* 2015. V. 99. P. 10083–10095.
102. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E.A. // *Sci.* 2012. V. 337. № 6096. P. 816–821.
103. Knott G.J., Doudna J.A. // *Sci.* 2018. V. 361. № 6405. P. 866–869.
104. Gleditsch D., Pausch P., Müller-Esparza H., Özcan A., Guo X., Bange G., Randau L. // *RNA Biol.* 2019. V. 16. № 4. P. 504–517.
105. Karvelis T., Gasiunas G., Young J., Bigelyte G., Silanskas A., Cigan M., Siksnys V. // *Gen. Biol.* 2015. V. 16. P. 1–13.
106. Yñíguez-Gutierrez A.E., Bachmann B.O. // *J. Med. Chem.* 2019. V. 62. № 18. P. 8412–8428.
107. Wei Y., Terns R.M., Terns M.P. // *Gen. Devel.* 2015. V. 29. № 4. P. 356–361.
108. Fonfara I., Richter H., Bratovič M., Le Rhun A., Charpentier E. // *Nature.* 2016. V. 532. № 7600. P. 517–521.
109. Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A. // *Nature.* 2012. V. 482. № 7385. P. 331–338.
110. Kormanec J., Rezuchova B., Homerova D., Csolleiova D., Sevcikova B., Novakova R., Feckova L. // *App. Microbiol. Biotech.* 2019. V. 103. P. 5463–5482.
111. Leskiw B.K., Bibb M.J., Chater K.F. // *Mol. Microbiol.* 1991. V. 5. № 12. P. 2861–2867.
112. Shao Z., Rao G., Li C., Abil Z., Luo Y., Zhao H. // *ACS Synt. Biol.* 2013. V. 2. № 11. P. 662–669.
113. Culp E.J., Yim G., Waglechner N., Wang W., Pawlowski A.C., Wright G.D. // *Nature Biotech.* 2019. V. 37. № 10. P. 1149–1154.
114. Zhang M.M., Wong F.T., Wang Y., Luo S., Lim Y.H., Heng E., Ang E.L., Zhao H. // *Nature Chem. Biol.* 2017. V. 13. № 6. P. 607–609.
115. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. // *Nature Biotech.* 2013. V. 31. № 9. P. 822–826.
116. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., et al. // *Nature Biotech.* 2013. V. 31. № 9. P. 827–832.
117. Wang K., Zhao Q.W., Liu Y.F., Sun C.F., Chen X.A., Burchmore R., Burgess K., Li Y.Q., Mao X.M. // *Front. Bioengin. Biotech.* 2019. V. 7. P. 304.
118. Cimmino T., Metidji S., Labas N., Le Page S., Musso D., Raoult D., Rolain J.M. // *New Microb. New Infect.* 2016. V. 12. P. 1–5.
119. Karvelis T., Gasiunas G., Young J., Bigelyte G., Silanskas A., Cigan M., Siksnys V. // *Gen. Biol.* 2015. V. 16. P. 1–13.
120. Yeo W.L., Heng E., Tan L.L., Lim Y.W., Lim Y.H., Hoon S., Zhao H., Zhang M.M., Wong F.T. // *Biotech. Bioengin.* 2019. V. 116. № 9. P. 2330–2338.
121. Chen P., Zhou J., Wan Y., Liu H., Li Y., Liu Z., Wang H., Lei J., Zhao K., Zhang Y., Wang Y., Zhang X., Yin L. // *Gen. Biol.* 2020. V. 21. № 1. P. 1–13.
122. Hoff G., Bertrand C., Piotrowski E., Thibessard A., Leblond P. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 1–11.
123. Tong Y., Whitford C.M., Robertsen H.L., Blin K., Jørgensen T.S., Klitgaard A.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. P. 20366–20375.
124. Holmes D.J., Caso J.L., Thompson C.J. // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 8. P. 3183–3191.
125. Murakami T., Holt T.G., Thompson C.J. // *J. Bact.* 1989. V. 171. № 3. P. 1459–1466.
126. Gaded V., Anand R. // *RSC Advan.* 2018. V. 8. № 42. P. 23567–23577.
127. Sklenak S., Yao L., Cukier R.I., Yan H. // *J. Amer. Chem. Soc.* 2004. V. 126. № 45. P. 14879–14889.
128. Venkatesh J., Kumar P., Krishna P.S.M., Manjunath R., Varshney U. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 27. P. 24350–24358.
129. Morita R., Nakane S., Shimada A., Inoue M., Iino H., Wakamatsu T., Fukui K., Nakagawa N., Kuramitsu S. // *J. Nucl. Acid.* 2010. V. 2010. P. 1–32.
130. Wozniak K.J., Simmons L.A. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2022. V. 20. № 8. P. 465–477.
131. Schaaper R.M. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 32. P. 23762–23765.
132. Schormann N., Ricciardi R., Chattopadhyay D. // *Prot. Sci.* 2014. V. 23. № 12. P. 1667–1685.