

А. А. ШИРЯЕВА, А. В. СТРОЦКАЯ, К. В. СЕВЕРИНОВ

# Вирусы и бактерии — великое противостояние

Создание современной технологии геномного редактирования, которая уже с успехом применяется на разных животных, растениях, грибах и бактериях, базируется на исследованиях бактериальных систем CRISPR-Cas. Изначально предполагалось, что они участвуют в ликвидации повреждений бактериальной ДНК, но в 2007 г. стало ясно, что истинное предназначение этих систем – борьба с вирусами бактерий, бактериофагами. Всего за девять лет наука проделала гигантский путь от раскрытия механизма бактериального иммунитета до редактирования геномов людей – в настоящее время уже проводятся первые эксперименты по редактированию ДНК человеческих эмбрионов. У бактерий имеются и другие «иммунные» механизмы, изучение которых, возможно, создаст предпосылки для новых прорывов в биомедицине

**Ключевые слова:** бактериофаги, механизмы бактериального иммунитета, системы CRISPR-Cas, редактирование геномов.

**Key words:** bacteriophages, bacterial defense mechanisms, CRISPR-Cas systems, genome editing



ШИРЯЕВА Анна Александровна – аспирант Сколковского института науки и технологий (Москва), стажер-исследователь лаборатории молекулярной микробиологии НИК «Нанобиотехнологии» Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого. Соавтор 1 научной публикации



СТРОЦКАЯ Александра Валерьевна – аспирант и младший научный сотрудник лаборатории системной биомедицины и биотехнологии Сколковского института науки и технологий (Москва). Автор и соавтор 3 научных публикаций



СЕВЕРИНОВ Константин Викторович – доктор биологических наук, профессор Сколковского института науки и технологий (Москва), Ратгерского университета (Нью-Джерси, США), Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого; заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот Института молекулярной генетики РАН (Москва), лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Института биологии гена РАН (Москва). Автор и соавтор более 200 научных публикаций

**Б**актериофаги – это вирусы, которые поражают только бактерий. В ходе инфекции они влияют на все процессы жизнедеятельности бактериальной клетки, фактически превращая ее в фабрику по производству вирусного потомства. В конце концов клетка разрушается, а вновь образованные вирусные частицы выходят наружу и могут заражать новые бактерии.

Несмотря на огромное число и разнообразие природных фагов, встречаемся мы с ними редко. Однако бывают ситуации, когда деятельность этих вирусов не остается незамеченной. Например, на предприятиях, где производят сыры, йогурты и другие молочно-кислые продукты, часто приходится сталкиваться с вирусной атакой на бактерии, сбрасывающие молоко. В большинстве таких случаев фаговая инфекция распространяется молниеносно, и полезные бактерии гибнут, что приводит к значительным экономическим потерям (Neve *et al.*, 1994).

Именно благодаря прикладным исследованиям в интересах молочной промышленности, направленным на получение устойчивых к бактериофагам штаммов молочно-кислых бактерий, был открыт ряд механизмов, с помощью которых бактерии избегают инфекции. Параллельно были изучены способы, с помощью которых вирусы, в свою очередь, преодолевают бактериальные системы защиты (Moineau *et al.*, 1993).

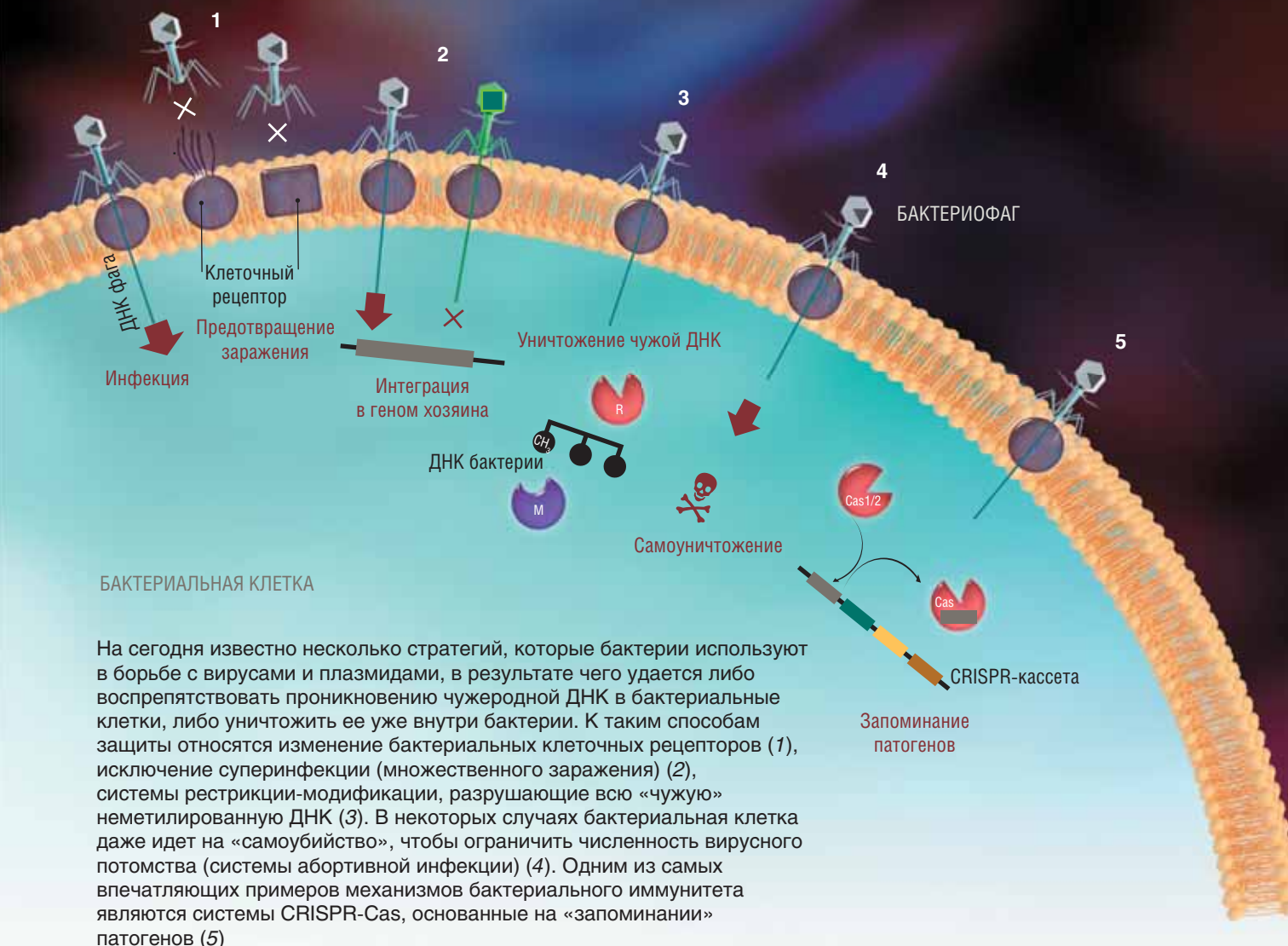
## Кто защищен – тот вооружен

На сегодня известно пять основных, весьма хитроумных механизмов защиты, которые бактерии выработали в непрестанной борьбе с вирусами: изменение рецептора на поверхности клетки; исключение суперинфекции; системы abortивной инфекции; системы рестрикции-модификации и, наконец, системы CRISPR-Cas.

**В ходе эволюции происходила и сейчас происходит селекция бактерий, способных избежать гибели при инфицировании вирусами, что, в свою очередь, служит стимулом для бактериофагов совершенствовать свои агрессивные стратегии. Эта «гонка вооружений», длящаяся несколько миллиардов лет, т. е. ровно столько, сколько существуют сами бактерии и их враги, породила целый ряд изощренных механизмов защиты и нападения**

© А. А. Ширяева, А. В. Строцкая, К. В. Северинов





BAКТЕРИАЛЬНАЯ КЛЕТКА

На сегодня известно несколько стратегий, которые бактерии используют в борьбе с вирусами и плазмидами, в результате чего удается либо воспрепятствовать проникновению чужеродной ДНК в бактериальные клетки, либо уничтожить ее уже внутри бактерии. К таким способам защиты относятся изменение бактериальных клеточных рецепторов (1), исключение суперинфекции (множественного заражения) (2), системы рестрикции-модификации, разрушающие всю «чужую» неметилированную ДНК (3). В некоторых случаях бактериальная клетка даже идет на «самоубийство», чтобы ограничить численность вирусного потомства (системы abortивной инфекции) (4). Одним из самых впечатляющих примеров механизмов бактериального иммунитета являются системы CRISPR-Cas, основанные на «запоминании» патогенов (5)

Вирусная атака начинается с прикрепления фага к специфическому рецептору на поверхности бактериальной клетки, но при *потере рецептора или изменении в его структуре* связывания вируса не происходит. Бактерии могут менять рецепторы в зависимости от окружающих условий, таких как плотность и разнообразие микроорганизмов в среде, а также доступность питательных веществ (Bikard *et al.*, 2012). Любопытный пример – бактерии вида *Vibrio anguillarum*, которые способны формировать *биопленку*, т.е. плотный слой клеток, прикрепленный к какой-либо поверхности. У этой бактерии имеется своего рода «чувство кворума», за счет чего при увеличении плотности клеток у них понижается выработка рецептора, с которым может связываться вирус. В результате биопленка становится почти полностью устойчивой к заражению (Tan *et al.*, 2015).

Однако потеря рецепторов не всегда выгодна для бактерии, поскольку они выполняют разнообразные важные функции, например, транспорт питательных веществ или формирование межклеточных контактов (Lopez-Pascua *et al.*, 2008). В результате для каждой пары «бактерия-бактериофаг» в ходе эволюции находится оптимальное решение, обеспечивающее приемлемый уровень защиты при сохранении возможности роста бактерий в различных условиях среды.

Следующий защитный механизм – *исключение суперинфекции*. Для бактериофагов известны два основных пути инфекции: *литический*, приводящий к быстрой гибели зараженной бактерии с высвобождением вирусного потомства, и *затяжной лизогенный* путь, когда наследственный материал вируса находится внутри генома бактерии, удваивается только с хозяйской ДНК, не причиняя клетке вреда. Когда клетка находится

В 1978 г. за открытие ферментов рестриктаз швейцарский генетик В. Арбер и американские микробиологи Д. Натанс и Г. Смит были удостоены Нобелевской премии. Изучение систем рестрикции-модификации привело к созданию технологии молекулярного клонирования, которая широко применяется во всем мире. С помощью рестриктаз можно «вырезать» гены из генома одного организма и вставить в геном другого, получив химерную рекомбинантную ДНК, не существующую в природе. Различные вариации этого подхода используются учеными для изолирования отдельных генов и их дальнейшего изучения. Кроме того, он широко применяется в фармацевтике, например, для наработки инсулина или терапевтических антител: все лекарства такого рода созданы с помощью молекулярного клонирования, т.е. являются продуктом генной модификации

в состоянии лизогенной инфекции, то, с точки зрения «домашнего» вируса (*профага*), ее заражение другим вирусом нежелательно.

Действительно, многие вирусы, встроившие свою ДНК в геном клетки, ограничивают вновь проникшего в клетку бактериофага («суперинфекцию») посредством специальных белков-репрессоров, не позволяющих генам «пришельца» работать (Calendar, 2006). А некоторые фаги даже препятствуют другим вирусным частицам проникнуть в инфицированную ими клетку, воздействуя на ее рецепторы. В результате бактерии-носительницы вируса имеют очевидное преимущество по сравнению с незараженными собратьями.

Во время инфекции все ресурсы бактериальной клетки направлены на производство новых вирусных частиц. Если рядом с такой клеткой будут находиться другие уязвимые бактерии, то инфекция быстро распространится и приведет к гибели большинства из них. Однако для таких случаев у бактерии имеются так называемые системы *abortивной инфекции*, которые приводят ее к запрограммированной гибели. Конечно, этот «альтруистичный» механизм не спасет саму зараженную клетку, но остановит распространение вирусной инфекции, что выгодно для всей популяции. Бактериальные системы abortивной инфекции очень разнообразны, но детали их функционирования пока изучены недостаточно.

К средствам противовирусной защиты бактерий относятся и системы *рестрикции-модификации*, в которые входят гены, кодирующие два белка-фермента – *рестриктазу* и *метилазу*. Рестриктаза узнает определенные последовательности ДНК длиной 4–6 нуклеотидов и вносит в них двуцепочечные разрывы. Метилаза, напротив, ковалентно модифицирует эти последовательности, добавляя к отдельным нуклеотидным

основаниям метильные группы, что предотвращает их узнавание рестриктазой.

В ДНК бактерии, содержащей такую систему, все сайты модифицированы. И если бактерия заражается вирусом, ДНК которого не содержит подобной модификации, рестриктаза защитит ее от инфекции, разрушив вирусную ДНК. Многие вирусы «борются» с системами рестрикции-модификации, не используя в своих геномах последовательности, узнаваемые рестриктазой, – очевидно, что вирусные варианты с другой стратегией просто не оставили потомства.

Последней и в настоящее время самой интересной системой бактериального иммунитета является система *CRISPR-Cas*, с помощью которой бактерии способны «записывать» в собственный геном и передавать потомству информацию о фагах, с которыми они сталкивались в течение жизни. Наличие таких «воспоминаний» позволяет распознавать ДНК фага и эффективней противостоять ему при повторных инфекциях. В настоящее время к системам CRISPR-Cas приковано пристальное внимание, так как они стали основой революционной технологии редактирования геномов, которая в будущем, возможно, позволит лечить генетические заболевания и создавать новые породы и сорта сельскохозяйственных животных и растений.

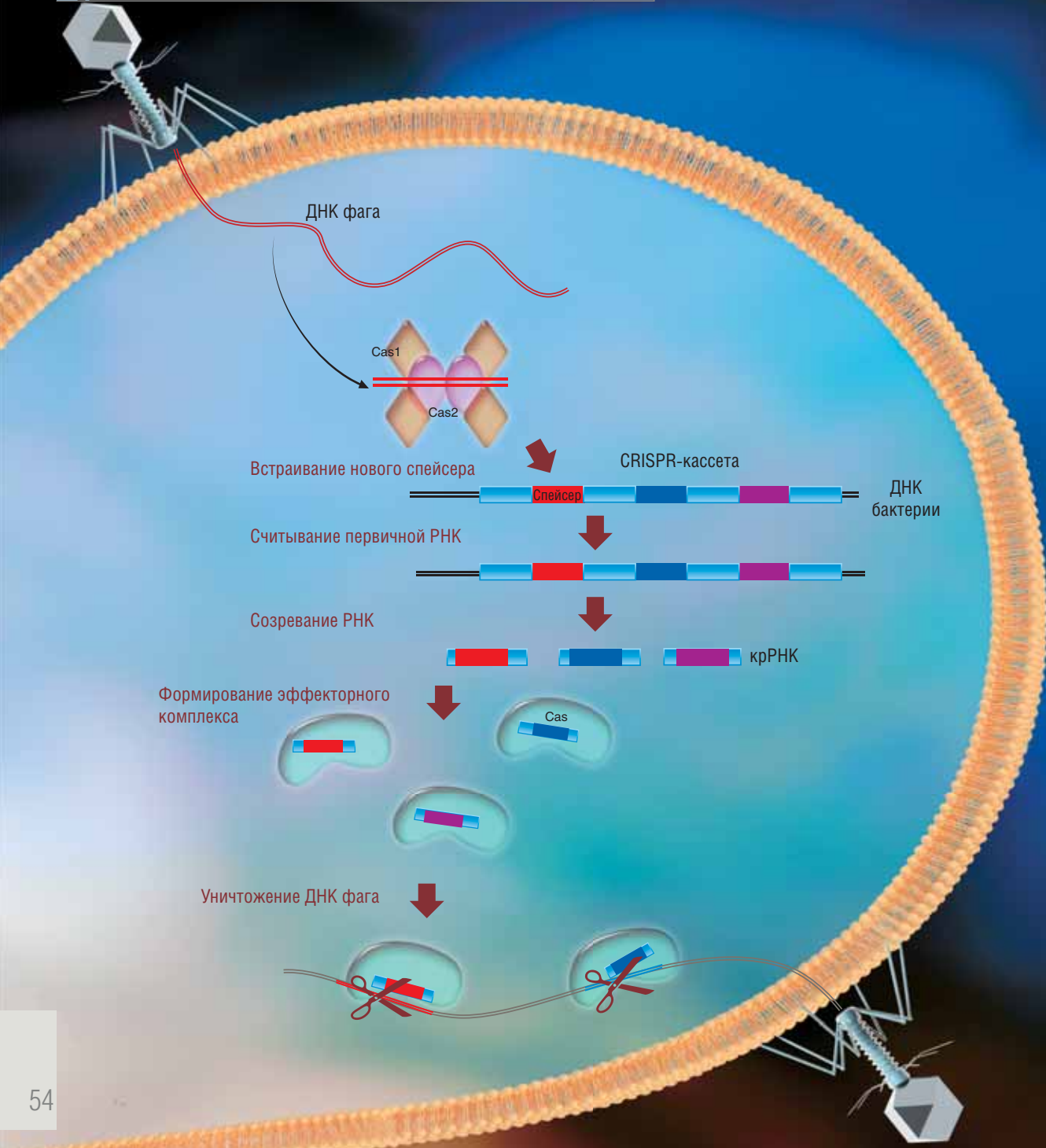
Врага нужно знать в лицо

Системы CRISPR-Cas являются уникальным примером адаптивного иммунитета бактерий. При проникновении в клетку ДНК фага специальные белки Cas встраивают фрагменты вирусной ДНК длиной 25–40 нуклеотидов в определенный участок генома бактерии (Barrangou *et al.*, 2007). Такие фрагменты называются *спейсерами* (от англ. *spacer* – промежуток), участок, где происходит встраивание, – *CRISPR-кассета* (от англ. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), а сам процесс приобретения спейсеров – *адаптация*.

Чтобы использовать спейсеры в борьбе с фаговой инфекцией, в клетке должен происходить еще один процесс, управляемый белками Cas, названный *интерференцией*. Суть его в том, что в ходе транскрипции CRISPR-кассеты образуется длинная молекула РНК, которая разрезается белками Cas на короткие фрагменты – защитные *криспРНК* (крРНК), каждая из которых содержит один спейсер. Белки Cas вместе с молекулой крРНК образуют *эффекторный комплекс*, который сканирует всю ДНК клетки на наличие последовательностей, идентичных спейсеру (*протоспейсеров*). Найденные протоспейсеры расщепляются белками Cas (Westra *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012).

Системы CRISPR-Cas обнаружены у большинства прокариот – бактерий и архей. Хотя общий принцип





При формировании адаптивного иммунитета бактерий бактериальные белки Cas1 и Cas2 встраивают фрагменты вирусной ДНК в качестве спейсеров в CRISPR-кассету, в которой соседние спейсеры отделены друг от друга повторами ДНК (Nuñez *et al.*, 2014, 2015a, b). CRISPR-кассета транскрибируется с образованием длинной некодирующей РНК. Специальные белки Cas, а также, в некоторых случаях, другие белки бактерии нарезают эту РНК на короткие криспРНК (крРНК), каждая из которых содержит один спейсер и часть повтора. В ходе интерференции белки Cas вместе с крРНК образуют эффекторный комплекс, который сканирует ДНК клетки в поисках последовательностей, соответствующих спейсеру крРНК, и разрезает их (Westra *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012)

**Бактериофаги, как факторы среды, вызывают направленные изменения в геноме бактерий, которые наследуются и дают бактериям явное преимущество, спасая от повторных инфекций. Поэтому системы CRISPR-Cas можно считать примером ламарковской эволюции, при которой происходит наследование благоприобретенных признаков (Koonin *et al.*, 2009)**

действия всех известных систем CRISPR-Cas одинаков, механизмы их работы могут существенно отличаться в деталях. Наибольшие различия проявляются в строении и функционировании эффекторного комплекса, в связи с чем системы CRISPR-Cas делят на несколько типов. На сегодняшний день описаны шесть типов таких неродственных друг другу систем (Makarova *et al.*, 2015; Shmakov *et al.*, 2015).

Наиболее изученной является система CRISPR-Cas I типа, которой обладает излюбленный объект молекулярно-биологических исследований – бактерия кишечная палочка (*Escherichia coli*). Эффекторный комплекс в этой системе состоит из нескольких небольших белков Cas, каждый из которых отвечает за разные функции: разрезание длинной некодирующей CRISPR РНК, связывание коротких крРНК, поиск, а затем разрезание ДНК-мишени.

В системах II типа эффекторный комплекс образован единственным большим белком Cas9, который в одиночку справляется со всеми задачами. Именно простота и относительная компактность таких систем послужили основой для разработки технологии редактирования ДНК. Согласно этому методу, в клетки эукариот (например, человека) доставляют бактериальный белок Cas9 и крРНК, которую называют *гидовой* (гРНК). Вместо спейсера вирусного происхождения такая гРНК содержит целевую последовательность, соответствующую интересному для исследователя участку генома, например, где есть мутация, вызывающая какую-то болезнь. Получить же гРНК «на любой вкус» совсем несложно.

Эффекторный комплекс Cas9-гРНК вносит двуцепочечный разрыв в последовательность ДНК, точно соответствующую «гидовой» РНК. Если вместе с Cas9 и гРНК внести в клетку и последовательность ДНК, не содержащую мутацию, то место разрыва будет восстановлено по матрице «правильной» копии! Таким образом, используя разные гРНК, можно исправлять нежелательные мутации или вводить направленные изменения в гены-мишени. Высокая точность программируемого узнавания мишеней комплексом Cas9-гРНК и простота метода привели к лавинообразному росту работ по редактированию геномов клеток животных и растений (Jiang & Marraffini, 2015).

## Гонка вооружений

В ходе эволюции бактерии и бактериофаги выработали ряд приспособлений, которые должны обеспечить каждому из участников «гонки вооружений» преимущество в борьбе с противником или возможность уклониться от его атаки.

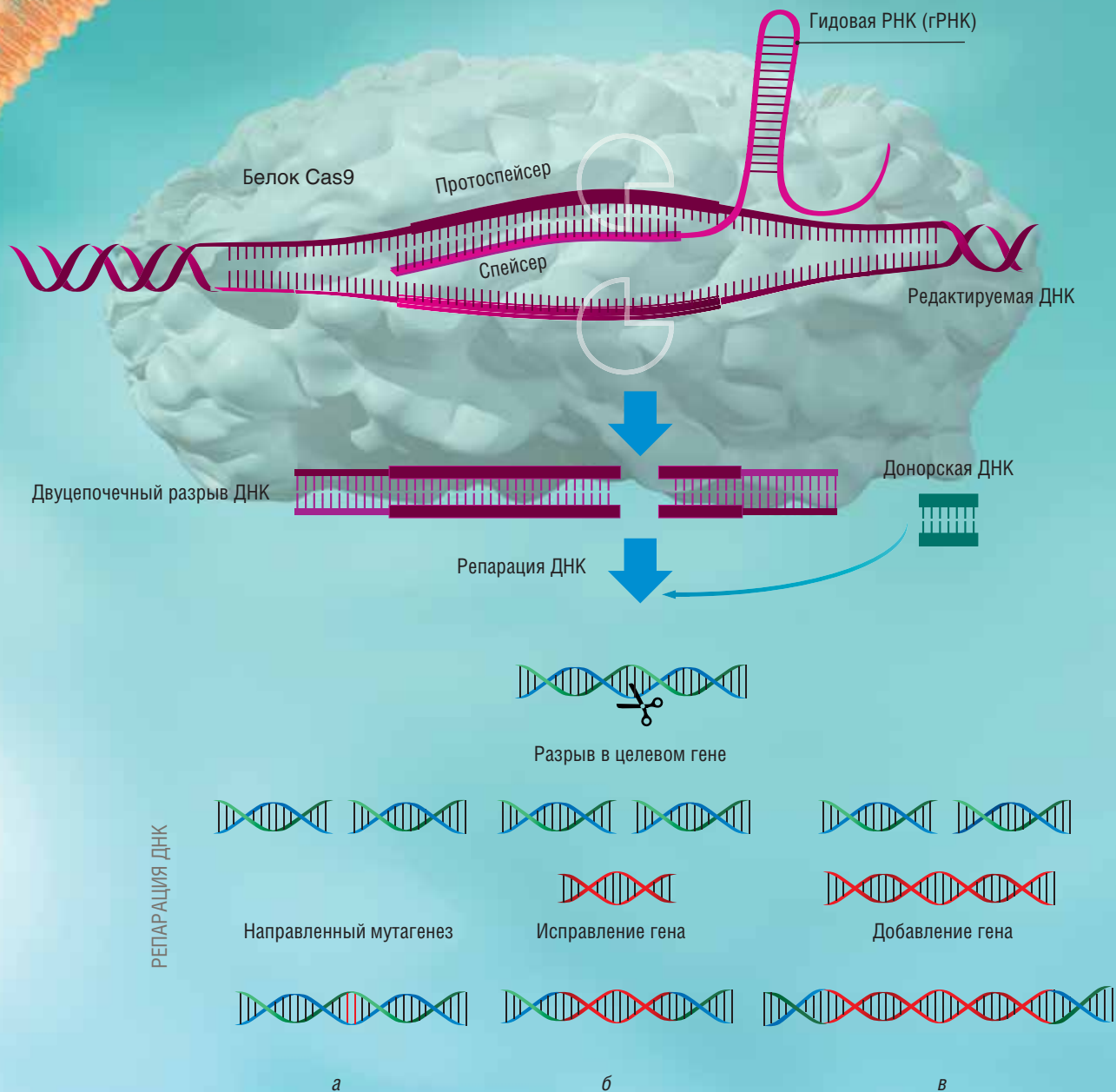
Что касается систем CRISPR-Cas, то если фаг обзаведется мутацией в протоспейсере, эффективность его узнавания эффекторным комплексом снижается, и фаг получает возможность заразить клетку. Но и бактерия не оставит без внимания такую попытку ускользнуть от CRISPR-Cas: в качестве ответной реакции она начинает с резко возросшей эффективностью приобретать новые дополнительные спейсеры из ДНК уже «знакомого» фага, пусть и мутировавшего. Такое явление, названное праймированной адаптацией, многократно повышает эффективность защитного действия систем CRISPR-Cas (Datsenko *et al.*, 2012).

Некоторые бактериофаги реагируют на наличие в бактериальной клетке систем CRISPR-Cas выработкой особых анти-CRISPR белков, способных связываться с белками Cas и блокировать их функции (Bondy-Denomy *et al.*, 2015). Еще одно ухищрение – обмен участком генома вируса, на которые нацелена система CRISPR-Cas, на участки геномов родственных вирусов, отличающихся по составу нуклеотидной последовательности (Paez-Espino *et al.*, 2015).

Результаты работ нашей лаборатории свидетельствуют, что зараженные клетки на самом деле погибают даже при наличии защиты CRISPR-Cas, но при этом они ограничивают численность вирусного потомства. Поэтому CRISPR-Cas правильнее относить к системам abortивной инфекции, а не к «настоящим» иммунным системам.

Благодаря постоянному совершенствованию биоинформатических алгоритмов поиска, а также включению в анализ все большего количества прокариотических геномов, открытие новых типов CRISPR-Cas систем является делом недалекого будущего. Предстоит также выяснить и детальные механизмы работы многих недавно открытых систем. Так, в статье, опубликованной в 2016 г. в журнале *Science* и посвященной анализу системы CRISPR-Cas VI типа, описан белок C2c2, образующий эффекторный комплекс с крРНК, который нацелен на деградацию не ДНК, а РНК (Abudayyeh *et al.*, 2016). В будущем такое необычное свойство может быть использовано в медицине для регулирования активности генов путем изменения количества кодируемых ими РНК.





Система CRISPR-Cas, используемая для редактирования генома, включает в себя гидовую РНК (гРНК) и белок Cas9. С помощью белка Cas9 гРНК присоединяется к протоспейсеру – участку вирусной ДНК, соответствующему спейсеру гРНК (либо, в случае искусственной системы, участку целевого гена эукариотической клетки). После узнавания белок Cas9 разрезает цепь ДНК в одном строго определенном месте. Репарация ДНК в месте разреза может происходить по пути негомологичного соединения концов, в результате чего с большой частотой возникают мутации (а). Если же в клетку доставить искусственно синтезированную донорскую молекулу, которая соответствует участку разрыва, то таким образом можно произвести либо замену участка гена (б), либо направленную вставку трансгена (в). Таким образом, с помощью системы CRISPR-Cas можно исправлять генетические нарушения или вносить желаемые изменения

Изучение стратегий борьбы бактерий с бактериофагами, несмотря на свою кажущуюся фундаментальность и отвлеченность от задач практической медицины, принесло неоценимую пользу человечеству. Примерами этого могут служить методы молекулярного клонирования и редактирования геномов – направленного внесения или удаления мутаций и изменения уровня транскрипции определенных генов.

Благодаря быстрому развитию методов молекулярной биологии всего лишь через несколько лет после открытия механизма действия систем CRISPR-Cas была создана работающая технология геномного редактирования, способная бороться с болезнями, ранее считавшимися неизлечимыми. Доступность и простота этой технологии позволяют рассматривать ее как основу для медицины, ветеринарии, сельского хозяйства и биотехнологий будущего, которые будут базироваться на направленных и безопасных генных модификациях.

Нет никаких сомнений, что дальнейшее изучение взаимодействия бактерий и их вирусов может открыть перед нами такие возможности, о которых мы сейчас даже не подозреваем.

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 16-34-01176)

*Лумепатура*  
 Abudayyeh O. O., Gootenberg J. S., Konermann S. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector // *Science*. 2016. V. 353: aaf5573.

Barrangou R., Fremaux C., Deveau H. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // *Science*. 2007. V. 315. P. 1709–1712.

Bikard D., Marraffini L. A. Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages // *Curr. Opin. Immunol.* 2012. V. 1. P. 15–20.

Bondy-Denomy J., Garcia B., Strum S. et al. Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins // *Nature*. 2015. V. 526. P. 136–139.

Calendar R., Abedon S. T. *The Bacteriophages* // 2nd Ed., Oxford University Press. 2006.

Datsenko K. A., Pougach K., Tikhonov A. et al. Molecular memory of prior infections activates the CRISPR-Cas adaptive bacterial immunity system // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 945

Jiang W., Marraffini L. A. CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems // *Annu. Rev. Microbiol.* 2015. V. 69. P. 209–28.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science*. 2012. V. 337. P. 816–821.

Koonin E. V., Wolf Y. I. Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? // *Biol. Direct.* 2009. V. 4. P. 42.

Lopez-Pascua L., Buckling A. Increasing productivity accelerates host-parasite coevolution // *J. Evol. Biol.* 2008. V. 3. P. 853–860.

Makarova K. S., Wolf Y. I., et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 11. P. 722–736.

Moineau, S., Pandian S., Klaenhammer T. R. Restriction/modification systems and restriction endonucleases are more effective on lactococcal bacteriophages that have emerged recently in the dairy industry // *Appl. Envir. Microbiol.* 1993. V. 59. P. 197–202.

Neve H., Kemper U., et al. Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophage in a dairy plant // *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.* 1994. V. 46. P. 167–178.

Nuñez J. K., Harrington L. B., et al. Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity // *Nature*. 2015a. V. 527. P. 535–538.

Nuñez J. K., Kranzusch P. J., et al. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21. P. 528–534.

Nuñez J. K., Lee A. S., Engelman A., Doudna J. A. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity // *Nature*. 2015b. V. 519. P. 193–198.

Paez-Espino D., Sharon I., et al. CRISPR Immunity Drives Rapid Phage Genome Evolution in *Streptococcus thermophilus* // *MBio*. 2015. V. 6: e00262–15.

Shmakov S., Abudayyeh O. O., Makarova K. S., et al. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. // *Mol. Cell*. 2015. V. 60. P. 385–397

Tan D., Svenningsen S. L., Middelboe M. Quorum sensing determines the choice of anti-phage defense strategy in *Vibrio anguillarum*. // *mBio* 2015. V. 6: e00627–15.

Westra E. R., van Erp P. B., Küme T., et al. CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3 // *Mol. Cell*. 2012. V. 46. P. 595–605.