Секция «Генетика»

Получение делеции в некаталитическом домене белка GdpP Staphylococcus aureus посредством направленного геномного редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9

Научный руководитель – Сопова Юлия Викторовна

Кандина Дарья Алексеевна

Студент (магистр)

Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: candyda20@mail.ru

В Российской Федерации за последние десятилетия фиксируется постоянно возрастающая резистентность патогенных микроорганизмов к антибиотикам, а *Staphylococcus aureus* является одним из наиболее распространенных возбудителей генерализованных инфекций человека с высокой заболеваемостью и смертностью.

Направленное генетическое изменение генома бактерий имеет решающее значение для понимания функции конкретных генов при изучении проблемы антибиотикорезистентности. У *S. aureus* обнаруживается нескольких систем рестрикции-модификации, которые эффективно защищают геном от внешнего внедрения генетической информации, что обусловливает сложность геномного редактирования. Поэтому для проведения генетических исследований используется модельный штамм *S. aureus* RN4220 с отсутствующей системой рестрикции-модификации.

В клетках бактерий поддерживается определенная концентрация вторичного сигнального мессенджера ц-ди-АМФ. GdpP представляет собой фермент фосфодиэстеразу, участвующий в его разрушении у *S. aureus*. Мутации и делеции в домене DHH/DHHA1 в белке GdpP (рис. 1) приводят к повышению концентрации ц-ди-АМФ в клетке, что влияет на ее рост и приводит к снижению чувствительности к β-лактамам и другим противомикробным препаратам, нацеленным на клеточную стенку. Роль мутаций в других доменах до конца не изучена. Целью работы стало получение направленной делеции в линкерном участке между доменами GGDEF и DHH/DHHA1 белка GdpP.

Одним из успешно работающих вариантов для редактирования генома *Staphylococcus aureus* является двухкомпонентная система, состоящая из вектора pCN-EF2132tet с геном рекомбиназы EF2132 *Enterococcus faecalis* и вектора pCas9counter-gdpP с геном нуклеазы Cas9 *Streptococcus pyogenes* совместно с направляющей РНК (sgRNA) для контрселекции клеток, в которых отсутствует вводимая нами мутация [2].

После двух последовательных трансформаций штамма *S. aureus* RN4220 плазмидами pCN-EF2132tet и pCAS9counter-gdpP был получен один штамм с целевой делецией в белке GdpP (308 – 337 аминокислота) [1]. При сравнении предсказанных пространственных структур отмечается изменение пространственной укладки белка GdpP с делецией в линкерном участке между доменами GGDEF и DHH/DHHA1 (рис. 2Б), что не влияет на фенотип и чувствительность к антибиотикам различных классов у *S. aureus*. Таким образом, использование системы CRISPR/Cas9 для геномного редактирования *S. aureus* является высокоэффективным методом и может быть использовано в генно-инженерных задачах для грамположительных бактерий.

Исследование поддержано грантом СПбГУ PURE ID 95445540.

Источники и литература

1) Сопова Ю. В., и др. Влияние делеции в некаталитическом домене GdpP на фенотип Staphylococcus aureus посредством направленного геномного редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9 // ГЕНЕТИКА. 2023. Т. 59. No. 9. С. 1094-1098.
2) Penewit K., et al. Efficient and Scalable Precision Genome Editing in Staphylococcus aureus through Conditional Recombineering and CRISPR/Cas9-Mediated Counterselection // mBio. 2018. №9(1).

Иллюстрации

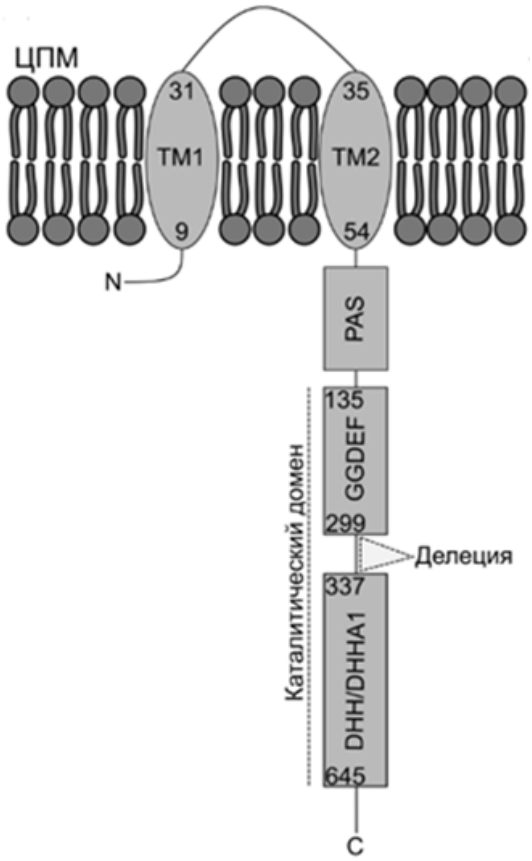

Рис. : 1. Схема доменной структуры GdpP. В GdpP выделяют несколько доменов: два трансмембранных (TM1, TM2) и три внутриклеточных: PAS домен, являющийся сенсором сигналов, GGDEF домен, участвующий в передаче сигнала, и DHH/DHHA1, катализирующий гидролиз c-di-AMP (ц-ди-АМФ) до фосфаденилил-аденозина (pApA). Треугольником отмечена область делеции; ЦПМ – цитоплазматичсекая мембрана.

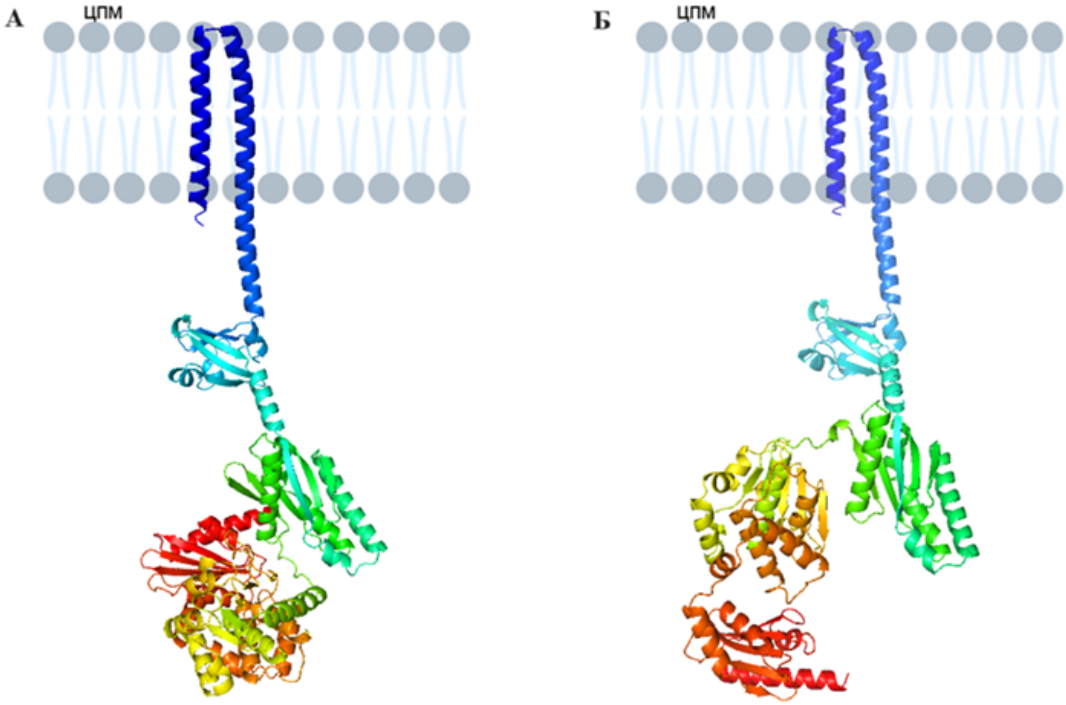

Рис. : 2. Предсказанная пространственная структура белка GdpP: А – белок без делеции (655 а.к.); Б – белок с делецией в некаталитическом домене (625 а.к.). ЦПМ – цитоплазматическая мембрана.