

проблему. К наиболее распространенным возбудителям инфекций с множественной лекарственной устойчивостью можно отнести бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, преимущественно *Klebsiella pneumoniae* [1]. Исследование присутствия и характеристик CRISPR в бактериях, представляющих собой тип врожденного иммунитета, обнаруженный у прокариот, позволит разработать новые подходы в лечении данных инфекций с использованием высокоспецифичных бактериофагов.

Цель исследования — на примере штамма *Klebsiella pneumoniae* PittNDMO1 изучить структуру CRISPR/Cas-систем, провести поиск и анализ фагов через расшифрованные спейсерные последовательности в CRISPR-кассете при помощи методов биоинформатики.

Материал и методы. В качестве объекта была взята геномная последовательность *Klebsiella pneumoniae* PittNDMO1 (NZ_CP006798.1), загруженная из базы данных GenBank. Для поиска CRISPR/Cas системы использовались методы программного моделирования MacSyFinder (Macromolecular System Finder, ver. 1.0.2). Поиск структурных и функциональных характеристик Cas-генов осуществлялся при помощи вспомогательных программных пакетов makeblastdb (ver.2.2.28) и HMMER (ver.3.0). Для поиска CRISPR-кассет в геноме использовались онлайн-приложения «CRISPR: a CRISPR Interactive database». Для поиска фагов расшифрованные спейсерные последовательности в формате FASTA были загружены в онлайн-приложение «CRISPRTarget: bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets» [2, 3, 5].

Результаты исследования и обсуждение. Штамм *Klebsiella pneumoniae* PittNDMO1 был изолирован в больнице в Питтсбурге, штат Пенсильвания (США) из образца мочи пациента, госпитализированного с лихорадкой и субарахноидальным кровоизлиянием. Данный штамм оказался устойчивым ко всем β-лактамам, включая карбапенемы, аминогликозиды и фторхинолоны, но оставался восприимчивым к фосфомицину и колистину [4]. Его полный геном расшифрован в феврале 2017 года. CRISPR/Cas-система данного штамма включает две CRISPR-касеты, имеющих размеры 764 и 577 н.о. В структуре CRISPR-1 идентифицировано 12 спейсерных участков (35 н.о.), в CRISPR-2 обнаружено девять спейсеров размером 33 н.о. В непосредственной близости от кассет находятся Cas-гены, которые их обслуживают. Обнаруженные Cas-гены позволили отнести CRISPR/Cas-систему к CAS-Type-IA. Скрининг фагов через спейсерные последовательности показал, что в CRISPR-1 из 12 спейсеров 10 полностью соответствуют протоспейсерам фагов, специфичных для бактерий рода *Streptomyces*, *Gordonia*, *Rhodococcus* и *Mycobacterium*. К спейсеру 12, который, возможно, относится к более «древнему», так как находится в конце локуса CRISPR-1, не было выявлено полного совпадения фагов из известной базы данных. В CRISPR-2 установлена полная идентификация восьми спейсеров протоспейсерам фагов к бактериям рода *Propionibacterium*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*. Таким образом, изучение структур спейсеров CRISPR-кассет и их соответствие протоспейсерам свидетельствуют об эволюционной истории и адаптационных возможностях данного штамма, выявляют активные в отношении данного штамма бактериофаги.

Выводы. Данные исследования позволяют получать информацию о предполагаемой устойчивости CRISPR/Cas-системы данного штамма к обнаруженным фагам, о патогенных свойствах возбудителя и осуществлять подходы к созданию персонализированной фаготерапии и фагопрофилактики.

Литература:

1. Shen J., Lv L., Wang X. et al. Comparative analysis of CRISPR-Cas systems in *Klebsiella* genomes. *J. Basic Microbiol.* 2017; 57(4): 325–36.
2. Abby S.S., Néron B., Ménager H. et al. MacSyFinder: a program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems. *PLoS One* 2014; 9(10): 110–25.
3. Babu M., Beloglazova N., Flick R. et al. A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Mol. Microbiol.* 2011; 79(2): 484–502.
4. Doi Y., Hazen T.H., Boitano M. et al. Whole-genome assembly of *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and OXA-232 carbapenemases using single-molecule, real-time sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(10): 5947–53.
5. Борисенко А.Ю., Джигоев Ю.П., Парамонов А.И. и др. Использование биоинформационных программных методов для поиска CRISPR/CAS систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus*. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)* 2015; 2(133): 71–4.

СД37

А.В. Хромов^{1,2}, А.В. Махотенко^{1,2}, Е.А. Снигирь¹, С.С. Макарова^{1,2}, В.В. Макаров^{1,2}, Т.П. Супрунова¹, Н.О. Калинина^{1,2}, М.Э. Тальянский^{1,3}

БЕСПЛАЗМИДНАЯ ДОСТАВКА РНП-КОМПЛЕКСОВ CRISPR/CAS9 В КЛЕТКИ АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM TUBEROSUM*

¹ ООО «Дока-Генные технологии», Рогачёво, Московская область, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пущино, Россия

A.V. Khromov^{1,2*}, A.V. Makhotenko^{1,2}, E.A. Snigir¹, S.S. Makarova^{1,2}, V.V. Makarov^{1,2}, T.P. Suprunova¹, N.O. Kalinina^{1,2}, M.E. Taliansky^{1,3}

DNA-FREE DELIVERY OF CAS9/GRNA RIBONUCLEOPROTEINS (RNPS) INTO CELLS OF APICAL MERISTEMS OF *SOLANUM TUBEROSUM*

¹ ООО "Doka-Gennie Tekhnologii", Rogachovo, Moskovskaya Oblast, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ BIBCh, Puschino, Russia

warfolomey@gmail.com

Введение. Благодаря своей простоте, практичности и эффективности технология CRISPR-Cas9 широко применяется для редактирования генома на различных эукариотических системах, включая животных и растения. Однако существующие методы направленной доставки системы CRISPR/Cas9 в клетки растений с использованием агробактерий/плазмидной ДНК ограничивают возможности применения данной технологии в растениеводстве, поскольку относятся к технологиям генетической модификации организмов (ГМО). В настоящей работе мы описываем новый бесплазмидный способ доставки предварительно собранных рибонуклеопротеидных (РНП) комплексов Cas9-гидовая РНК в клетки

апикальной меристемы картофеля (*Solanum tuberosum*, cv Chicago) с помощью микрочастиц хитозана с использованием вакуумной инфльтрации или методом биобаллистики микрочастицами золота с последующей регенерацией растений с отредактированными аллелями гена фитоен десатуразы.

Материал и методы. Редактирующий РНП-комплекс формировали *in vitro* с использованием рекомбинантной эндонуклеазы Cas9 (EnGen® Cas9 NLS, *S. pyogenes*, NEB) и синтезированной *in vitro* гидовой РНК, последовательность которой для гена фитоен десатуразы картофеля была подобрана с помощью биоинформатического взб-сервиса, а активность проверена *in vitro* на целевом фрагменте гена [1]. Апикальные меристемы (размером около 100–200 мкм) выделяли из зеленых ростков пазушных почек растений *in vitro* картофеля сорта Чикаго и помещали в чашки Петри. Биобаллистику золотыми микрочастицами, функционализированными РНП-комплексами, проводили с помощью генной гелевой пушки PDS-1000/He (Bio-Rad). Инфльтрацию клеток функционализированными микрочастицами хитозана проводили в вакуумной камере генной в специально подобранных условиях [2].

Регенерацию растений из меристем проводили на среде с добавлением фитогормонов антибиотика в световом модуле в контролируемых условиях в течение 3–4 недель. Регенерированные растения достигали стадии 3–4 междоузлий за 4–5 недель, причем до 80% меристем развивались в нормальные растения. Из линий растений с симптомами появления целевого признака (обесцвечивания листьев) выделяли тотальную ДНК. Фрагмент целевой последовательности длиной 186 нт амплифицировали, клонировали в вектор pAL2TA (Евроген) и полученные конструкции трансформировали в *E. coli*. Для всех линий получали 30 колоний и секвенировали плазмидную ДНК. Уровень экспрессии гена фитоен десатуразы оценивали методом количественной ПЦР.

Результаты исследования и обсуждение. Для отработки метода бесплазмидной доставки системы CRISPR/Cas9 (РНП-комплексов) в клетки растений картофеля и тестирования ее активности как редактора генома мы использовали в качестве модельного гена ген картофеля, кодирующий фермент фитоен десатуразу. Фитоен десатураза катализирует ключевой этап биосинтеза каротиноидов, защищающих хлорофилл от фотоокисления; таким образом, выключение (нокаут) этого гена приводит к появлению белых пятен на листьях растения. Преформированный редактирующий РНП-комплекс, содержащий эндонуклеазу Cas9 и короткую гидовую РНК, доставляли в клетки апикальной меристемы растений картофеля методом биобаллистики функционализированными микрочастицами золота и с помощью вакуумной инфльтрации функционализированными микрочастицами хитозана. Визуальная оценка полученных растений-регенерантов показала, что эффективность редактирования (побеление листьев растений) при доставке редактора методом биобаллистики составила 2 линии из 90, а методом инфльтрации — 13 линий из 115. Проведенный генетический анализ отобранных линий выявил редактирование двух аллелей целевого гена при доставке РНП-комплекса биобаллистическим методом и одного аллеля при использовании метода инфльтрации. Генетические данные подтверждены ингибированием экспрессии целевого гена в обеих линиях растений-регенерантов и временным побелением растений отредактированных линий. Предложенные методы бесплазмидной доставки РНП-комплекса белка Cas9 и короткой гидовой

РНК в клетки апикальной меристемы перспективны для разработки эффективной технологии редактирования генома полиплоидных культур для создания в короткие сроки нетрансгенных (не содержащих гетерологичных последовательностей ДНК) растений с отредактированными целевыми генами.

Выводы.

1. Разработан метод бесплазмидной доставки редактирующего РНП-комплекса Cas9/короткая гидовая РНК в клетки апикальной меристемы картофеля;
2. Получены линии растений картофеля с отредактированными аллелями гена фитоен десатуразы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-04019).

Литература:

1. Хромов А.В., Гуцин В.А., Тимербаев В.И. и др. Конструирование гидовых РНК для редактирования генома картофеля с использованием системы CRISPR/CAS9. Доклады Академии наук 2018; 479(3): 343–7.
2. Makhotenko A.V., Snigir E.A., Kalinina N.O. et al. Data on a delivery of biomolecules into *Nicotiana benthamiana* leaves using different nanoparticles. Data Brief 2017; 16: 1034–7.

СД38

И.А. Яковлев^{1–4}, И.Г. Старостина²,
А.А. Шаймарданова², Д.Р. Аглиуллина²,
В.В. Соловьева², А.А. Ризванов²,
А.А. Исаев¹, Р.В. Деев^{1,3,4}

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ (МОДЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ) С ПОМОЩЬЮ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ И ПРОВЕРКИ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

¹ Институт Стволовых Клеток Человека, Москва, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³ Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Рязань, Россия

⁴ ООО «Генотаргет», Москва, Россия

I.A. Yakovlev^{1–4}, I.G. Starostina²,
A.A. Shaymardanova², D.R. Agliullina²,
V.V. Soloveva², A.A. Rizvanov², A.A. Isaev¹,
R.V. Deev^{1–4}

GENERATION OF CELLULAR TEST-SYSTEMS (DISEASE MODELS) WITH GENOME EDITING FOR DEVELOPMENT AND VERIFICATION OF METHODS OF HEREDITARY MUSCLE TISSUE DISEASES GENE THERAPY

¹ Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia

² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

³ Ryazan State Medical University n.a. I.P. Pavlov, Ryazan, Russia

⁴ Genotarget LLC, Moscow, Russia

ivan@ivan-ya.ru

Мышечные дистрофии характеризуются первичным поражением мышечной ткани, развивающимся непрерывно-прогредиентно, зачастую приводят