

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-17

**ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ ПОИСКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МИШЕНЕЙ
ГЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR-CAS У АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ**

**SOFTWARE FOR IDENTIFYING OF POTENTIAL TARGETS OF CRISPR-CAS GENE EDITING
IN ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA**

А. В. Гоглев¹, Н. Д. Пастухова²

¹Тюменский государственный университет

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

A. V. Goglev¹, N. D. Pastuhova²

¹University of Tyumen

²Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg

✉ alexey.goglev@gmail.com

Аннотация

Метод генного редактирования CRISPR-Cas может выступать одним из возможных методов преодоления антибиотикорезистентности бактерий. В исследовании нами было разработано программное обеспечение для поиска лучших целей генного редактирования на основе данных РНК-секвенирования штамма *Klebsiella pneumoniae* MGH66.

Abstract

The CRISPR-Cas gene editing method can be one of the possible ways to overcome bacterial antibiotic resistance. In this study, we developed a software to identify the best gene editing targets based on RNA sequencing data from the *Klebsiella pneumoniae* MGH66 strain.

В 2019 г. около 4,95 млн смертей было ассоциировано с антибиотикоустойчивыми бактериями, одной из ведущих по числу смертей от полирезистентных бактерий является *Klebsiella pneumoniae* [1].

Одним из возможных методов преодоления антибиотикорезистентности может быть редактирование генов устойчивости с помощью системы CRISPR-Cas. Система CRISPR-Cas представляет собой инструмент для генетической модификации организмов, основанный на механизмах иммунной защиты бактерий и архей от вирусов [2]. Однако правильное определение последовательности целевого гена является необходимой предпосылкой для эффективной работы системы CRISPR-Cas. Это обусловлено следующими факторами.

1. Если последовательность гена неверно определена, система может неправильно направить свои компоненты к ДНК, что может привести к нежелательным мутациям или к модификации неправильных участков генома [3].

2. Точное совпадение последовательности гена с РНК-матрицей, используемой системой CRISPR-Cas, значительно увеличивает вероятность успешной инактивации гена [4].

3. Офф-таргет эффекты, при которых система CRISPR-Cas наносит ущерб нецелевым участкам ДНК, могут быть минимизированы за счет точного определения последовательности целевого гена [3].

В нашей работе мы использовали данные РНК-секвенирования штамма *Klebsiella pneumoniae* MGH66 [5]. Данные представляли собой таблицу каунтов для 12 образцов, обработанных антибиотиками различных групп (меропенем, ципрофлоксацин и гентамицин). Оценку дифференциальной экспрессии генов провели с помощью библиотеки *limma* для языка программирования R. Для поиска нуклеотидной последовательности гена-мишени использовали референсную последовательность генома бактерии из базы данных RefSeq [6] и таблицу аннотированного генома (аннотация проводилась с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline) [7]. Для верификации полученной нуклеотидной последовательности использовали Nucleotide BLAST.

Мы провели оценку дифференциальной экспрессии генов, сравнивая контрольные образцы с теми, которые подвергались воздействию антибиотиков. В результате получили три таблицы с данными о у-регулируемых генах в образцах под влиянием антибиотиков (см. таблицу). Всего у-регулируемых генов под влиянием меропенема — 5, ципрофлоксацина — 87, гентамицина — 134.

**Пример таблицы с up-регулируемыми генами при росте бактерий
в среде ципрофлоксацина (представлено 3 гена из 87)**

GeneID	Symbol	logFC	t	adj.P.Val
AF52_RS03005	mutS	5.00	9.09	0.00
AF52_RS03305	recA	4.67	7.35	0.01
AF52_RS05815	proS	3.00	4.22	0.04

Среди up-регулируемых генов был ген *recA*, кодирующий рекомбиназу, которая участвует в SOS-ответе бактерии при воздействии ципрофлоксацина [8]. В дальнейшей работе целью для генного редактирования выступал *recA*.

Используя таблицу аннотированных генов, определили точное положение гена *recA* в референсной последовательности генома *Klebsiella pneumoniae* MGH66 и его нуклеотидную последовательность.

При верификации полученной нуклеотидной последовательности у бактерии штамма *Klebsiella pneumoniae* A16KP0119 была обнаружена идентичная последовательность, которая также кодирует ген *recA*.

Литература

1. Murray C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // *The Lancet*. 2022. Vol. 399 (10325). P. 629–655.
2. Jinek M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science*. 2012. Vol. 337, No. 6096. P. 816–821.
3. Qin M. et al. CRISPR-Cas and CRISPR-based screening system for precise gene editing and targeted cancer therapy // *Journal of Translational Medicine*. 2024. Vol. 22 (1). P. 516.
4. Richardson C., Kelsh R. N., Richardson R. New advances in CRISPR/Cas-mediated precise gene-editing techniques // *Disease Models & Mechanisms*. 2023. Vol. 16 (2). P. 1–15.
5. NCBI. GEO DataSets: GSE180237. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE180237> (дата обращения: 17.07.2024).
6. NCBI. Genome Data: GCF_000694555.1. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000694555.1/ (дата обращения: 17.07.2024).
7. NCBI. Gene Data: GCF_000694555.1. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/gene/GCF_000694555.1/ (дата обращения: 17.07.2024).
8. Wang P. et al. Subinhibitory concentrations of ciprofloxacin induce SOS response and mutations of antibiotic resistance in bacteria // *Annals of microbiology*. 2010. Vol. 60. P. 511–517.