

УДК 577.21

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МИКОБАКТЕРИЙ

© 2022 г. Д. К. Армянинова^а, *, Д. С. Карпов^б, М. С. Котлярова^а, А. В. Гончаренко^а

^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^бЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: dasha.arm@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 26.04.2022 г.

Принята к публикации 28.04.2022 г.

Генетические инструменты, позволяющие целенаправленно изменять геном микобактерий, способствуют развитию наших представлений о физиологии и механизмах вирулентности микроорганизмов этой группы. Особенно важным представляется изучение таких патогенов человека и животных, как возбудители туберкулеза – *Mycobacterium tuberculosis* complex, и лепры – *Mycobacterium leprae*. Проведение генетических исследований открывает новые возможности для идентификации и валидации новых мишеней антибактериальных препаратов и разработки более совершенных вакцин. Несмотря на сложности работы с микобактериями, обусловленные их медленным ростом и ограниченной возможностью переноса генетической информации, достигнуты значительные успехи в разработке методов геномной инженерии этих микроорганизмов. В нашем обзоре рассмотрены основные подходы к целенаправленным изменениям генома микобактерий, такие как гомологичная и сайт-специфическая рекомбинация и применение системы CRISPR/Cas.

Ключевые слова: *Mycobacterium* spp., геномное редактирование, гомологичная рекомбинация, сайт-специфическая рекомбинация, CRISPR/Cas

DOI: 10.31857/S0026898422060040

ВВЕДЕНИЕ

Род *Mycobacterium* включает патогенные и свободноживущие виды. К наиболее важным патогенным микобактериям относятся *M. tuberculosis* complex и *M. leprae*, вызывающие туберкулез и лепру (проказу) соответственно, тогда как *M. avium* complex, *M. abscessus*, *M. ulfans* и *M. fortuitum* относятся к условно-патогенным микроорганизмам человека. Многие виды микобактерий являются свободноживущими. Вид *M. neoaurum* рассматривают как продуцент стероидных соединений для фармацевтики [1].

M. tuberculosis вызывает туберкулез – широко распространенное и опасное инфекционное за-

болевание, являющееся одной из 10 основных причин смертности в мире. *M. tuberculosis* может выживать и размножаться в макрофагах и других иммунокомпетентных клетках, вызывая поражение лимфоидных тканей, легких и других органов [2, 3]. Туберкулез требует длительного лечения, а распространение штаммов с широкой и множественной лекарственной устойчивостью представляет глобальную медицинскую проблему. Внесение целенаправленных изменений в геном микроорганизмов позволяет изучать связь между их генотипом и физиологическими особенностями, а также молекулярные взаимодействия с окружающей средой или с организмом хозяина. Это особенно важно, так как функция значительной части генов *M. tuberculosis* не установлена, несмотря на определение их нуклеотидных последовательностей [4, 5].

Микобактерии являются сложным для генетической манипуляций объектом. Представители группы *M. tuberculosis* complex относятся к медленнорастущим бактериям, которым требуется от 7 дней до 3 недель и более для образования колоний на плотных питательных средах. Микобакте-

Сокращения: БЦЖ – бацилла Кальметта–Герена (аттенуированная профилактическая противотуберкулезная живая вакцина); ПЦР – полимеразная цепная реакция; CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; Cas (CRISPR associated protein) – белок, ассоциированный с CRISPR; crRNA (CRISPR RNA) – CRISPR РНК; tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA) – транскрибирующая CRISPR РНК; PAM (protospacer adjacent motif) – мотив, примыкающий к протоспейсеру.

рии обладают гидрофобной клеточной стенкой, состоящей из липидов, миколовых кислот, полисахаридов и пептидогликана. Эти компоненты обеспечивают рост микобактерий в виде плотной пленки и предотвращают эффективное поглощение ДНК. Несмотря на это, разработаны молекулярно-генетические методы, позволяющие трансформировать микобактерии экзогенной ДНК и значительно расширяющие возможности исследователей, в отношении модификации их генома [6, 7].

Методы геномного редактирования позволяют вносить направленные изменения в геном микобактерий. Создание мутантных штаммов с нокаутом выбранных генов, штаммов с условными нокаутами и штаммов со сверхэкспрессией выбранных генов необходимо для проведения функциональных исследований и поиска мишеней для новых лекарственных препаратов [8–10]. Введение точечных замен позволяет изучать лекарственную устойчивость, которая может развиваться вследствие таких мутаций в генах, кодирующих мишени лекарственных средств или ферменты, участвующие в их модификациях внутри клетки, а также в регуляторных областях этих генов [11].

В результате успешного редактирования генома *M. bovis* штамм ВСЖ (БЦЖ) были улучшены его протективные свойства. Однако БЦЖ часто не может обеспечить надежную защиту, особенно взрослого населения [12, 13]. На основе штамма БЦЖ разработана вакцина VPM1002, успешно проходящая клинические испытания [14]. Рекомбинантный штамм VPM1002 получен путем делеции гена *ureC*, кодирующего уреазу, и интеграции гена *hly* из *Listeria monocytogenes*, кодирующего листериолизин О. Повышенная протективность вакцинного штамма обусловлена способностью клеток выходить из фагосомы при понижении рН за счет действия листериолизина О, в то время как удаление гена уреазы из генома препятствует защелачиванию среды микобактериями [15]. Разработана также рекомбинантная живая вакцина МТВАС на основе *M. tuberculosis*, преимуществом которой перед БЦЖ является расширенный набор протективных антигенов. Вакцинный штамм МТВАС получен путем последовательного введения безмаркерных делеций двух генов — *fadD26* и *phoP* — значимых для вирулентности бактерий [16]. В настоящее время новая вакцина проходит вторую фазу клинических испытаний.

В представленном обзоре описаны основные подходы к редактированию геномов микобактерий с использованием гомологичной рекомбинации, интеграции микобактериофагов и систем CRISPR/Cas.

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МИКОБАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ

Возможность вносить целенаправленные изменения в геном микроорганизмов чрезвычайно важна для изучения функций генов и получения штаммов с заданными свойствами. Основным подходом к выявлению функций гена является получение его нокаута или нокаута и последующая комплементация геном дикого типа. Заменить выбранный аллель мутантным можно с помощью механизма гомологичной рекомбинации.

Нокаут гена получают путем аллельного обмена, требующего прохождения двух кроссинговеров с обеих сторон от вводимой мутации (рис. 1). С этой целью в клетки вносят вектор, несущий модифицированный (например, разрушенный вставкой гена резистентности) аллель целевого гена, фланкированный с обеих сторон участками гомологии (рис. 1а). Первые эксперименты по аллельному обмену на микобактериях проводили с использованием систем такого типа. Они имели ограниченный успех, что было связано с низкой эффективностью трансформации и малой частотой гомологичной рекомбинации в этих микроорганизмах, а также с высокой частотой нелегитимной рекомбинации. Предполагалось, что использование линейного фрагмента должно увеличить частоту гомологичной рекомбинации, однако включение внесенной линейной ДНК чаще происходило без замены целевого участка в геноме [4]. Установлено, что эффективность аллельного обмена как у быстро-, так и у медленно-растущих видов можно повысить при использовании векторов в виде оцДНК (продукт щелочной денатурации или фагемидная оцДНК) или УФ-облученной дцДНК [17].

Сохранение в геноме маркерного гена, обеспечивающего устойчивость к какому-либо антибиотику, затрудняет дальнейшее применение рекомбинантного штамма в биомедицинских приложениях. Вставка гена устойчивости к антибиотикам может оказывать полярный эффект на экспрессию нижестоящих генов в опероне, что влияет на получаемый фенотип и усложняет его характеристику. Кроме того, интеграция кассеты устойчивости к антибиотикам в хромосому исключает этот маркер из дальнейших генетических манипуляций [18]. Решить проблемы нежелательности присутствия генов антибиотикорезистентности при получении серии нокаутов позволяют системы, основанные на использовании сайт-специфичных систем рекомбинации, полученных из бактериофагов или транспозонов (рис. 1б).

Удаление генов антибиотикорезистентности, интегрированных в геном бактерий в ходе гомологичной рекомбинации, можно осуществить с помощью рекомбиназы FLP *Saccharomyces cerevisiae*.

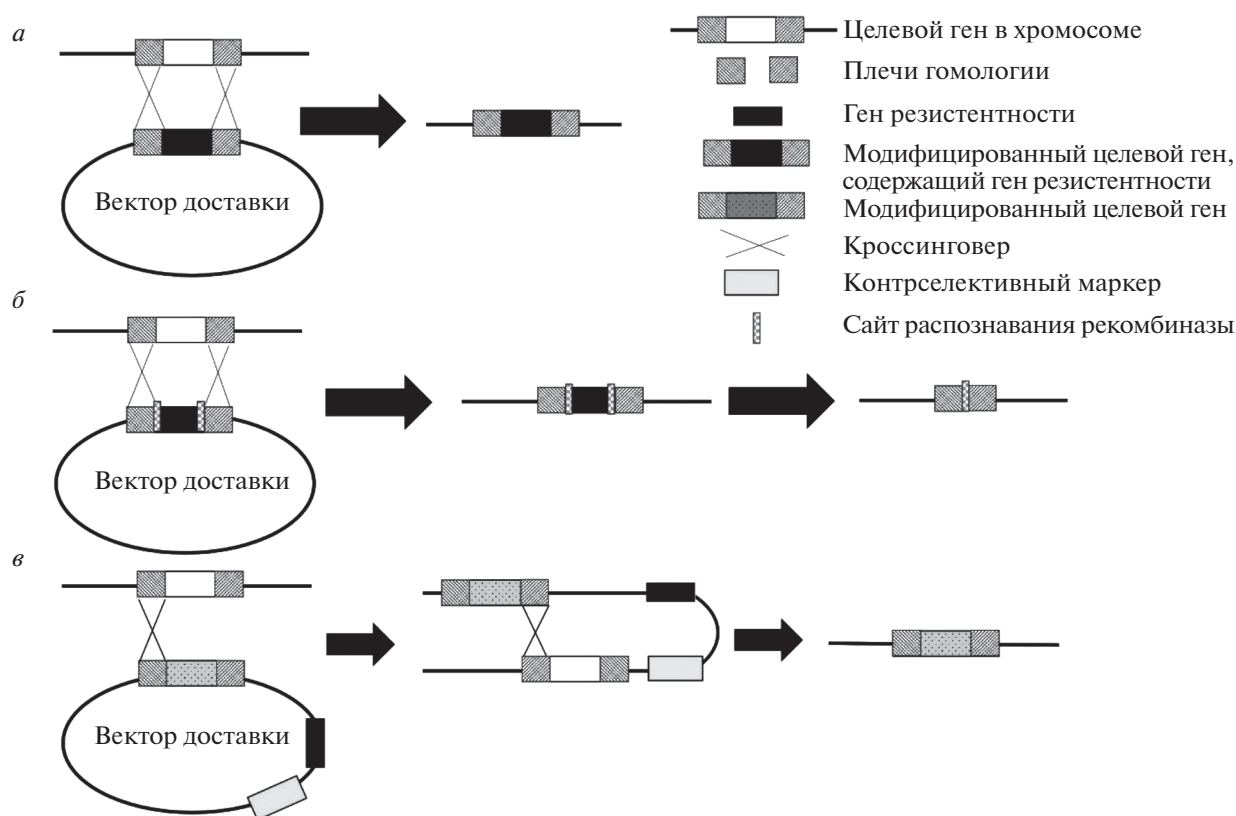


Рис. 1. Схемы получения нокаутов и других модификаций целевых генов методом гомологичной рекомбинации. *а* – Получение маркированного мутанта методом гомологичной рекомбинации. Клетки трансформируют вектором, несущим модифицированный аллель гена, содержащий ген резистентности. Отбирают мутантов, в которых кроссинговер произошел по обеим сторонам от вводимой мутации. *б* – Схема получения немаркированного нокаута с использованием сайт-специфичной рекомбинации. Используется конструкция, содержащая модифицированный аллель, несущий ген резистентности, окруженный сайтами распознавания рекомбиназы. Аллельный обмен осуществляется в один этап, после отбора мутантов ген резистентности удаляется рекомбиназой. *в* – Схема двухэтапного получения немаркированных мутантов с использованием суицидного вектора. Конструируется суицидный вектор, несущий модифицированный аллель целевого гена и кассету, содержащую маркерный ген, соединенный с контрселективным маркером. После трансформации клетки высевают на среду, содержащую антибиотик, для отбора мутантов, в которых произошел первый кроссинговер, в результате чего тело вектора интегрируется в хромосому. Далее полученные мутанты проходят второе событие кроссинговера и подвергаются негативному отбору, в результате чего выживают только те мутанты, которые потеряли контрселективный маркер, а вместе с ним и селективный маркер.

siae. Эта рекомбиназа, как показано, функциональна в клетках *M. smegmatis* и опосредует сайт-специфичную рекомбинацию между двумя сайтами *FRT* в хромосоме [19]. Если ген устойчивости к гиромоцину окружить двумя мишенями распознавания *FLP* (*FRT*) в прямой ориентации, то ген *hug* специфично удаляется из хромосомы мутантов *M. smegmatis* при экспрессии гена *FLP* [19]. Дополнительная оптимизация кодонов гена *FLP_m* привела к более эффективной работе системы в *M. smegmatis*, а также обеспечила возможность ее использования в медленно растущих микобактериях. Так, в эксперименте на *M. bovis* BCG около 40% резистентных клонов потеряли кассету устойчивости *hug* после кратковременной экспрессии гена *FLP_m*. Секвенирование хромосомной ДНК показало специфичность вырезания кассеты *FRT-hyg-FRT* с помощью *FLP* [20].

По тому же принципу работает система из бактериофага P1: кассету с маркером устойчивости окружают сайтами узнавания *loxP*, а кратковременная экспрессия рекомбиназы Cre приводит к ее вырезанию [21]. Еще один вариант – использование системы из $\gamma\delta$ транспозона. Плазмиду, содержащую кассету устойчивости к канамицину, фланкированную двумя сайтами *ges*, использовали для получения немаркированных делеций в *M. smegmatis* и БЦЖ. Экспрессия в мутантных штаммах гена резольвазы $\gamma\delta$ транспозона (*tnpR*) приводила к эффективному вырезанию гена устойчивости, фланкированного *ges*-сайтами [18].

Для удаления генов резистентности можно использовать также систему, основанную на эндогенной рекомбиназе Xer. В этой системе кассету устойчивости к антибиотику окружают *dif*-сайтами, которые могут распознаваться и разрешаться

рекомбиназами XerC и XerD. Такая система не требует введения и последующей элиминации дополнительных эписомных элементов, что делает ее чрезвычайно простой и практичной [22]. Система была оптимизирована и использована для нарушения нескольких генов в разных локусах микобактериального генома, что очень важно при конструировании аттенуированных микобактерий и при изучении синергического действия генов и функций дублирующих генов [23].

Метод двухэтапного аллельного обмена для получения немаркированных мутантов стал классическим инструментом генной инженерии микобактерий (рис. 1б). В рамках этого подхода Parish и соавт. разработали систему p2Nil/pGoal, облегчающую сборку конструкций для гомологичной рекомбинации [28, 29]. Векторы серии p2NIL служат для клонирования плеч гомологии или модификации гена-мишени, векторы серии pGOAL содержат маркерные кассеты, например, *lacZ* в сочетании с *sacB* и геном устойчивости к антибиотикам. Вставка маркерной кассеты из pGOAL в p2NIL с модифицированным целевым геном позволяет получить не реплицирующийся в микобактериях суицидный вектор. Получение нокаута/модификации происходит в два этапа: на первом этапе клетки высеваются на среду, содержащую антибиотик и X-gal, чтобы выделить синие колонии, в которых плаزمид включена в геном посредством одного события кроссинговера. Чтобы выделить клоны, в которых произошел второй кроссинговер, клетки высевают на среды без антибиотика, содержащие сахарозу. Так как второй кроссинговер приводит к потере *lacZ* и *sacB*, такие колонии имеют белый цвет и чувствительны к сахарозе. Таким образом получен двойной немаркированный мутант *thyAΔ plcABCD* [24]. Этот метод достаточно широко применяется для решения различных задач, связанных с оценкой роли белков и малых РНК в физиологии микобактерий [25–27].

Суицидный ген *sacB* (*Bacillus subtilis*) широко используется для конструирования как немаркированных, так и меченых мутаций в *M. tuberculosis*. Однако частота спонтанной инактивации *sacB* может находиться практически на том же уровне, что и частота рекомбинации некоторых генов, что усложняет отбор мутантов. Использование двойной контрелекции (*sacB* с геном *Escherichia coli galK*) позволило добиться практически 100%-ной эффективности селекции на микобактериях [28]. Этот принцип использован в оптимизированных суицидных векторах (серия pKO), которые являются частью единой платформы клонирования для генетических манипуляций с микобактериями [10].

Увеличить вероятность прохождения гомологичной рекомбинации можно с использованием реплицирующихся векторов, однако их труднее

удалить. Плазмиды, несущие термочувствительный ориджин репликации, способны реплицироваться при перmissive температуре (30–32°C), но быстро утрачиваются при повышении температуры (39–42°C). Плаزمид для проведения гомологичной рекомбинации также должна содержать контрелективный маркер, например *sacB*. Недостатком этого метода является низкая скорость роста при перmissive температуре [8].

Предложено также использовать систему из двух реплицирующихся плазмид на основе pAL5000, одна из которых содержит *repA* (праймаза), а вторая – *repB* (ДНК-связывающий белок). Эти гены комплементируют друг друга в *trans*-положении и обеспечивают репликацию плазмид [29]. При снятии давления антибиотиком одна или обе плазмиды теряются, а поддержание репликации становится невозможным. Такой подход позволяет продлить время, за которое может произойти обмен аллелями.

Метод специализированной трансдукции позволяет добиться практически 100%-ной эффективности доставки ДНК в клетки. Сборка вектора осуществляется из двух компонентов: космидного вектора, содержащего последовательность для обмена аллелей, и условно реплицирующегося челночного фазмидного вектора – производного фага TM4 с широким кругом хозяев [30]. Микобактериофаги наращивают в *M. smegmatis* при перmissive температуре (30°C), обеспечивающей репликацию фага. Далее следует трансдукция представляющего интерес штамма микобактерий и культивирование при рестриктивной температуре (37°C), ингибирующей репликацию фага. Мутантный аллель содержит ген резистентности, фланкированный сайтами узнавания резольвазы (*tnpR*), временная экспрессия которой приводит к удалению маркера. Метод успешно применен на БЦЖ [31] и *M. tuberculosis* [32]. В дальнейшем эта методика была улучшена и проверена путем создания большого числа целевых единичных или множественных делеционных замен [33, 34].

Использование белков рекомбинации фагов, таких как Exo, Beta и Gam или RecE и RecT, способствует увеличению частоты гомологичной рекомбинации и позволяет использовать более короткие плечи гомологии. Установлено, что продукты генов *gp60* и *gp61* микобактериофага Che9c являются гомологами RecE и RecT и обладают экзонуклеазной и ДНК-связывающей активностью. На их основе создана плаزمид pJV53 для проведения гомологичной рекомбинации в клетках микобактерий. Рекомбинация может происходить при длине плеч гомологии от 50 п.н., но более эффективна, если их длина превышает 500 п.н. Эта система не только упрощает конструирование мутантов в *M. smegmatis*, но и позволяет преодолеть влияние нелегитимной рекомбинации в

M. tuberculosis [35]. Введение в плазмиду pJV53 гена зеленого флуоресцентного белка (*gfp*) облегчает верификацию потери плазмиды. Применение кассеты резистентности к гиромоцину с сайтами *dif* позволяет использовать эту систему для последовательной делеции нескольких генов *M. smegmatis* [36]. Для конструирования немаркированных нокаутов предложено использовать также трехплазмидную систему. В этой системе хелперная плазида содержит термочувствительный ориджин и суицидный ген *sacB* [37]. Плазмиду pYS2 используют для конструирования мутантного аллеля, в который вводят кассету, кодирующую гены устойчивости к гиромоцину и зеленого флуоресцентного белка, окруженные сайтами *loxP*. Из плазмиды получают линейный субстрат, которым трансформируют клетки. Плазида pYS1, производная pJV53, используется для доставки генов *gp60* и *gp61* под индуцибельным промотором. Она также содержит контрольный маркер *sacB*, термочувствительный ориджин репликации и ген устойчивости к канамицину. После проведения рекомбинации клетки трансформируют третьей плазмидой pML2714 для экспрессии рекомбиназы Cre и вырезания кассеты, в результате чего мутантные клоны теряют способность к флуоресценции и устойчивость к гиромоцину.

На основе рекомбиназы фага Che9c разработана система для введения точечных мутаций в геномы микобактерий с использованием оцДНК. Опосредованная *gp61* рекомбинация была достаточно эффективной, чтобы можно было вносить замены одного основания без необходимости прямого отбора; при этом мутантные штаммы идентифицировали с помощью ПЦР. Однако трудоемкий скрининг целевых клонов ограничивает использование этой системы [38].

Таким образом, методы гомологичной рекомбинации успешно применяются для генетического редактирования в микобактериях. Разработаны подходы, совмещающие гомологичную рекомбинацию для обмена аллелей и сайт-специфическую рекомбинацию для последующего удаления генов резистентности, что дает возможность получать простые и эффективные системы редактирования, в том числе с использованием специализированной трансдукции. Применение рекомбинационной инженерии с белками RecE и RecT фага Che9c многократно увеличивает эффективность системы.

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МИКОБАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ РЕКОМБИНАЗ МИКОБАКТЕРИОФАГОВ

Сайт-специфичная рекомбинация — тип генетической рекомбинации, при которой обмен цепей ДНК происходит между определенными последовательностями. В отличие от системы гомо-

логичной рекомбинации такие специфичные сегменты ДНК не имеют протяженных гомологичных участков. Рекомбинацию осуществляет фермент рекомбиназа, которая распознает специфичную последовательность и, связываясь с ней, образует синаптический комплекс, который, в свою очередь, катализирует расщепление хромосомной ДНК с последующими перестройкой и лигированием расщепленных концов [39].

В результате сайт-специфичной рекомбинации во многих случаях происходит интеграция одной молекулы ДНК в другую, а не обмен генетической информации между двумя молекулами.

У бактериофагов рекомбиназа может катализировать обратную реакцию удаления интегрированной последовательности. Многие умеренные бактериофаги, образующие стабильные лизогены, делают это с помощью сайт-специфичной рекомбинации. Одним системам рекомбинации достаточно только рекомбиназы, другим же требуются дополнительные хозяйские факторы.

Способность микобактериофагов стабильно интегрироваться в геном хозяина посредством сайт-специфичной рекомбинации изучали многие научные группы [40–45]. Наиболее хорошо изучены фаги L5, Ms6, Vxb1 и φRv1 микобактерий, о механизме интеграции которых речь будет идти дальше. Изучен также интегративный элемент pSAM2 микобактерий, первоначально идентифицированный у *Streptomyces*.

Наиболее характерным микобактериофагом является умеренный фаг L5, который инфицирует как быстрорастущие, так и медленно растущие виды микобактерий с образованием стабильных лизогенов [45]. Лизогены несут встроенный в определенное место хромосомы профаг L5, который вырезается во время литической фазы. События как интеграции, так и эксцизии катализируются кодируемой фагом интегразой Int и нуждаются в кодируемом хозяином белке mINF (Integration Host Factor). Направленность этих событий рекомбинации определяется вторым кодируемым фагом белком Xis, продуктом гена *36*. Интеграция эффективно протекает в отсутствие Xis в отличие от эксцизии, которая зависит от этого белка [46].

Сайт-специфичная рекомбинация происходит посредством взаимодействия фагового сайта (*attP*) с сайтом прикрепления на бактериальной хромосоме (*attB*). Реакция интеграции воспроизведена *in vitro*; показано, что для нее требуются белки mINF и Int [41, 47]. Сверхспирализация последовательностей *attP* или *attB* может стимулировать интегративную рекомбинацию, но не относится к абсолютно необходимым [48].

Минимальные размеры функциональных сайтов *attP* и *attB* составляют примерно 240 и 29 п.н. соответственно. Последовательность *attP* содержит 43 п.н., общих для двух сайтов, в которых

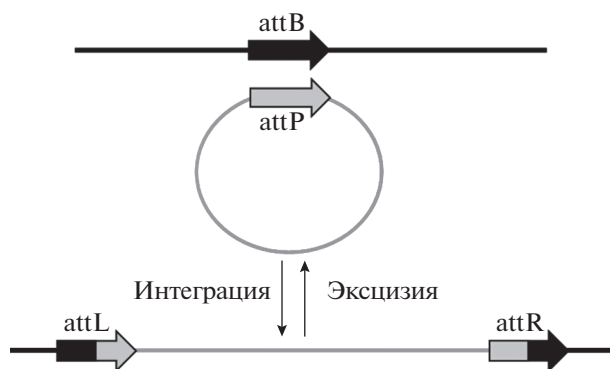


Рис. 2. Общая схема сайт-специфической рекомбинации.

происходит обмен цепями, и рекомбинация приводит к образованию интегрированного профага, ограниченного левым (attL) и правым (attR) сайтами (рис. 2) [49]. Различие в одном нуклеотиде сайта attB у быстрорастущих и медленно растущих микобактерий не влияет существенно на способность микобактериофага L5 эффективно инфицировать обе группы микобактерий [45].

Бактериофаг L5 встраивается вблизи 3'-конца гена $tRNK^{Gly}$, не изменяя его последовательности. С помощью футпринтинга ДНКазы I выявлена необычно длинная область длиной 413 п.н., служащая attP-сайтом интегразы L5. В ходе дальнейшего делеционного анализа внутри attP-сайта картирован фрагмент длиной 252 п.н., достаточный для эффективной интеграции фага [49].

Систему фага L5 впервые использовали при получении новых рекомбинантных штаммов БЦЖ [43]. Путем замены микобактериального ориджина репликации (*oriM*) в челночном векторе pMV261 на сегмент ДНК, несущий последовательность сайта attP и ген интегразы (*Int*) из микобактериофага L5, сконструирован способный к интеграции вектор pMV361. Поскольку отсутствует фаговый белок Xis, интегрированный вектор стабильно поддерживается даже без дальнейшего давления антибиотиков.

Геномы микобактериофагов Vxb1 и L5 имеют сходную организацию [42]. С помощью сериновой интегразы фаг Vxb1 встраивается в функциональный ген *groEL1* [45]. Микобактерии имеют два гена *groEL*, обладающие высоким уровнем сходства на уровне нуклеотидов (70%), но так как интеграция требует специфичности последовательности, Vxb1 встраивается только в *groEL1*. При этом сериновые интегразы, в отличие от многих других сайт-специфичных рекомбиназ, не обладают сильной специфичностью к структуре молекул ДНК-субстрата; они рекомбинируют участки в одной и той же молекуле ДНК (в ориентации либо голова к голове, либо голова к хвосту)

или в разных молекулах, а сами молекулы могут быть сверхскрученными, линейными или даже двухцепочечными [50].

В отличие от сайтов тирозиновых интеграз, сайты attP и attB сериновых интеграз короткие, примерно 50 и 40 п.н. соответственно. Различается также механизм обмена цепями ДНК — тирозиновые интегразы делают одноцепочечные разрывы в ДНК и заменяют одну цепь каждого сайта с образованием промежуточной структуры, подобной соединению Холлидея [51], тогда как сериновые интегразы вносят двухцепочечные разрывы в ДНК и обмениваются цепями по ротационному механизму [52].

Путем объединения двух молекулярных инструментов — гомологичной рекомбинации и сайт-специфичной интеграции — разработана технология ORBIT (oligonucleotide-mediated recombineering followed by Vxb1 integrase targeting) [53, 54]. Система ORBIT реализует встраивание целевых фрагментов ДНК в два этапа. Штамм *M. smegmatis* или *M. tuberculosis*, содержащий плазмиду, которая экспрессирует рекомбиназу RecT фага Che9c и интегразу фага Vxb1, котрансформируют короткой синтетической ДНК и нереплицирующейся плазмидой, содержащей сайт attB Vxb1, ген устойчивости к антибиотику для отбора трансформантов и целевую последовательность. Дизайн олигонуклеотида осуществляют таким образом, чтобы attP фага Vxb1 (48 н.) был фланкирован 45–70 н., гомологичными целевому участку на хромосоме.

На первом этапе в заданный участок генома микобактерии по механизму гомологичной рекомбинации при участии Che9c RecT встраивается олигонуклеотид, несущий акцепторный сайт attP интегразы Vxb1. На втором этапе интегразы Vxb1 способствует сайт-специфичной рекомбинации между плазмидой, содержащей attB, и сайтом attP, полученным из олигонуклеотида на первом этапе. В этой системе последовательность синтетического олигонуклеотида определяет положение сайта вставки, а плаزمида служит донором целевой последовательности.

Так как используемая в данной системе интегразы фага Vxb1 не зависит от факторов хозяина, возможность применения ORBIT будет зависеть от эффективности первого этапа рекомбинации.

Микобактериофаг Ms6 образует стабильные лизогены в *M. smegmatis*. Сайт прикрепления attP Ms6 имеет высокое содержание А+Т и содержит многочисленные прямые и инвертированные повторы. Интеграция Ms6 в геном хозяина опосредуется интегразой Ms6, которая направляет интеграцию в 3'-конец генов $tRNK^{Ala}$ как быстро-, так и медленно растущих микобактерий. Центральная область attP длиной 26 п.н. перекрывает 3'-конец гена

тРНК^{Ala}, консервативного признака обеих групп микобактерий [40].

Геномы *M. tuberculosis* H37Rv и CDC1551 содержат два профагоподобных элемента — ϕ Rv1 и ϕ Rv2. Элемент ϕ Rv2 кодирует тирозиновую, а ϕ Rv1 — большую сериновую рекомбиназу [55]. Рекомбинация происходит между предполагаемым сайтом attP и хромосомой хозяина, но сайт attB находится при этом внутри избыточного повторяющегося элемента (REP13E12), представленного в геноме *M. tuberculosis* семью копиями. Интересно, что авирулентные штаммы *M. bovis* BCG не имеют ни ϕ Rv1, ни ϕ Rv2. Хотя не все клинические изоляты *M. tuberculosis* содержат ϕ Rv2, все они, по-видимому, имеют по крайней мере одну копию ϕ Rv1 или ϕ Rv2. Предполагается, что эти родственные элементы могут играть роль в физиологии *M. tuberculosis* [44]. Функциональность ϕ Rv1 подтверждена эффективной трансформацией *M. bovis* BCG нереплицирующейся плазмидой, содержащей ген интегразы и сайт attP (реконструированный из сайтов attL и attR профага). Такие векторы могут использовать четыре из семи сайтов REP13E12, присутствующих в БЦЖ, в качестве сайтов присоединения и могут занимать более одного сайта одновременно [55].

pSAM2 представляет собой интегративный элемент длиной 11 т.п.н., первоначально охарактеризованный у *Streptomyces ambofaciens*. Система рекомбинации pSAM2, включающая интегразу семейства λ [56] и сайты attB/P, похожа на системы, описанные выше. Сайт attB покрывает область от антикодоновой петли до 3'-конца гена тРНК^{Pro} длиной 58 п.н. Сайт attB консервативен у актиномицетов, включая микобактерии [57]. Таким образом, pSAM2 может интегрироваться в различные виды актиномицетов.

Использование сайт-специфичной рекомбинации имеет несколько преимуществ. Во-первых, гены воспроизводимо интегрируются в известное место в геноме микобактерий (или, по крайней мере, в ограниченное число мест). Любые эффекты сайтов интеграции (их влияние на экспрессию генов и биологию бактерий) будут в равной степени применимы к любой вставке. Во-вторых, интегрируется одна копия гена, что снижает количество артефактов, которые могут возникать при использовании многокопийных плазмид. В-третьих, штаммы, содержащие интегративные плазмиды, обычно гораздо более стабильны, чем штаммы с эписомными векторами. Наконец, интегразы микобактериофагов могут обеспечить эффективное встраивание более протяженных фрагментов ДНК, чем при гомологичной рекомбинации.

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МИКОБАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМ CRISPR/Cas

CRISPR/Cas — это прокариотические системы, состоящие из коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, и ассоциированных с ними белков. Они обеспечивают адаптивный иммунный ответ против чужеродного наследственного материала [58]. Системы второго класса, содержащие один эффекторный белок CRISPR, способный с помощью crRNA распознавать и гидролизовать ДНК-мишень, используются в технологии редактирования *in vivo* генома различных живых организмов. Наиболее часто применяют системы типа II-A из *Streptococcus pyogenes* и типа V-A из *Francisella novicida* [59, 60]. Система редактирования генома из *S. pyogenes* представлена мультидоменной РНК-зависимой ДНК-эндонуклеазой SpyCas9, специфичность которой определяется направляющей РНК. Направляющая РНК, в свою очередь, содержит участок длиной 20 н., называемый спейсером, который комплементарен ДНК-мишени (протоспейсеру), и структурную часть, распознаваемую эндонуклеазой SpyCas9. Направляющая РНК может состоять из двух РНК: crRNA (CRISPR РНК, кодируется CRISPR-повторами) и tracrRNA (спейсерная РНК, кодируется отдельным геном и необходима для процессинга crRNA и связывания SpyCas9) или одной РНК, полученной путем слияния этих двух РНК (химической направляющей РНК, sgRNA) [61]. Для правильного распознавания ДНК-мишени — протоспейсера, справа от него должен находиться короткий участок PAM (Protospacer Adjacent Motif) с последовательностью 5'-NGG-3'. Присутствие PAM и почти полное соответствие между спейсером направляющей РНК и протоспейсером геномной ДНК активируют ДНКазную активность SpyCas9. SpyCas9 вносит двухцепочечный разрыв в ДНК с тупыми концами, активирующий клеточные механизмы репарации ДНК, в ходе которой и происходит наследуемое изменение последовательности генома [60]. Система типа V-A из *F. novicida* состоит только из двух частей: мультидоменной РНК-зависимой ДНК-эндонуклеазы FnoCas12a (Cpf1) и направляющей РНК, содержащей короткую шпильку, распознаваемую эндонуклеазой, и спейсер длиной 23 н. [62]. Последовательность PAM, узнаваемая эндонуклеазой FnoCas12a, представляет собой консенсус 5'-VTTV-3' [63] и, в отличие от системы II-A *S. pyogenes*, он должен находиться слева от протоспейсера ДНК [64]. Кроме того, FnoCas12a, в отличие от SpyCas9, вносит двухцепочечный разрыв ДНК с выступающими концами [64].

Систему CRISPR/Cas *S. pyogenes* первой планировали использовать в качестве гетерологич-

ной системы редактирования генома микобактерий. Однако эндонуклеаза *SpyCas9* оказалась токсичной для микобактерий, особенно при экспрессии ее гена под контролем сильного конститутивного промотора гена *hsp60* [65, 66]. В первых экспериментах удалось адаптировать ее форму без нуклеазной активности (*dSpyCas9*) в целях подавления экспрессии генов [67]. Следует отметить, что ген *dSpyCas9* экспрессировали под контролем тетрациклин-регулируемого промотора, что позволяло избежать токсичного эффекта сверхпродукции *dSpyCas9*. Сообщалось, что нуклеаза *SpyCas9* и ее производные с никазой и без нуклеазных активностей очень токсичны и для грамположительной бактерии *Corynebacterium glutamicum* с GC-богатым геномом [68]. Логично предположить, что токсичность *SpyCas9* в бактериях с GC-богатыми геномами может быть связана с ее неспецифичной ДНК-связывающей активностью из-за GC-богатого РАМ. Это предположение ставится под сомнение данными о том, что *SpyCas9* токсична и после мутирования РАМ-связывающих остатков аргинина [66]. Возможно, токсичность *SpyCas9* в значительной мере опосредована белок-белковыми взаимодействиями. Недавно на клетках млекопитающих показали, что за счет взаимодействия с субъединицей Ku78 ДНК-зависимого киназного комплекса *SpyCas9* дикого типа (*dSpyCas9*) негативно влияет на активность пути репарации ДНК по механизму соединения негомологичных концов (NHEJ) [69], тем самым стимулируя спонтанный мутагенез. Показано, что природные системы CRISPR/Cas9 типа II-A способны подавлять активность NHEJ в клетках бактерий [70]. Эти данные указывают на то, что *SpyCas9* способен взаимодействовать с клеточными белками, тем самым нарушая нормальное протекание клеточных процессов. Тем не менее, не исключен вклад и других факторов в токсичность *SpyCas9*. Так, недавно удалось снизить токсичность системы CRISPR/*SpyCas9* в клетках *C. glutamicum* за счет использования сильного терминатора *grnB* *E. coli* для sgRNA, а также рекомбиназы *RecT* из профага *Rac* в сочетании с донорным фрагментом ДНК в виде олигонуклеотида [71]. По аналогии можно предположить, что терминатор sgRNA *S. pyogenes* не функционирует и в микобактериях и, несмотря на существование трех путей репарации двухцепочечных разрывов ДНК [72], клетки микобактерий не способны эффективно репарировать разрывы ДНК, вызываемые *SpyCas9*.

Токсичность CRISPR/*SpyCas9* способствовала поиску альтернативных систем редактирования микобактерий. В модельной системе с использованием репортерного гена люциферазы *Renilla* исследовали репрессорную активность 11 различных ортологов *SpyCas9* без нуклеазной активности, принадлежащих типам II-A и II-C си-

стем CRISPR/Cas [66]. Экспрессию генов эндонуклеаз Cas контролировали с помощью тетрациклин-регулируемого промотора. В этой системе наиболее эффективным и нетоксичным репрессором оказался *dSt1Cas9* из *S. thermophilus*. Результаты, полученные в модельной системе, подтверждены и в экспериментах по подавлению экспрессии генов микобактерий [66]. Следовательно, *St1Cas9* может служить хорошим кандидатом и в экспериментах по редактированию генома. Однако в недавних исследованиях показано, что конститутивная экспрессия гена *St1Cas9* под контролем промотора гена *hsp60* токсична для *M. smegmatis* [65]. Это означает, что при создании системы редактирования генома микобактерий с участием *St1Cas9* необходимо обеспечить контроль над экспрессией его гена, например, с помощью тетрациклин-регулируемого промотора. Впоследствии это было сделано Meijers и соавт. [73]. Токсичность *St1Cas9* удалось снизить не только благодаря тетрациклин-регулируемому промотору, а также экспрессии единичной копии гена *St1Cas9*, встроенной в геном микобактерий с помощью интегразы фага L5. Оптимальная последовательность РАМ этого редактора 5'-NNAGAAW-3' (где вырожденная позиция W соответствует А или Т) в GC-богатом геноме микобактерий встречается очень редко. Однако известно, что *in vitro* *St1Cas9* в повышенной концентрации способен распознавать РАМ с небольшими отличиями от консенсуса [74]. В соответствии с этими данными показано, что *St1Cas9* способен распознавать субоптимальные РАМ с последовательностью 5'-NNGGAA-3' и 5'-NNAGCAT-3', благодаря чему можно значительно увеличить число потенциальных мишеней в геноме микобактерий *M. marium* и *M. tuberculosis* [73]. С помощью *St1Cas9* успешно выполнен нокдаун целевых генов (эффективность около 50%) и делеции генов (эффективность 22%). В то же время с использованием полногеномного секвенирования показано, что кратковременная индукция экспрессии *St1Cas9* в течение 1 ч практически не приводит к появлению нецелевых мутаций. Однако нежелательные мутации детектируются при более длительной (в течение 10 дней) его экспрессии. Вместе с тем, обнаружено "подтекание" используемого в работе контролируемого промотора, что выражается в появлении отредактированных колоний даже в отсутствие индуктора. В связи с фоновой экспрессией *St1Cas9* и его способностью вызывать при длительной экспрессии нецелевые мутации, предложен способ удаления гена *St1Cas9* из генома микобактерий путем его замены на репортерный ген красного флуоресцентного белка *tdTomato* с помощью гомологичной рекомбинации [73].

Первой системой, использованной собственно в редактировании генома микобактерий, а также *C. glutamicum* [68], стала система типа V-A

из *F. novicida* [75]. Показано, что вносимые Fno-Cas12a двухцепочечные разрывы ДНК летальны для микобактерий. Эти данные подтверждают предположение о том, что пути репарации ДНК микобактерий не могут эффективно справляться с разрывами ДНК, вносимыми гетерологичными системами CRISPR/Cas. Токсичность двухцепочечных разрывов ДНК, вносимых FnoCas12a, в микобактериях преодолена с помощью рекомбиназы микобактериофага Che9c и фрагмента ДНК донора рекомбинации [75]. Чтобы оценить эффективность редактирования генома *M. smegmatis*, в качестве репортера использовали ген зеленого флуоресцентного белка. Эффективность сайт-направленного мутагенеза в *M. smegmatis* составила 80%, а вставка и делеция фрагментов путем рекомбинации с двухцепочечными фрагментами ДНК длиной около 1000 п.н. – 37–75%. При использовании одноцепочечных олигонуклеотидов длиной 59 и 79 н. удалось встроить не более 7 н. и внести делеции длиной до 20 н. с эффективностью 70–80%, а длиной 418 и 1000 п.н. – 17.4 и 8.2% соответственно.

Исследовали также возможность использования 14 белков Cas для редактирования генома микобактерий [65]. Установлено, что экспрессия генов белков Cas *Treponema denticola* (TdCas9), *Neisseria meningitidis* (NmCas9), и *F. tularensis (novicida)* (FnCpf1) под контролем сильного конститутивного промотора *hsp60* не влияет на скорость роста *M. smegmatis*. Обнаружено, что FnCpf1, кодируемый геном, оптимизированным в соответствии с частотой встречаемости кодонов у *M. smegmatis*, токсичен для микобактерий. Предположили, что высокая экспрессия оптимизированных генов приводит к накоплению белков Cas, что повышает частоту вызываемых ими неспецифических одноцепочечных разрывов ДНК до критического уровня [75]. По-видимому, мРНК гена *FnCpf1_cg*, оптимизированного для экспрессии в *C. glutamicum*, транслируется с относительно невысокой скоростью, не позволяя тем самым белку FnCpf1_cg накапливаться в опасных количествах. Из трех нетоксичных в микобактериях белков Cas только FnCpf1_cg проявлял высокую активность с различными направляющими РНК и обеспечивал эффективность редактирования генома микобактерий вплоть до 70%. Следует отметить, что в этой работе [65] редактирование генома микобактерий осуществлялось за счет НHEJ-пути, а не за счет гомологичной рекомбинации, как в рассмотренной выше работе [75]. Поскольку мишенями служили гены известного НHEJ-пути (*ku*, *ligD*), то можно предположить, что репарация двухцепочечных разрывов проходила с участием других известных альтернативных путей [72].

Инструментарий геномной инженерии микобактерий с помощью систем CRISPR/Cas недавно пополнился редакторами оснований. Так,

Ding и соавт. создали двухплазмидную систему MtbCBE, позволяющую эффективно вносить изменения в геном *M. tuberculosis* с помощью цитидинового редактора [76]. Одна из плазмид этой системы кодирует белковые ингибиторы RecA- и NucS-зависимых путей репарации ДНК, а вторая плаزمид кодирует никазу nCas9_{Sth1} из *S. thermophilus*, соединенную с цитидиновой дезаминазой APOBEC1 и UGI – ингибитором урацил-ДНК-гликозилазы. В ходе работы установили, что помимо урацил-ДНК-гликозилаз, в репарации дезаминированных оснований участвуют пути гомологичной рекомбинации (ключевой белок RecA) и репарации неправильно спаренных оснований ДНК (один из ключевых белков нуклеаза NucS), которые значительно снижают степень редактирования генома дезаминазой. Поэтому для повышения эффективности редактирования оснований и создана плазмид, несущая гены ингибиторов этих путей.

Количество потенциальных мишеней полученного редактора ограничено довольно длинным PAM Cas9_{Sth1} и возможностью вносить только замены цитидинов на тимины. Недавно получили новые редакторы оснований, позволяющие вносить замены цитидинов на гуанины [77] и на аденины [78]. В состав этих редакторов введена урацил-ДНК-гликозилаза, выщепляющая дезаминированное основание и создающее апиридинового сайт. Дальнейшая репарация апиридинового сайта ведет преимущественно к трансверсиям C → A или C → G. В настоящее время ведутся работы по адаптации подобных редакторов оснований и к микобактериям, что должно значительно расширить спектр вносимых мутаций.

В ходе биоинформатического анализа в геномах патогенных микобактерий, например *M. tuberculosis* и *M. bovis*, выявлена система CRISPR/Cas10, относящаяся к типу III-A класса I [79, 80]. У штамма *M. tuberculosis* H37Rv система состоит из 9 генов Csm2-6, Cas10, Cas6, Cas1 и Cas2 и двух локусов CRISPR. Нуклеаза Cas6 инициирует созревание crRNA, расщепляя ее предшественник внутри повторов. Образующиеся промежуточные продукты содержат с 5'-конца 8 н. повтора, далее спейсер и полный повтор с 3'-конца [81]. На промежуточных продуктах происходит сборка рибонуклеопротеидного комплекса, включающего белки Csm и нуклеазу Cas10, с вытеснением нуклеазы Cas6. После этого происходит отщепление части повтора с 3'-конца с формированием зрелой crRNA [81]. Следует отметить, что в отличие от систем типа II-A и V-A, рассмотренных ранее, мишенями системы типа III-A может быть как ДНК (в этом случае нуклеазную активность проявляет Cas10), так и РНК (в этом случае нуклеазную активность проявляет Csm3) [82].

Ранние исследования структуры системы, в основном повторов и спейсеров локусов CRISPR, предполагали возможность их использования в качестве средств генотипирования штаммов микобактерий в эпидемиологических исследованиях [83, 84]. Сравнительно недавно началось изучение механизмов функционирования системы CRISPR/Cas10 и регуляции экспрессии ее компонентов у микобактерий [85, 86]. Показано, что система активна против чужеродных элементов ДНК, определены детали биогенеза crRNA [85, 87]. Система CRISPR *M. tuberculosis* активна против ДНК-, а также РНК-мишеней в гетерологичной экспрессионной системе в *E. coli* как в виде очищенных белков, так и *in vivo* [88]. Изучение структуры и механизмов функционирования позволило направить эндогенную систему CRISPR/Cas на редактирование собственного генома *M. tuberculosis* [89], как это сделано ранее в случае, например, эндогенных систем CRISPR/Cas кластридий [90, 91]. С этой целью *M. tuberculosis* трансформировали плазмидой, кодирующей направляющие РНК против целевых участков генома. Используя доноры для рекомбинации с различной структурой, показали возможность инактивации генов и вставки репортерных генов в геном *M. tuberculosis* [89]. Более того, разработан способ подавления экспрессии генов путем нацеливания эндогенной системы CRISPR/Cas10 на мРНК. Ранее установили, что если в 5'-конец спейсера crRNA ввести последовательность 5'-GAAAC-3', которая будет комплементарна мРНК, то в этом случае эффектор Cas10 будет гидролизовать не ДНК, а мРНК [92]. С помощью этого подхода удалось эффективно подавить экспрессию как отдельных генов (*katG*, *dcD* или *esxT*), так и нескольких генов одновременно (*lpqE*, *katG* и *inhA*). Кроме того, выполнены скрининговые исследования, в ходе которых выявлены гены, влияющие на скорость размножения *M. tuberculosis* как в культуре, так и в макрофагах [89]. Таким образом, показана принципиальная возможность использования эндогенных систем CRISPR/Cas микобактерий для редактирования их генома, регуляции экспрессии как отдельных генов, так и групп генов и проведения скрининговых исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы достигнут значительный прогресс в изучении генетики микобактерий, разработаны молекулярные инструменты для эффективных и направленных генетических манипуляций с ними. Рассмотренные в обзоре методы позволяют вносить направленные изменения в геном микобактерий, что востребовано в различных биомедицинских приложениях.

Д.С. Карпов выражает благодарность за финансовую поддержку Министерству науки и выс-

шего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-10-2021-113, ID проекта: RF-193021X0001).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wei W., Wang F., Fan S., Wei D. (2010) Inactivation and augmentation of the primary 3-ketosteroid- $\Delta 1$ -dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* Nw1B-01: biotransformation of soybean phytosterols to 4-androstene-3,17-dione or 1,4-androstadiene-3,17-dione. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4578–4582.
2. Sundarsingh J.A.T., Ranjitha J., Rajan A., Shankar V. (2020) Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Public Hlth.* **13**, 1255–1264.
3. Philips J.A., Ernst J.D. (2012) Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **7**, 353–384.
4. Choudhary E., Lunge A., Agarwal N. (2016) Strategies of genome editing in mycobacteria: achievements and challenges. *Tuberculosis.* **98**, 132–138.
5. Zhang Y.J., Ioerger T.R., Huttenhower C., Long J.E., Sasseti C.M., Sacchetti J.C., Rubin E.J. (2012) Global assessment of genomic regions required for growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* **8**, e1002946.
6. Lamrabet O., Drancourt M. (2012) Genetic engineering of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *Tuberculosis.* **92**, 365–376.
7. Borgers K., Vandewalle K., Festjens N., Callewaert N. (2019) A guide to *Mycobacterium* mutagenesis. *FEBS J.* **286**, 3757–3774.
8. Kana B.D., Mizrahi V. (2004) Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* in relation to the discovery of novel drugs and vaccines. *Tuberculosis.* **84**, 63–75.
9. Gopinath K., Warner D.F., Mizrahi V. (2015) Targeted gene knockout and essentiality testing by homologous recombination. In: *Mycobacteria Protocols. Methods in Molecular Biology*. Eds Parish T., Roberts D.M. New York: Humana Press, **1285**, 131–149.
10. Arnold F.M., Hohl M., Remm S., Koliwer-Brandl H., Adenau S., Chusri S., Sander P., Hilbi H., Seeger M.A. (2018) A uniform cloning platform for mycobacterial genetics and protein production. *Sci. Rep.* **8**, 9539.
11. Safi H., Sayers B., Hazbón M.H., Alland D. (2008) Transfer of *embB* codon 306 mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2027–2034.
12. Brazier B., McShane H. (2020) Towards new TB vaccines. *Semin. Immunopathol.* **42**, 315–331.
13. Bastos R.G., Alzan H.F., Rathinasamy V.A., Cooke B.M., Dellagostin O.A., Barletta R.G., Suarez C.E. (2022)

- Harnessing *Mycobacterium bovis* BCG trained immunity to control human and bovine babesiosis. *Vaccines*. **10**, 1–18.
14. Loxton A.G., Knaul J.K., Grode L., Gutschmidt A., Meller C., Eisele B., Johnstone H., Van Der Spuy G., Maertzdorf J., Kaufmann S.H.E., Hesselting A.C., Walzl G., Cotton M.F. (2017) Safety and immunogenicity of the recombinant *Mycobacterium bovis* BCG vaccine VPM1002 in HIV-unexposed newborn infants in South Africa. *Clin. Vaccine Immunol.* **24**, 1–16.
 15. Grode L., Seiler P., Baumann S., Hess J., Brinkmann V., Eddine A.N., Mann P., Goosmann C., Bandermann S., Smith D., Bancroft G.J., Reyat J.M., Van Soolingen D., Raupach B., Kaufmann S.H.E. (2005) Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J. Clin. Invest.* **115**, 2472–2479.
 16. Arbues A., Aguilo J.I., Gonzalo-Asensio J., Marinova D., Uranga S., Puentes E., Fernandez C., Parra A., Cardona P.J., Vilaplana C., Ausina V., Williams A., Clark S., Malaga W., Guilhot C., Gicquel B., Martin C. (2013) Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine*. **31**, 4867–4873.
 17. Hinds J., Mahenthiralingam E., Kempell K.E., Duncan K., Stokes R.W., Parish T., Stoker N.G. (1999) Enhanced gene replacement in mycobacteria. *Microbiology*. **145**, 519–527.
 18. Malaga W., Perez E., Guilhot C. (2003) Production of unmarked mutations in mycobacteria using site-specific recombination. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**, 261–268.
 19. Stephan J., Stemmer V., Niederweis M. (2004) Consecutive gene deletions in *Mycobacterium smegmatis* using the yeast FLP recombinase. *Gene*. **343**, 181–190.
 20. Song H., Niederweis M. (2007) Functional expression of the FLP recombinase in *Mycobacterium bovis* BCG. *Gene*. **399**, 112–119.
 21. Song H., Wolschendorf F., Niederweis M. (2009) Construction of unmarked deletion mutants. In: *Mycobacteria Protocols. Methods in Molecular Biology*. Eds Parish T., Brown A. Totowa, N.J.: Humana Press, **465**, 279–295.
 22. Cascioferro A., Boldrin F., Serafini A., Proveddi R., Palù G., Manganello R. (2010) Xer site-specific recombination, an efficient tool to introduce unmarked deletions into mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5312–5316.
 23. Yang F., Tan Y., Liu J., Liu T., Wang B., Cao Y., Qu Y., Lithgow T., Tan S., Zhang T. (2014) Efficient construction of unmarked recombinant mycobacteria using an improved system. *J. Microbiol. Methods*. **103**, 29–36.
 24. Parish T., Stoker N.G. (2000) Use of flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* tlyA plcABC mutant by gene replacement. *Microbiology*. **146**, 1969–1975.
 25. Brown A.C. (2021) Gene switching and essentiality testing. In: *Mycobacteria Protocols. Methods in Molecular Biology*. Eds Parish T., Kumar A. New York: Humana Press, **2314**, 285–299.
 26. Onwueme K.C., Ferreras J.A., Buglino J., Lima C.D., Quadri L.E.N. (2004) Mycobacterial polyketide-associated proteins are acyltransferases: proof of principle with *Mycobacterium tuberculosis* PapA5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**, 4608–4613.
 27. Grigorov A., Bychenko O., Salina E.G., Skvortsova Y., Mazurova A., Skvortsov T., Kaprelyants A., Azhikina T. (2021) Small rna f6 provides *Mycobacterium smegmatis* entry into dormancy. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(21), 11536.
 28. Barkan D., Stallings C.L., Glickman M.S. (2011) An improved counterselectable marker system for mycobacterial recombination using galK and 2-deoxy-galactose. *Gene*. **470**, 31–36.
 29. Pashley C.A., Parish T., McAdam R.A., Duncan K., Stoker N.G. (2003) Gene replacement in mycobacteria by using incompatible plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 517–523.
 30. Bardarov S., Bardarov S., Pavelka M.S., Sambandamurthy V., Larsen M., Tufariello J.A., Chan J., Hatfull G., Jacobs W.R. (2002) Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology*. **148**, 3007–3017.
 31. Ang M.L.T., Siti Z.Z.R., Shui G., Dianišková P., Madacki J., Lin W., Koh V.H.Q., Gomez J.M.M., Sudarkodi S., Bendt A., Wenk M., Mikušová K., Korduláková J., Pethe K., Alonso S. (2014) An ethA-ethR-deficient *Mycobacterium bovis* BCG mutant displays increased adherence to mammalian cells and greater persistence *in vivo*, which correlate with altered mycolic acid composition. *Infect. Immun.* **82**, 1850–1859.
 32. Bourai N., Jacobs W.R., Narayanan S. (2012) Deletion and overexpression studies on DacB2, a putative low molecular mass penicillin binding protein from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microb. Pathog.* **52**, 109–116.
 33. Jain P., Hsu T., Arai M., Biermann K., Thaler D.S., Nguyen A., González P.A., Tufariello J.M., Kriakov J., Chen B., Larsen M.H., Jacobs W.R. (2014) Specialized transduction designed for precise high-throughput unmarked deletions in *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio*. **5**(3), e01245-14.
 34. Alonso M.N., Malaga W., Mc Neil M., Jackson M., Romano M.I., Guilhot C., Santangelo M.P. (2020) Efficient method for targeted gene disruption by homologous recombination in *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Res. Microbiol.* **171**, 203–210.
 35. van Kessel J.C., Hatfull G.F. (2007) Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Methods*. **4**, 147–152.
 36. Mao X., Yan M., Zhu H., Guo X., Sun Y. (2016) Efficient and simple generation of multiple unmarked gene deletions in *Mycobacterium smegmatis*. *Sci. Rep.* **14**(6), 22922.
 37. Shenkerman Y., Elharar Y., Vishkautzan M., Gur E. (2014) Efficient and simple generation of unmarked gene deletions in *Mycobacterium smegmatis*. *Gene*. **533**, 374–378.
 38. van Kessel J.C., Hatfull G.F. (2008) Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets. *Mol. Microbiol.* **67**, 1094–1107.

39. Niranjala Muttucumaru D.G., Parish T. (2004) The molecular biology of recombination in mycobacteria: what do we know and how can we use it? *Curr. Issues Mol. Biol.* **6**(2), 145–157.
40. Freitas-Vieira A., Anes E., van Kessel Moniz-Pereira J. (1998) The site-specific recombination locus of mycobacteriophage Ms6 determines DNA integration at the tRNA(Ala) gene of *Mycobacterium spp.* *Microbiology.* **144**, 3397–3406.
41. Pedulla M.L., Lee M.H., Lever D.C., Hatfull G.F. (1996) A novel host factor for integration of mycobacteriophage L5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**(26), 15411–15416.
42. Mediavilla J., Jain S., Kriakov J., Ford M.E., Duda R.L., Jacobs W.R., Hendrix R.W., Hatfull G.F. (2002) Genome organization and characterization of mycobacteriophage Bxb1. *Mol. Microbiol.* **38**, 955–970.
43. Springer B., Sander P., Sedlacek L., Ellrott K., Böttger E.C. (2001) Instability and site-specific excision of integration-proficient mycobacteriophage L5 plasmids: development of stably maintained integrative vectors. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**, 669–675.
44. Bibb L.A., Hatfull G.F. (2002) Integration and excision of the *Mycobacterium tuberculosis* prophage-like element, ϕ Rv1. *Mol. Microbiol.* **45**, 1515–1526.
45. Kim A.I., Ghosh P., Aaron M.A., Bibb L.A., Jain S., Hatfull G.F. (2003) Mycobacteriophage Bxb1 integrates into the *Mycobacterium smegmatis* *groEL1* gene. *Mol. Microbiol.* **50**, 463–473.
46. Lewis J.A., Hatfull G.F. (2003) Control of directionality in L5 integrase-mediated site-specific recombination. *J. Mol. Biol.* **326**, 805–821.
47. Lee M.H., Hatfull G.F. (1993) Mycobacteriophage L5 integrase-mediated site-specific integration *in vitro*. *J. Bacteriol.* **175**(21), 6836–6841.
48. Peña C.E.A., Kahlenberg J.M., Hatfull G.F. (1998) The role of supercoiling in mycobacteriophage L5 integrative recombination. *Nucl. Acids Res.* **26**, 4012–4018.
49. Peña C.E.A., Lee M.H., Pedulla M.L., Hatfull G.F. (1997) Characterization of the mycobacteriophage L5 attachment site, attP. *J. Mol. Biol.* **266**(1), 76–92.
50. Stark W.M. (2017) Making serine integrases work for us. *Curr. Opin. Microbiol.* **38**, 130–136.
51. Landy A. (2015) The λ integrase site-specific recombination pathway. *Microbiol. Spectr.* **3**(2), MDNA3-0051-2014.
52. Stark W.M. (2014) The serine recombinases. *Microbiol. Spectr.* **2**(6), MDNA3-0046-2014.
53. Murphy K.C., Nelson S.J., Nambi S., Papavinasandaram K., Baer C.E., Sasseti C.M. (2018) Orbit: a new paradigm for genetic engineering of mycobacterial chromosomes. *MBio.* **9**(6), e01467-18.
54. Murphy K.C. (2021) Oligo-mediated recombineering and its use for making SNPs, knockouts, insertions, and fusions in *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Mycobacteria Protocols. Methods in Molecular Biology*, Eds Parish T., Kumar A. New York: Humana Press, **2314**, 301–321.
55. Bibb L.A., Hancox M.I., Hatfull G.F. (2005) Integration and excision by the large serine recombinase ϕ Rv1 integrase. *Mol. Microbiol.* **55**, 1896–1910.
56. Seoane A., Navas J., García Lobo J.M. (1997) Targets for pSAM2 integrase-mediated site-specific integration in the *Mycobacterium smegmatis* chromosome. *Microbiology.* **143**, 3375–3380.
57. Mazodier P., Thompson C., Boccard F. (1990) The chromosomal integration site of the *Streptomyces* element pSAM2 overlaps a putative tRNA gene conserved among actinomycetes. *Mol. Gen. Genet.* **222**(2–3), 431–434.
58. Marraffini L.A. (2015) CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature.* **526**, 1–13.
59. Bayat H., Modarressi M.H., Rahimpour A. (2018) The conspicuity of CRISPR-Cpf1 system as a significant breakthrough in genome editing. *Curr. Microbiol.* **75**(1), 107–115.
60. Roy B., Zhao J., Yang C., Luo W., Xiong T., Li Y., Fang X., Gao G., Singh C.O., Madsen L., Zhou Y., Kristiansen K. (2018) CRISPR/Cascade 9-mediated genome editing—challenges and opportunities. *Front. Genet.* **9**, 240.
61. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* **337**, 816–821.
62. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* **163**(3), 759–771.
63. Leenay R.T., Maksimchuk K.R., Slotkowski R.A., Agrawal R.N., Goma A.A., Briner A.E., Barrangou R., Beisel C.L. (2016) Identifying and visualizing functional PAM diversity across CRISPR-Cas systems. *Mol. Cell.* **62**(1), 137–147.
64. Swarts D.C., Jinek M. (2018) Cas9 versus Cas12a/Cpf1: structure–function comparisons and implications for genome editing. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* **9**(5), e1481.
65. Sun B., Yang J., Ye R.D., Jiang Y., Chen D., Yang S. (2018) A CRISPR-Cpf1-assisted non-homologous end joining genome editing system of *Mycobacterium smegmatis*. *Biotechnol. J.* **13**(9), e1700588.
66. Rock J.M., Hopkins F.F., Chavez A., Diallo M., Chase M.R., Gerrick E.R., Pritchard J.R., Church G.M., Rubin E.J., Sasseti C.M., Schnappinger D., Sarah M.F. (2017) Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nat. Microbiol.* **2**, 16274.
67. Singh A.K., Carette X., Potluri L.P., Sharp J.D., Xu R.F., Prisc S., Husson R.N. (2016) Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system. *Nucl. Acids Res.* **44**, e143.
68. Jiang Y., Qian F., Yang J., Liu Y., Dong F., Xu C., Sun B., Chen B., Xu X., Li Y., Wang R., Yang S. (2017)

- CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat. Commun.* **8**, 15179
69. Xu S., Kim J., Tang Q., Chen Q., Liu J., Xu Y., Fu X. (2020) Cas9 is a genome mutator by directly disrupting DNA-PK dependent DNA repair pathway. *Protein Cell.* **11**(5), 352–365.
 70. Bernheim A., Calvo-Villamanan A., Basier C., Cui L., Rocha E.P.C., Touchon M., Bikard D. (2017) Inhibition of NHEJ repair by type II-A CRISPR-Cas systems in bacteria. *Nat. Commun.* **8**(1), 2094.
 71. Liu J., Wang Y., Lu Y., Zheng P., Sun J., Ma Y. (2017) Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Cell Fact.* **16**, 205.
 72. Singh A. (2017) Guardians of the mycobacterial genome: a review on DNA repair systems in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* **163**, 1740–1758.
 73. Meijers A.S., Troost R., Ummels R., Maaskant J., Speer A., Nejentsev S., Bitter W., Kuijl C.P. (2020) Efficient genome editing in pathogenic mycobacteria using *Streptococcus thermophilus* CRISPR1-Cas9. *Tuberculosis* (Edinb.). **124**, 101983.
 74. Karvelis T., Gasiunas G., Young J., Bigelyte G., Silanskas A., Cigan M., Siksnys V. (2015) Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements. *Genome Biol.* **16**, 253.
 75. Yan M.-Y., Yan H.-Q., Ren G.-X., Zhao J.-P., Guo X.-P., Sun Y.-C. (2017) CRISPR-Cas12a-assisted recombining in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e00947–00917.
 76. Ding X.Y., Li S.S., Geng Y.M., Yan M.Y., Li G.B., Zhang G.L., Sun Y.C. (2021) Programmable base editing in *Mycobacterium tuberculosis* using an engineered CRISPR RNA-guided cytidine deaminase. *Front. Genome Ed.* **3**, 734436.
 77. Kurt I.C., Zhou R., Iyer S., Garcia S.P., Miller B.R., Langner L.M., Grunewald J., Joung J.K. (2021) CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat. Biotechnol.* **39**(1), 41–46.
 78. Zhao D., Li J., Li S., Xin X., Hu M., Price M.A., Rosser S.J., Bi C., Zhang X. (2021) Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nat. Biotechnol.* **39**(1), 35–40.
 79. He L., Fan X., Xie J. (2012) Comparative genomic structures of *Mycobacterium* CRISPR-Cas. *J. Cell Biochem.* **113**(7), 2464–2473.
 80. Supply P., Marceau M., Mangenot S., Roche D., Rouanet C., Khanna V., Majlessi L., Criscuolo A., Tap J., Pawlik A., Fiette L., Orgeur M., Fabre M., Parmentier C., Frigui W., Simeone R., Boritsch E.C., Debie A.S., Willery E., Walker D., Quail M.A., Ma L., Bouchier C., Salvignol G., Sayes F., Cascioferro A., Seemann T., Barbe V., Loch C., Gutierrez M.C., Leclerc C., Bentley S.D., Stinear T.P., Brisse S., Medigue C., Parkhill J., Cruveiller S., Brosch R. (2013) Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Genet.* **45**(2), 172–179.
 81. Liu T., Pan S., Li Y., Peng N., She Q. (2018) Type III CRISPR–Cas system: introduction and its application for genetic manipulations. *Curr. Issues Mol. Biol.* **26**, 1–14.
 82. Pyenson N.C., Marraffini L.A. (2017) Type III CRISPR–Cas systems: when DNA cleavage just isn't enough. *Curr. Opin. Microbiol.* **37**, 150–154.
 83. Gomgnimbou M.K., Abadia E., Zhang J., Refregier G., Panaiotov S., Bachiyska E., Sola C. (2012) “Spoligotyping,” a dual-priming oligonucleotide-based direct-hybridization assay for tuberculosis control with a multi-analyte microbead-based hybridization system. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3172–3179.
 84. Botelho A., Canto A., Leao C., Cunha M.V. (2015) Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) analysis of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Methods Mol. Biol.* **1247**, 373–389.
 85. Zhang Y., Yang J., Bai G. (2018) Regulation of the CRISPR-associated genes by Rv2837c (CnpB) via an Orn-like activity in TB complex mycobacteria. *J. Bacteriol.* **200**(8), e00743-17.
 86. Huang Q., Luo H., Liu M., Zeng J., Abdalla A.E., Duan X., Li Q., Xie J. (2016) The effect of *Mycobacterium tuberculosis* CRISPR-associated Cas2 (Rv2816c) on stress response genes expression, morphology and macrophage survival of *Mycobacterium smegmatis*. *Infect. Genet. Evol.* **40**, 295–301.
 87. Wei W., Zhang S., Fleming J., Chen Y., Li Z., Fan S., Liu Y., Wang W., Wang T., Liu Y., Ren B., Wang M., Jiao J., Chen Y., Zhou Y., Zhou Y., Gu S., Zhang X., Wan L., Chen T., Zhou L., Chen Y., Zhang X.E., Li C., Zhang H., Bi L. (2019) *Mycobacterium tuberculosis* type III-A CRISPR/Cas system crRNA and its maturation have atypical features. *FASEB J.* **33**(1), 1496–1509.
 88. Gruschow S., Athukoralage J.S., Graham S., Hoogboom T., White M.F. (2019) Cyclic oligoadenylate signalling mediates *Mycobacterium tuberculosis* CRISPR defence. *Nucl. Acids Res.* **47**(17), 9259–9270.
 89. Rahman K., Jamal M., Chen X., Zhou W., Yang B., Zou Y., Xu W., Lei Y., Wu C., Cao X., Tyagi R., Ahsan Naeem M., Lin D., Habib Z., Peng N., Fu Z.F., Cao G. (2021) Reprogramming *Mycobacterium tuberculosis* CRISPR system for gene editing and genome-wide RNA interference screening. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* S1672-0229(21)00249-7. <https://doi.org/10.1101/2020.03.09.983494>
 90. Pyne M.E., Bruder M.R., Moo-Young M., Chung D.A., Chou C.P. (2016) Harnessing heterologous and endogenous CRISPR–Cas machineries for efficient markerless genome editing in *Clostridium*. *Sci. Rep.* **6**, 25666.
 91. Zhang J., Zong W., Hong W., Zhang Z.T., Wang Y. (2018) Exploiting endogenous CRISPR–Cas system for multiplex genome editing in *Clostridium tyrobutyricum* and engineer the strain for high-level butanol production. *Metab. Eng.* **47**, 49–59.
 92. You L., Ma J., Wang J., Artamonova D., Wang M., Liu L., Xiang H., Severinov K., Zhang X., Wang Y. (2019) Structure studies of the CRISPR–Csm complex reveal mechanism of co-transcriptional interference. *Cell.* **176**(1–2), 239–253.

Genetic Engineering of Mycobacteria

D. K. Armianinova¹, *, D. S. Karpov², M. S. Kotliarova¹, and A. V. Goncharenko¹

¹Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: dasha.arm@yandex.ru

Genetic tools for targeted modification of the genome of mycobacteria contribute to the development of our understanding of the physiology and virulence mechanisms of this group of microorganisms. Human and animal pathogens, such as the causative agents of tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis* complex and leprosy – *Mycobacterium leprae* are of particular importance. Genetic research opens up novel opportunities for the identification and validation of new targets for antibacterial drugs and the development of new better vaccines. Despite the difficulties of working with mycobacteria, which were associated with limited opportunities for the transfer of genetic information and the slow growth rate of the most important microorganisms, significant progress has been succeeded in the development of genetic engineering methods. The review considers the main approaches for targeted changes in the mycobacterial genome, such as methods of homologous as well as, and the CRISPR/Cas system.

Keywords: *Mycobacterium* spp., gene editing, homologous recombination, site-specific recombination, CRISPR/Cas