

УДК 571.21:579.23

РЕПАРАЦИЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК, ГЕНЕРИРУЕМЫХ CRISPR-Cas9 В *Pseudomonas putida* KT2440[#]

© 2022 г. Н. Шараев^{a, §}, L. Chacon-Machado^{a, c, §}, О. Мушарова^{a, b},
Е. Савицкая^a, К. Северинов^{a, b, *}

^aСколковский институт науки и технологий, Москва, 143028 Россия

^bИнститут молекулярной генетики, Москва, 119334 Россия

^cDepartment of Microbiology, Cornell University, Ithaca, NY 14850 USA

*e-mail: severik@waksman.rutgers.edu

Поступила в редакцию 03.05.2022 г.

После доработки 30.05.2022 г.

Принята к публикации 30.05.2022 г.

Pseudomonas putida KT2440 — это метаболически универсальная бактерия со значительными перспективами в качестве основного штамма для производства и переработки сложных органических соединений. В отличие от большинства бактерий, *P. putida* KT2440 кодирует белки Ku и LigD, участвующие в негомологичном соединении концов (NHEJ). Этот путь восстановления двухцепочечных разрывов (DSB) в ДНК обладает мутагенным потенциалом, который может быть использован в сочетании с доступными в настоящее время инструментами редактирования генома, генерирующими программируемые DSB. В этой работе мы исследовали эффект делеции или сверхэкспрессии NHEJ-ассоциированных ферментов *P. putida* KT2440 на мутациях, генерируемых при репарации Cas9-опосредованных DSB, с двойной целью — охарактеризовать NHEJ и изучить, как он функционально взаимодействует с текущим “золотым стандартом” редактирования генов. Результаты нашей работы проливают свет на нематричные механизмы репарации DSB у *P. putida* KT2440. Представленная информация послужит основой для расширения инструментария генной инженерии этого важного микроорганизма.

Ключевые слова: *Pseudomonas putida*, двухцепочечная ДНК, репарация DSB, CRISPR-Cas9

DOI: 10.31857/S0026898422060180

Repair of Double-Stranded DNA Breaks Generated by CRISPR-Cas9 in *Pseudomonas putida* KT2440

N. Sharaev¹, L. Chacon-Machado^{1, 3}, O. Musharova^{1, 2}, E. Savitskaya¹, and K. Severinov^{1, 2, *}

¹Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Moscow, 143028 Russia

²Institute of Molecular Genetics, Moscow, 119334 Russia

³Department of Microbiology, Cornell University, Ithaca, NY 14850 USA

*e-mail: severik@waksman.rutgers.edu

Pseudomonas putida KT2440 is a metabolically versatile bacterium with considerable promise as a chassis strain for production and degradation of complex organic compounds. Unlike most bacteria, *P. putida* KT2440 encodes the Ku and LigD proteins involved in Non-Homologous-End-Joining (NHEJ). This pathway of repair of double-strand-breaks (DSBs) in DNA has an intrinsic mutagenic potential that could be exploited in combination with currently available genome editing tools that generate programmable DSBs. Here, we investigated the effect of removal or overproduction of NHEJ-associated *P. putida* KT2440 enzymes on mutations generated upon repair of Cas9-mediated DSBs with the double purpose of characterizing the NHEJ pathway and investigating how it functionally interacts with the current gold standard tool for gene editing. The results of our work shed light on non-templated mechanisms of DSB repair in *P. putida* KT2440, an information that will serve as foundation to expand the gene engineering toolbox for this important microorganism.

Keywords: *Pseudomonas putida*, double-stranded DNA, DSB repair, CRISPR-Cas9

[#] Статья подана авторами на английском языке.

[§] Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.