

УДК 577.21

## CRISPR-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ (ОБЗОР)

© 2022 г. Н. И. Надолинская<sup>а</sup>, \*, А. В. Гончаренко<sup>а</sup><sup>а</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: nioriss@gmail.com

Поступила в редакцию 28.03.2022 г.

После доработки 15.04.2022 г.

Принята к публикации 15.04.2022 г.

В обзоре рассмотрено применение системы CRISPR/Cas для получения нокдаунов целевых бактериальных генов путем CRISPR-опосредованной интерференции (CRISPRi). CRISPRi основана на сохранении способности инактивированной нуклеазы dCas в комплексе с направляющей РНК связывать целевую мишень, что приводит к обратимой репрессии выбранных генов. Описан принцип работы CRISPR/Cas и CRISPRi/dCas, приведены примеры применения CRISPRi с наиболее популярными у исследователей инактивированными нуклеазами dCas9 и dCas12a. Уделено внимание использованию CRISPRi-скрининга в полногеномных исследованиях, а также модульной системе выявления многих важных закономерностей на уровне генома Mobile-CRISPRi. Обсуждается использование CRISPRi для оптимизации биотехнологического производства малонил-КоА, *L*-лизина, *L*-глутамата и других продуктов.

**Ключевые слова:** CRISPR, CRISPR-интерференция, CRISPRi-скрининг, Mobile-CRISPRi, dCas9, dCas12a

**DOI:** 10.31857/S0026898422060167

### ВВЕДЕНИЕ

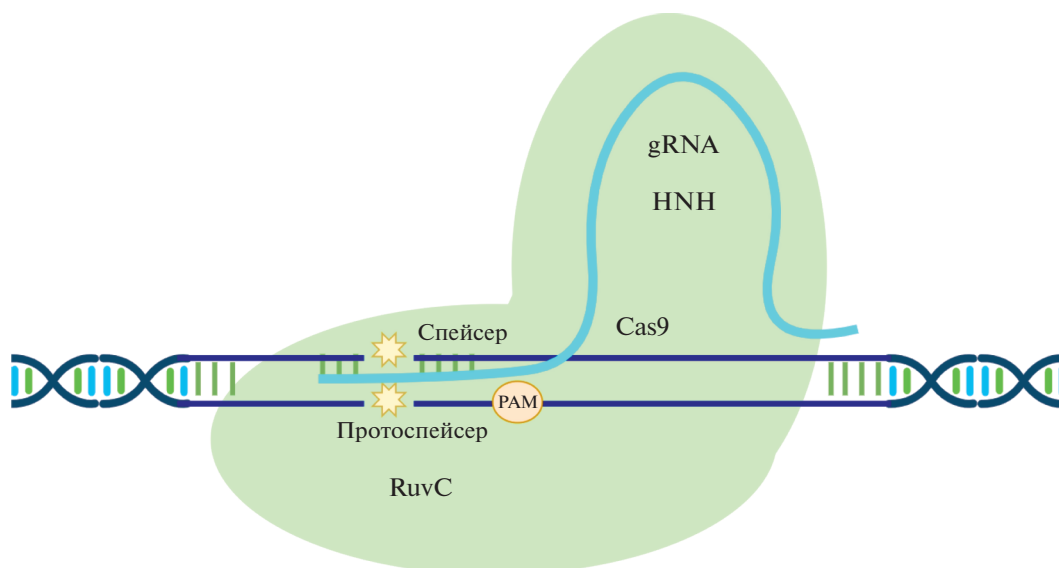
Система редактирования геномов CRISPR/Cas основана на адаптивном иммунитете бактерий и архей [1]. При первой встрече с патогеном бактериальная клетка сохраняет фрагменты его ДНК в особых локусах CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Эти фрагменты называются спейсерами и фланкируются короткими палиндромными повторами. Также локусы CRISPR кодируют белки Cas (CRISPR-associated), нуклеазу и вспомогательный комплекс белков, которые узнают и разрезают инородную ДНК при повторной встрече с патогеном, фрагменты генома которого уже сохранены в CRISPR (рис. 1). В этом участвуют также две короткие РНК: crRNA (CRISPR RNA), которая связывает ДНК-мишень,

и транскрибирующая tracrRNA, с которой взаимодействует нуклеаза. Вместе эти РНК образуют одиночный гибрид crRNA:tracrRNA, который называется gRNA, или sgRNA (направляющая РНК) [2]. Нуклеаза Cas инактивирует нежелательную ДНК, внося в нее двухцепочечный разрыв. Второе обязательное условие работы Cas-белка – наличие особого, прилегающего к протоспейсеру мотива PAM (protospacer adjacent motif), короткой последовательности из двух–шести нуклеотидов, специфичной для разных Cas-нуклеаз.

CRISPR-системы подразделяются на два класса. Системы класса 1 содержат нуклеазу из нескольких субъединиц, в системах класса 2 нуклеазы состоят из одной субъединицы. Классы, в свою очередь, представлены несколькими типами: класс 1 – типами I, III и IV, класс 2 – типами II, V и VI [3].

В большинстве исследований используется система CRISPR/Cas9 из *Streptococcus pyogenes*, которая относится к типу II и распознает PAM NGG. Нуклеазы, даже принадлежащие к одному типу, могут существенно различаться. Так, CRISPR/Cas9 из *S. thermophilus* [4] распознает более длинные PAM, самые интересные для направленного редактирования – NNAGAAG, NNAGAAT, NNAGAAA, NNAGAAC, NNGGAAA (располо-

Сокращения: CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами); Cas – CRISPR-associated (ассоциированные с CRISPR); crRNA – CRISPR RNA (CRISPR-РНК); tracrRNA – trans-activating CRISPR RNA (транскрибирующая CRISPR-РНК); gRNA – guide RNA (направляющая РНК); sgRNA – single guide RNA (одиночная направляющая РНК); PAM – protospacer adjacent motif (мотив, примыкающий к протоспейсеру); CRISPRi – CRISPR-interferention (CRISPR-интерференция); RBS – ribosome binding site (сайт связывания рибосомы).



**Рис. 1.** Схема работы системы CRISPR/Cas9. gRNA узнает комплементарную мишень, имеющую PAM. Cas9 в комплексе с gRNA связывается с мишенью и вносит двуцепочечный разрыв.

жены по убыванию силы связывания). Классификация CRISPR-систем дополнительно усложняется изменчивостью их элементов.

Простые и удобные в использовании системы CRISPR/Cas широко применяются в точечном редактировании прокариотических и эукариотических геномов. Система CRISPR/Cas считается очень удобным инструментом модификации ДНК, однако она не лишена недостатков. Во-первых, существует нецелевая активность Cas, обусловленная частичным нецелевым связыванием sgRNA в случайных местах генома [5]. Кроме того, Cas9 из *S. pyogenes* оказывает токсичное действие на клетки *Escherichia coli*, названное эффектом “bad-seed”. Механизм этого эффекта изучен не до конца, но известно, что он обусловлен специфическими пятью проксимальными к PAM нуклеотидами gRNA [6].

Различные модификации данного метода позволили не просто точно редактировать последовательность ДНК, но и управлять экспрессией целевых генов. В качестве примера такого приложения можно привести CRISPR-интерференцию (CRISPR-interferention, CRISPRi) [7] – процесс подавления экспрессии генов с помощью модифицированных CRISPR-систем (рис. 2).

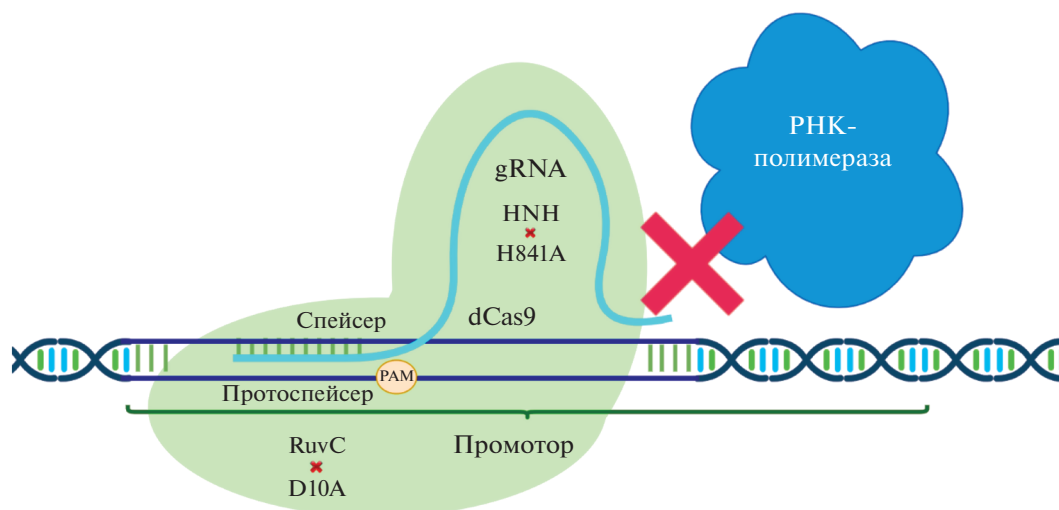
Cas9 состоит из двух доменов, HNH и RuvC. Замены D10A в домене RuvC и H841A в HNH приводят к образованию инактивированной формы dCas9 [8]. Как и CRISPR/Cas, CRISPR/dCas9 распознает мишень с помощью gRNA и связывается с ней, образуя стерический блок, который препятствует элонгации транскрипции РНК-полимеразой [7]. Таким образом происходит репрессия гена-мишени. Простота и точность этой системы подавления экспрессии позволяет ре-

шать как фундаментальные, так и прикладные научные задачи. Правила и ограничения для нее такие же, как для соответствующих CRISPR/Cas. Индуцибельность и обратимость подавления экспрессии с помощью CRISPRi открывают широкое поле для экспериментов. В данном обзоре рассмотрены некоторые примеры регуляции экспрессии путем подавления транскрипции отдельных генов и изучения функций бактериальных генов с помощью CRISPRi и систем на ее основе.

#### CRISPRi НА ОСНОВЕ Cas9

Самый распространенный вариант CRISPRi – интерференция на основе dCas9. С использованием CRISPRi с dCas9 удалось подавить экспрессию генов в различных организмах. Некоторые примеры с описанием таких систем приведены ниже.

Много успешных работ по ингибированию генной экспрессии системой CRISPRi проведено на *E. coli*, как на самом популярном модельном организме. Depardieu и соавт. подробно рассмотрели варианты дизайна векторов для CRISPRi в *Staphylococcus aureus* и *E. coli* [9]. Описаны векторы pC194 и pLZ12, в которых *dcas9* контролируется атс-зависимым промотором Ptet, а sgRNA – конститутивным промотором PpflB. На основе этих плазмид получена серия векторов pFD. Данные системы проверены интерференцией важного для *St. aureus* гена *rpsL*. Разработан также метод подбора векторов с оптимизированными сайтами связывания рибосом (RBS), что позволяет снизить токсичность при высоких уровнях экспрессии *dcas9*. Как уже упоминалось, механизм этого



**Рис. 2.** Схема работы CRISPR-интерференции на основе системы CRISPR/Cas9. Инактивированный dCas9 в комплексе с gRNA узнает мишень и связывается с ней, но не может разрезать из-за отсутствия нуклеазной активности. Таким образом, dCas9 служит стерическим препятствием для РНК-полимеразы. Поскольку мишень расположена в промоторе, транскрипция не может продолжаться.

явления точно не установлен, согласно одной из гипотез, его можно устранить, корректируя уровень экспрессии. При помощи CRISPRi-скрининга осуществлен подбор и оптимизация RBS для устранения негативных эффектов dCas9 на примере репортерного гена *mCherry*. Библиотеку RBS в плазмиде pFD116 клонировали в клетках *E. coli*, после чего отбирали клоны, способные расти в присутствии аТс и при этом подавлять экспрессию *mCherry*. Таким образом отобраны RBS, которые не вызывают летальной токсичности dCas9, но позволяют эффективно работать системе интерференции.

Проведено также успешное ингибирование генов *St. aureus* путем CRISPRi [10]. На основе плазмиды pRMC2 [11] сконструирована плаزمида pSD1. В ней *dcas9* экспрессируется под контролем АТс-индуцируемого промотора PtetO, а экспрессия sgRNA контролируется конститутивным промотором Ppf1B из *St. aureus* [12]. Эта система позволила обратимо подавить экспрессию как отдельных генов (ген альфа-токсина *hla*), так и генов в составе оперона (оперон *ccrAB*, состоящий из двух генов – *ccrA* и *ccrB*).

С целью исследования физиологии *Bacillus subtilis* при помощи CRISPRi сделаны нокдауны всех важных генов этой бактерии [13]. В этой работе система CRISPR/dCas9 работала под ксилозазависимым промотором P<sub>xyl</sub>, sgRNA экспрессировалась под сильным конститутивным промотором P<sub>veg</sub>. В результате была получена библиотека нокдаунов основных генов, позволяющая изучать их функции *in vivo*, обнаружены новые потенциальные мишени лекарственных средств, и проведен функциональный анализ генов.

С помощью CRISPRi и dCas9 из *S. pasteurianus* осуществлена успешная регуляция экспрессии генов у нескольких видов *Pseudomonas* spp. [14]. В этой работе использовали двухплазмидную систему, состоящую из векторов pVx-Spas-sgRNA с направляющей РНК и интегративного pUC18-mini-Tn7T-Lac-dCas9, несущего dCas9. *dcas9*, оптимизированный для микобактерий [4], был клонирован в интегративный вектор pUC18-mini-Tn7T-Gm-Lac [15]. В зависимости от вида организма использовали комбинации нескольких промоторных систем (TetR-Ptet, LacI-Plac, AraC-Para); экспрессия *dcas9* под разными промоторами различалась даже у близкородственных видов *Pseudomonas*. Плазмиды, несущая sgRNA, pVx-Spas-sgRNA, сконструирована путем клонирования sgRNA под промотор Ptet в плазмиде pBBR1.

Исследование проведено на различных генах: *gdhA* (NADP-зависимая глутаматдегидрогеназа *P. aeruginosa*), *ftsZ* (белок клеточного деления *P. aeruginosa*, *P. putida* и *P. fluorescens*), *ftsJ* в качестве примера плохо изученных генов (аннотирован как важный ген). Эффект CRISPRi показан на примере двух разных генов одновременно – *pvdH* (участвует в синтезе пиовердина) и *flgB* (один из белков базального тела жгутиков). Успешно осуществлено ингибирование всех этих генов и их комбинаций.

Подавление генной экспрессии в микоплазмах (*Mycoplasma pneumoniae*) и минимальных синтетических клетках JCVI-syn1.0 *Mycoplasma mycoides* служит очередным примером регуляции работы генов с помощью CRISPRi [16]. Показано индуцируемое ослабление экспрессии гена *mCherry*, кодирующего флуоресцентный белок, и гена

*ksgA*, связанного с чувствительностью к антибиотик-у касугамицину, в клетках JCVI-syn1.0 с помощью CRISPRi [17] (использовали промотор, регулируемый Tet). Также впервые показана успешная работа CRISPRi на минимальных синтетических клетках. Для *Mycoplasma pneumoniae* созданы векторы на основе системы Cre-lox [18]. Кодон-оптимизированный *dcas9* *S. pyogenes* под промотором P<sub>xyl</sub>/tetO2mod из вектора pΔMG\_217Cre и sgRNA из плазмиды miniTnPac\_dCas9ind работали в модифицированном минитранспозоне TnPac из системы Cre-lox. *dcas9* амплифицирован из плазмиды pdCas9-bacteria [8], далее была собрана конструкция P<sub>xyl</sub>/tetO2-dCas9-mCherry, в которую для подавления экспрессии введена gRNA.

Еще одна важная группа микроорганизмов, для которой актуально использование новых методов редактирования — микобактерии. Микобактерии представляют собой трудный объект для редактирования генома классическими методами, что обусловлено низкой эффективностью гомологичной рекомбинации, медленным ростом некоторых видов и GC-богатым составом генома. Поэтому успешное применение редактирования и подавления экспрессии генов с участием CRISPR и CRISPRi востребовано для изучения генома *Mycobacterium tuberculosis* и родственных бактерий.

Для применения CRISPRi в микобактериях на основе плазмиды pTetR сконструирована плазида pGrna, несущая aTc-зависимый промотор P<sub>myc1tetO</sub>, *dcas9*, кассету sgRNA с сайтами для клонирования специфичных к мишени последовательностей, *dcas9*-связывающую шпильку и терминатор транскрипции из *S. pyogenes* [19]. Систему CRISPRi использовали для интерференции семи микобактериальных генов с различным уровнем экспрессии: Rv1713 (*engA*), Rv2150c (*ftsZ*), Rv2460c (*clpP2*), Rv3417c (*groEL1*), Rv3418c (*groES*), Rv3596c (*clpC1*) и Rv3921c (*gidC*). Достигнуто значительное подавление экспрессии всех этих генов. С помощью этой системы исследовали также важность отдельных генов, критичных для жизнеспособности микобактерий — определяли рост клеток в отсутствие экспрессии предположительно необходимых генов и способность CRISPRi к подавлению оперонов. Показано, что этот подход может эффективно применяться в исследованиях, предполагающих подавление экспрессии генов.

Другой пример CRISPRi в микобактериях — исследование вклада аденилатциклаз в вирулентность микобактерий туберкулеза [20]. С этой целью использовали двухплазмидную систему [4] из вектора pRH2502, экспрессирующего *dcas9*, и pRH2521, экспрессирующего sgRNA. Для снижения токсичного эффекта экспрессии dCas9 применяли dCas9 из *S. thermophilus*.

## CRISPRi НА ОСНОВЕ Cas12a

Фермент Cas12a *Francisella novicida* (Cpf1) — минимальный фермент CRISPR класса 2 типа V [21], не требует дополнительно tracrRNA и является альтернативой Cas9 в CRISPR. Мишенью Cas12a служит матричная цепь ДНК. Таким образом, в некоторых случаях для процессинга crRNA достаточно только массива CRISPR. CRISPR/Cas12a адаптирована к редактированию различных организмов [22–24] и к CRISPRi.

Например, для микобактерий разработана простая, регулируемая и обратимая система CRISPRi на основе dCas12a [25], представленная плазмидами pJEBTZ и pJOBTZ. Вектор pJEBTZ содержит селективный маркер Zeo из *psigE*, ориджин репликации *E. coli* из pJEB402-dCas10 и кодон-оптимизированный dFn-Cpf1 из pTE4999. Путем замены промотора MOPS на TetR-регулируемый промотор p766 (вектор pJR965) из плазмиды pJEBTZ получен вектор pJOBTZ. Вектор pNFCF, несущий массивы crPHK, получен из pDTCF путем замены промотора Uv15-Tet на TetR-регулируемый промотор p766. dCas12a стабильно экспрессировался в *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. Подавление транскрипции проверили на штамме с аутолюминесценцией. Использование нескольких спейсеров давало более выраженный эффект, чем каждый из них по отдельности. Люминесценция падала в зависимости от количества спейсеров, падающих на оперон; три спейсера обеспечивали максимальный нокдаун. Проведено ингибирование транскрипции эндогенных генов *M. smegmatis* и их множественный нокдаун. Систему также адаптировали для работы в *M. tuberculosis*, в том числе и для мультигенного подавления генов *pknH*, *fadD2*, *amiC*, *luxD* и *rv0147*.

## CRISPRi-СКРИНИНГ

Системы CRISPRi нашли применение и в полногеномных исследованиях, причем их эффективность оказалась не ниже, чем в существующих подходах [26–30]. При этом CRISPRi-скрининг оказался не столь трудозатратным.

CRISPRi-технология позволяет нацеливать многочисленные sgRNA практически на любое место генома, соответствующее критериям их подбора. В результате этого появляется возможность создания библиотеки sgRNA для полногеномных исследований и выявления многих важных закономерностей на уровне генома. CRISPRi-скрининг обладает такими значимыми преимуществами [6], как

- простота подготовки библиотек для секвенирования;
- возможность изучать повторяющиеся последовательности путем нацеливания sgRNA;

– возможность нацеливания на определенные положения или подмножества генов;

– управление экспрессией библиотеки за счет регулируемости системы.

CRISPRi используется во многих геномных исследованиях. Так, проведена серия работ по CRISPRi-скринингу в *E. coli* [6, 31]. Показано, что метод позволяет уточнить и скорректировать функции критически важных генов. Сначала на основе вектора psgRNAcos создали библиотеку из ~92000 sgRNA [31], подобранных случайным образом из всех возможных для выбранного штамма sgRNA. Полногеномное исследование, проведенное с помощью этой библиотеки, позволило установить и/или подтвердить основные правила работы CRISPR-систем, среди которых важно отметить эффект “bad-seed” – уже упоминавшуюся токсичность dCas9, которую удалось частично преодолеть в дальнейшем. С помощью такого скрининга можно определить гены, чувствительные к минимальному снижению экспрессии, важные мишени антибиотиков, идентифицировать случаи нетипичной геномной организации [6].

С помощью CRISPRi-скрининга проведен также анализ метаболической сети в клетках *E. coli*. Исследование ауксотрофных генов показало чувствительность и точность системы при сопоставлении генотипа с фенотипом. Идентифицированы гены, отвечающие за химическую устойчивость [32]. dCas9 из *S. pyogenes* работал в серии плазмид pdCas9-J23109-116. Вектор для экспрессии sgRNA получен из pTargetF путем замены маркера спектиномицина кассетой экспрессии ампициллина, лишенной сайта рестрикции BsaI. Исходный промотор в этом случае заменили синтетическим индуцибельным промотором PLacO-160.

### MOBILE-CRISPRi

Mobile-CRISPRi – это набор систем CRISPRi, которые можно переносить с помощью конъюгации в различные виды бактерий [33]. Система состоит из набора модулей, которые можно комбинировать между собой за счет наличия сайтов рестрикции, таких как:

- гены устойчивости к антибиотикам;
- репортерные гены;
- ген sgRNA с существующим спейсером или сайтами для клонирования новых спейсеров;
- гены регуляции промотора;
- промотор *dcas9* и RBS;
- ген *dcas9*.

Эффективность системы установлена на  $\gamma$ -протеобактериях и Firmicutes путем как подавления отдельных генов, так и работы с библиотекой. Mobile-CRISPRi облегчает работу с немодельными организмами. Для создания векторов Mobile-

CRISPRi ориджин репликации pUC в плазмиде транспозона Tn7 pTJ1 заменили на ориджин репликации R6K- $\gamma$ , чтобы векторы не смогли реплицироваться в клетках-реципиентах. Основным вектором при конструировании производных Mobile-CRISPRi на основе Tn7 был pJMP1055. Различные модули, интегрированные в этот вектор, перечислены выше. Наборы Mobile-CRISPRi делятся на векторы на основе ICEBs1 для грамположительных бактерий, которые встраиваются после гена tPHK *Leu2*, и векторы на основе Tn7 для грамотрицательных бактерий, которые встраиваются после гена *glmS*. Эти векторы различаются механизмом переноса [34]. При нацеливании спейсера sgRNA на определенный ген два олигонуклеотида отжигаются так, что образуется желаемая последовательность спейсера sgRNA с липкими концами для дальнейшего лигирования в плазмиду Mobile-CRISPRi.

### ПРИКЛАДНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ CRISPRi

Метод CRISPRi применяется не только в фундаментальных исследованиях, но и для оптимизации биотехнологических производств. Например, проведенная Wu и соавт. CRISPRi-оптимизация биотехнологического процесса позволила повысить выход важных метаболитов, в том числе внутриклеточного малонил-КоА, имеющего большое значение в промышленном биосинтезе в качестве предшественника [35]. С этой целью провели тонкую настройку путей биосинтеза, направленную на усиление синтеза малонил-КоА, при помощи полного или частичного подавления экспрессии генов других путей биосинтеза. Кодон-оптимизированный *dcas9* из *S. pyogenes* встроили в вектор pACYCDuet-1 под промотор T7, вместе с ним в совместимом векторе pCOLA-Duet-1 под T7c-индуцируемым промотором экспрессировались sgRNA. Подавление экспрессии многих генов (*ppsA*, *eno*, *adhE*, *mdh*, *fumC*, *sdhA*, *sucC* и *citE*) привело к увеличению выхода целевого продукта за счет корректировки метаболических путей.

С помощью CRISPRi регулировали также экспрессию оперона, содержащего гены пути биосинтеза мевалоната, в клетках *E. coli* [36]. В этом случае система CRISPRi была представлена плазмидой pSECRi, в которой *dcas9* экспрессировался под индуцируемым *L*-рамнозой промотором с кассетой sgRNA из pACCRi.

Подавление гена *sad* посредством CRISPRi позволило повысить эффективность производства P(3НВ-со-4НВ), важного для пищевой промышленности [37].

Интерференция генов путей биосинтеза *n*-бутанола в различных комбинациях (последовательно и одновременно) в клетках *E. coli* (*pta*, *frdA*,

*ldhA* и *adhE*) путем CRISPRi приводила к существенному повышению выхода продукта [38]. Для репрессии каждого гена подобраны sgRNA, которые экспрессировались в векторе pSECRi-PFLA вместе с *dcas9*. При этом экспрессия *dcas9* находилась под контролем индуцируемого *L*-рамной промотора, а sgRNA – под конститутивным промотором J23119.

CRISPRi успешно использовали для подавления экспрессии *spo0A* в клетках промышленно важных клостридий (*Clostridium beijerinckii*) [39]. Этот ген кодирует важный регулятор спорообразования и продукции ацетона, бутанола, этанола [40]. *dcas9* вместе с sgRNA (в касете Pj23119-sgRNA-*spo0A*) экспрессировался под конститутивными промоторами Pptb и Pj23119 в векторе dCASClosspo0A.

Бактерии *Corynebacterium glutamicum* широко используются в производстве аминокислот. Множественное подавление экспрессии генов *pgi*, *pck* и *ruk* [41] привело к повышению продукции *L*-лизина и *L*-глутамата этими бактериями. Чтобы получить такие результаты, dCas9 *S. pyogenes* клонировали из плазмиды pPP208 в репликативные плазмиды pZ8-Ptac и pZ8-Prp *C. glutamicum* под индуцируемыми IPTG или пропионатом промоторами соответственно; sgRNA экспрессировали под контролем промотора Ptac в репликативной плазмиде pAL374.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология CRISPR, которую изначально использовали только для редактирования генома, постоянно модифицируется и находит все более широкое применение.

Одно из популярных приложений CRISPR – CRISPRi, обеспечивающая надежное подавление генной экспрессии, применяется как для непосредственного ингибирования транскрипции целевого гена, так и при проведении полногеномных скринингов, а также в более инновационных инструментах, таких как модульные системы Mobile-CRISPRi. Все эти подходы актуальны не только для широкого круга бактерий, но и в работе с эукариотами. Они расширяют фундаментальные знания и имеют большую практическую значимость в биотехнологии и медицине.

Написание обзора не потребовало специального финансирования.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. **471**, 602–607.
3. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **37**, 67–78.
4. 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., Fortune S.M. (2017) Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nat. Microbiol.* **2**, 162–174.
5. Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F., Marraffini L.A. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* **31**, 233–239.
6. Rousset F., Cui L., Siouve E., Becavin C., Depardieu F., Bikard D. (2018) Genome-wide CRISPR-dCas9 screens in *E. coli* identify essential genes and phage host factors. *PLoS Genet.* **14**, e1007749.
7. Larson M.H., Gilbert L.A., Wang X., Lim W.A., Weissman J.S., Qi L.S. (2013) CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat. Protoc.* **8**, 2180–2196.
8. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. **152**, 1173–1183.
9. Depardieu F., Bikard D. (2020) Gene silencing with CRISPRi in bacteria and optimization of dCas9 expression levels. *Methods*. **172**, 61–75.
10. Zhao C., Shu X., Sun B. (2017) Construction of a gene knockdown system based on catalytically inactive (“Dead”) Cas9 (dCas9) in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e00291-17.
11. Corrigan R.M., Foster T.J. (2009) An improved tetracycline-inducible expression vector for *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*. **61**, 126–129.
12. Pagels M., Fuchs S., Pané-Farré J., Kohler C., Menschner L., Hecker M., McNamarra P.J., Bauer M.C., Von Wachenfeldt C., Liebeke M., Lalk M., Sander G., Von Eiff C., Proctor R.A., Engelmann S. (2010) Redox sensing by a Rex-family repressor is involved in the regulation of anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **76**, 1142–1161.
13. Peters J.M., Colavin A., Shi H., Czarny T.L., Larson M.H., Wong S., Hawkins J.S., Lu C.H.S., Koo B.-M., Marta E., Shiver A.L., Whitehead E.H., Weissman J.S., Brown E.D., Qi L.S., Huang K.C., Gross C.A. (2016) A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria. *Cell*. **165**, 1493–1506.

14. Tan S.Z., Reisch C.R., Prather K.L.J. (2018) A robust CRISPR interference gene repression system in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **200**, e00575–17.
15. Choi K.-H., Schweizer H.P. (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Protoc.* **1**, 153–161.
16. Mariscal A.M., Kakizawa S., Hsu J.Y., Tanaka K., González-González L., Broto A., Querol E., Lluch-Senar M., Piñero-Lambea C., Sun L., Weyman P.D., Wise K.S., Merryman C., Tse G., Moore A.J., Hutchison C.A., Smith H.O., Tomita M., Venter J.C., Glass J.I., Piñol J., Suzuki Y. (2018) Tuning gene activity by inducible and targeted regulation of gene expression in minimal bacterial cells. *ACS Synth. Biol.* **7**, 1538–1552.
17. Hutchison C.A., Chuang R.-Y., Noskov V.N., Assad-Garcia N., Deerinck T.J., Ellisman M.H., Gill J., Kannan K., Karas B.J., Ma L., Pelletier J.F., Qi Z.-Q., Richter R.A., Strychalski E.A., Sun L., Suzuki Y., Tsvetanova B., Wise K.S., Smith H.O., Glass J.I., Merryman C., Gibson D.G., Venter J.C. (2016) Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*. **351**, aad6253.
18. Mariscal A.M., González-González L., Querol E., Piñol J. (2016) All-in-one construct for genome engineering using Cre-lox technology. *DNA Res.* **23**, 263–270.
19. Choudhary E., Thakur P., Pareek M., Agarwal N. (2015) Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria. *Nat. Commun.* **6**, 62–67.
20. Nadolinskaia N.I., Zamakhaev M.V., Shumkov M.S., Armianinova D.K., Karpov D.S., Goncharenko A.V. (2021) CRISPR interference of adenylate cyclases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl. Biochem. Microbiol.* **57**, 421–425.
21. 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**, 759–771.
22. Li L., Wei K., Zheng G., Liu X., Chen S., Jiang W., Lu Y. (2018) CRISPR-Cpf1-assisted multiplex genome editing and transcriptional repression in *Streptomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, e00827–18.
23. Choi S.Y., Woo H.M. (2020) CRISPRi-dCas12a: a dCas12a-mediated CRISPR interference for repression of multiple genes and metabolic engineering in cyanobacteria. *ACS Synth. Biol.* **9**, 2351–2361.
24. Zhang X., Wang J., Cheng Q., Zheng X., Zhao G., Wang J. (2017) Multiplex gene regulation by CRISPR-ddCpf1. *Cell Discov.* **3**, 17018.
25. Fleck N., Grundner C. (2021) A Cas12a-based CRISPR interference system for multigene regulation in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **297**, 100990.
26. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
27. Koo B.-M., Kritikos G., Farelli J.D., Todor H., Tong K., Kimsey H., Wapinski I., Galardini M., Cabal A., Peters J.M., Hachmann A.-B., Rudner D.Z., Allen K.N., Typas A., Gross C.A. (2017) Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst.* **4**, 291–305.e7.
28. Freed E.F., Winkler J.D., Weiss S.J., Garst A.D., Mutalik V.K., Arkin A.P., Knight R., Gill R.T. (2015) Genome-wide tuning of protein expression levels to rapidly engineer microbial traits. *ACS Synth. Biol.* **4**, 1244–1253.
29. Garst A.D., Bassalo M.C., Pines G., Lynch S.A., Halweg-Edwards A.L., Liu R., Liang L., Wang Z., Zeitoun R., Alexander W.G., Gill R.T. (2017) Genome-wide mapping of mutations at single-nucleotide resolution for protein, metabolic and genome engineering. *Nat. Biotechnol.* **35**, 48–55.
30. van Opijnen T., Bodi K.L., Camilli A. (2009) Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nat. Methods*. **6**, 767–772.
31. Cui L., Vigouroux A., Rousset F., Varet H., Khanna V., Bikard D. (2018) A CRISPRi screen in *E. coli* reveals sequence-specific toxicity of dCas9. *Nat. Commun.* **9**, 191–192.
32. Wang T., Guan C., Guo J., Liu B., Wu Y., Xie Z., Zhang C., Xing X.-H. (2018) Pooled CRISPR interference screening enables genome-scale functional genomics study in bacteria with superior performance. *Nat. Commun.* **9**, 24–75.
33. Peters J.M., Koo B.-M., Patino R., Heussler G.E., Hearne C.C., Qu J., Inclan Y.F., Hawkins J.S., Lu C.H.S., Silvis M.R., Harden M.M., Osadnik H., Peters J.E., Engel J.N., Dutton R.J., Grossman A.D., Gross C.A., Rosenberg O.S. (2019) Enabling genetic analysis of diverse bacteria with Mobile-CRISPRi. *Nat. Microbiol.* **4**, 244–250.
34. Banta A.B., Ward R.D., Tran J.S., Bacon E.E., Peters J.M. (2020) Programmable gene knockdown in diverse bacteria using mobile-CRISPRi. *Curr. Protoc. Microbiol.* **59**, e130.
35. Wu J., Du G., Chen J., Zhou J. (2015) Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **5**, 13477.
36. Kim S.K., Han G.H., Seong W., Kim H., Kim S.-W., Lee D.-H., Lee S.-G. (2016) CRISPR interference-guided balancing of a biosynthetic mevalonate pathway increases terpenoid production. *Metab. Eng.* **38**, 228–240.
37. Lv L., Ren Y.-L., Chen J.-C., Wu Q., Chen G.-Q. (2015) Application of CRISPRi for prokaryotic metabolic engineering involving multiple genes, a case study: controllable P(3HB-co-4HB) biosynthesis. *Metab. Eng.* **29**, 160–168.
38. Kim S.K., Seong W., Han G.H., Lee D.-H., Lee S.-G. (2017) CRISPR interference-guided multiplex repression of endogenous competing pathway genes for redirecting metabolic flux in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **16**, 188.

39. Li Q., Chen J., Minton N.P., Zhang Y., Wen Z., Liu J., Yang H., Zeng Z., Ren X., Yang J., Gu Y., Jiang W., Jiang Y., Yang S. (2016) CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol. J.* **11**, 961–972.
40. Harris L.M., Welker N.E., Papoutsakis E.T. (2002) Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0a* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **184**, 3586–3597.
41. Cleto S., Jensen J.V.K., Wendisch V.F., Lu T.K. (2016) *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR interference (CRISPRi). *ACS Synth. Biol.* **5**, 375–385.

## CRISPR-Interference in Regulation Bacterial Gene Expression (Review)

N. I. Nadolinskaia<sup>1</sup>, \* and A. V. Goncharenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

\*e-mail: nioriss@gmail.com

The review is devoted to the use of the CRISPR/Cas system for obtaining knockdowns of target bacterial genes by CRISPR-mediated interference (CRISPRi). CRISPRi is based on the preservation of the ability of the inactivated dCas nuclease in complex with the guide RNA to bind the target, which leads to reversible repression of the selected genes. The review describes the principle of operation of CRISPR/Cas and CRISPRi/dCas and provides examples of various approaches to the use of CRISPRi with the most popular inactivated nucleases dCas9 and dCas12a among researchers. Also, attention is paid to the use of CRISPRi screening for genome-wide studies and the modular system for identifying many important patterns at the Mobile-CRISPRi genome level. In addition, we discuss the use of CRISPRi to optimize biotechnological productions, such as the synthesis of malonyl-CoA, *L*-lysine, *L*-glutamate, and other significant products.

**Keywords:** CRISPR, CRISPR interference, CRISPRi screening, Mobile-CRISPRi, dCas9, dCas12a