

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ В НЕКАТАЛИТИЧЕСКОМ ДОМЕНЕ GdpP НА ФЕНОТИП *Staphylococcus aureus* ПОСРЕДСТВОМ НАПРАВЛЕННОГО ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9

© 2023 г. Ю. В. Сопова^{1, 2, *}, М. Е. Велижанина^{1, 3}, Д. А. Кандина^{1, 4}, В. В. Гостев^{5, 6},
П. С. Чулкова⁵, О. С. Сулян⁵, С. В. Сидоренко^{5, 6}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 198504 Россия

³Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург, 196608 Россия

⁴Государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина”, Санкт-Петербург, 196605 Россия

⁵Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства,
Санкт-Петербург, 197022 Россия

⁶Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,
Санкт-Петербург, 191015 Россия

*e-mail: y.sopova@spbu.ru

Поступила в редакцию 22.03.2023 г.

После доработки 13.04.2023 г.

Принята к публикации 17.04.2023 г.

Высокие внутриклеточные концентрации молекул циклического ди-аденозинмонофосфата (с-di-AMP) влияют на формирование устойчивости к антибиотикам, действующих на клеточную стенку у *Staphylococcus aureus*. Накопление молекул с-di-AMP происходит вследствие мутаций в домене DHH/DHHA1 белка GdpP. Роль мутаций в других доменах GdpP до конца не изучена. В этой связи целью настоящей работы стало получение направленной делеции в геноме без сдвига рамки считывания в линкерном участке между доменами GGDEF и DHH/DHHA1 белка GdpP. Для редактирования генома использовали штамм *S. aureus* RN4220 с отсутствующей системой рестрикции-модификации. Использовали двух векторную систему с термочувствительными ориджинами репликации, плазмиды: pCN-EF2132tet с геном рекомбиназы EF2132 *Enterococcus faecalis* и pCAS9counter с геном РНК-направляемой нуклеазы Cas9 *Streptococcus pyogenes*. Штамм *S. aureus* RN4220 трансформировали вектором pCN-EF2132tet для получения рекомбинирующих компетентных клеток, а затем вводили донорный олигонуклеотид одновременно с вектором контрselection. После двух трансформаций был получен штамм с целевой делецией (90 пн), которая соответствовала 308–337 аминокислотному участку в белке GdpP. У мутантного штамма не было выявлено фенотипических изменений: ЛАГ-фаза роста, общая скорость роста, время деления клеток, морфология колоний не отличались от исходного штамма. Также сохранялась чувствительность к антибиотикам, действующим на клеточную стенку. Таким образом, мутации в GdpP в линкерном участке между GGDEF и DHH/DHHA1 не влияют на чувствительность к антибиотикам у *S. aureus*.

Ключевые слова: GdpP, *Staphylococcus aureus*, CRISPR/Cas9, геномное редактирование.

DOI: 10.31857/S0016675823090126, **EDN:** WUYBXG

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) является важнейшим условно-патогенным микроорганизмом, вызывающим различные инфекции у человека и животных, часто проявляет множественную устойчивость к антибиотикам, и опосредует высокую летальность [1]. Для изучения механизмов вирулентности и устойчивости к антибиотикам широко используются методы на-

правленного мутагенеза. У *S. aureus* обнаруживается несколько систем рестрикции-модификации, которые эффективно защищают геном от внешнего привнесения генетической информации [2]. Это обуславливает сложность геномного редактирования на модели *S. aureus*. В этой связи для проведения генетических исследований часто используется модельный штамм *S. aureus* RN4220

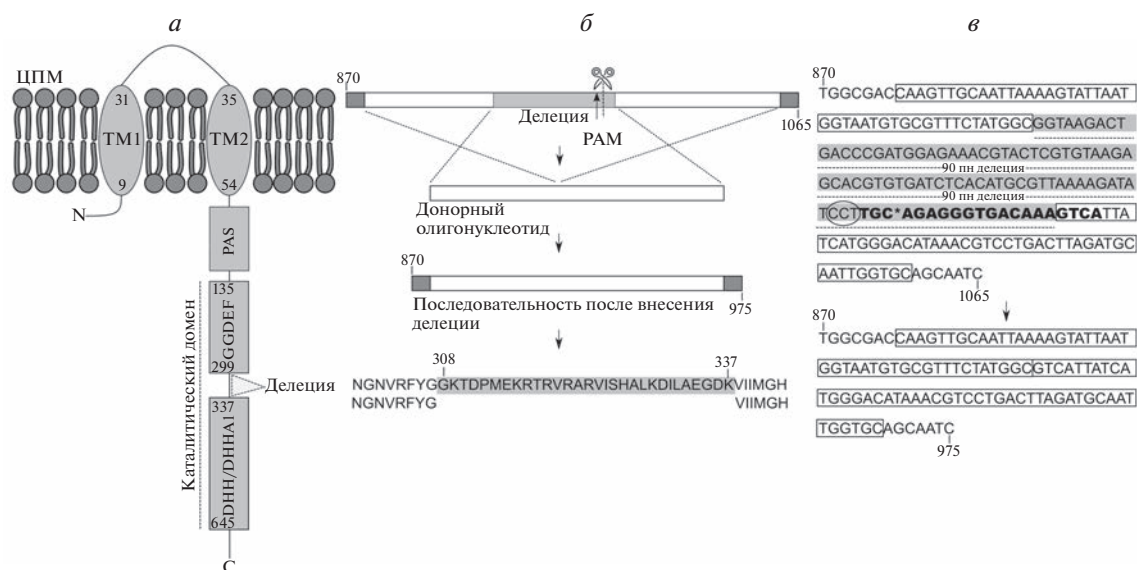


Рис. 1. Схема получения делеции. *а* — схема доменной структуры GdpP, треугольником отмечена область делеции; ЦПМ — цитоплазматическая мембрана. *б* — схема внесения делеции; ножницами отмечено место разреза нуклеазой Cas9; светлым серым цветом отмечена делеция; пунктирными линиями отмечены области идентичных последовательностей донорного олигонуклеотида. *в* — нуклеотидная последовательность гена *gdpP* с 870–1065 пн участка между кодируемыми доменами GGDEF и DHN/DHNA1. В рамках отмечена последовательность донорного праймера (90 пн); * звездочкой отмечено место разреза нуклеазой Cas9; овалом отмечена область PAM (последовательность CCT); жирным шрифтом выделена последовательность (20 пн) направляющей РНК (sgRNA). Делетированная консенсусная последовательность *gdpP* представлена фрагментом 870–975 пн. Серым цветом отмечена область делеции нуклеотидной (90 пн) и аминокислотной последовательности (30 аминокислот).

с отсутствующей системой рестрикции-модификации [3]. Штамм *S. aureus* RN4220 может выступать как генетический реципиент или как промежуточный хозяина для специфического метилирования мобильных генетических элементов в ходе генно-инженерных манипуляций. Существуют несколько подходов геномного редактирования *S. aureus*, в частности, внесение мутаций с помощью транспозонов или с помощью фаговой трансдукции [2]. Однако эти методы достаточно сложно воспроизводимы и не всегда эффективны. Недавно стал доступен новый подход — это редактирование с помощью системы CRISPR/Cas9 [4–6].

В последнее десятилетие у *S. aureus* интенсивно изучается влияние метаболизма вторичного сигнального мессенджера циклического ди-аденозинмонофосфата (**c-di-AMP**) на формирование устойчивости к антибиотикам [7]. Количество c-di-AMP регулируется в основном балансом между активностью c-di-AMP-синтазы (DacA), которая синтезирует c-di-AMP и фосфодиэстеразы GdpP, гидролизующей c-di-AMP. Установлено, что мутации в белке GdpP у *S. aureus* приводят к повышению внутриклеточных концентраций c-di-AMP, что в свою очередь, влияет на формирование устойчивости и толерантности к действию

бета-лактамовых антибиотиков. В структуре GdpP выделяют несколько доменов (рис. 1, *а*): два трансмембранных (TM1, TM2) и три внутриклеточных: PAS-домен, являющийся сенсором сигналов, GGDEF-домен, участвующий в передаче сигнала, и DHN/DHNA1, катализирующий гидролиз c-di-AMP до фосфаденилил-аденозина (pApA). Различные мутации, приводящие к устойчивости к антибиотикам, в основном локализованы в DHN/DHNA1-домене (337–645 а.к.) [8].

Ранее в ходе экспериментов по селекции устойчивости *S. aureus* разных генетических линий к бета-лактамам нами было показано, что мутации, расположенные в линкерном участке между доменами GGDEF и DHN/DHNA1 в белке GdpP, могут вносить свой вклад в формирование устойчивости [9, 10]. В этой связи целью настоящей работы стало использование системы CRISPR/Cas9 для целенаправленного внесения делеции, без сдвига рамки считывания, в участок гена *gdpP*, кодирующий этот линкерный участок, на модельном штамме *S. aureus* RN4220.

Для направленного редактирования генома штамма *S. aureus* RN4220 нами была использована система, включающая два вектора с термочувствительными ориджинами репликации. Первый вектор pCN-EF2132tet содержал ген рекомбиназы

EF2132 *Enterococcus faecalis*. Второй вектор — pCAS9counter — нес ген РНК-направляемой нуклеазы Cas9 *Streptococcus pyogenes*, вносящей двуниевые разрывы в целевую ДНК, вместе с последовательностью направляющей РНК. Направленность Cas9 на интересующий локус достигается путем клонирования олигонуклеотида длиной 20 пн в основную цепь одногидовой РНК (sgRNA), который соответствует указанному локусу и находится непосредственно перед сайтом распознавания Cas9. Изначально был выбран участок, содержащий последовательность **РАМ** (protospacer adjacent motif, мотив последовательности: NGG), необходимый для связывания sgRNA с целевой мат-

рицей. После участка РАМ 20 нуклеотидов были использованы для таргетирования sgRNA. Общая схема получения делеции представлена на рис. 1,б.

На первом этапе мы трансформировали штамм *S. aureus* RN4220 вектором pCN-EF2132tet для получения рекомбинирующих компетентных клеток, а затем вводили донорный олигонуклеотид (90 пн) одновременно с вектором контрselection. Последовательность донорного олигонуклеотида, используемого для геномного редактирования (четыре нуклеотида с 5'-конца модифицированы фосфотиоатом), представлена ниже.

5'-CAAGTTGCAATTAAAGTATTAATGGTAATGTGCGTTTCTATGGC
GTCATTATCATGGGACATAAACGTCCTGACTTAGATGCAATTGGTGC-3'

Только клетки, подвергающиеся успешной рекомбинации, обладают иммунитетом к летальным двухцепочечным разрывам ДНК, индуцированным контрselectивной плазмидой. Температура роста клеток может быть впоследствии повышена, что приводит к потере векторной системы [5].

Мы проанализировали нуклеотидную последовательность гена *gdpP* *S. aureus* и выбрали последовательность направляющей РНК и участка РАМ так, чтобы двуниевый разрыв находился в пределах участка, кодирующего 308–337 аминокислоты (рис. 1,в). Выбранную последовательность длиной 20 пн мы встроили в плазмиду pCAS9counter таким образом, чтобы она экспрессировалась в составе направляющей РНК. Для этого использовали частично комплементарные фосфорилированные олигонуклеотиды, которые образовывали дуплекс с выступающими однониевыми концами, необходимыми для встраивания в вектор pCAS9counter по сайту рестрикции рестриктазы *BsaI*. Последовательности праймеров приведены ниже:

5'-P-AGCTCTGACTTTGTCCACCTCTGCAG-3'OH
HO3'-GACTGAAACAGTGGGAGACGTCAAAA-P5'.

Олигонуклеотидный дуплекс встраивали в вектор pCAS9counter по сайту рестрикции *BsaI*. Наличие вставки спейсера подтверждали с помощью секвенирования с использованием праймера:

5'-CGGTGCCACTTTTTCAAGTT-3'.

Плазида со вставкой спейсера, обозначенная как pCAS9counter-gdpP, была взята для дальнейших экспериментов.

Были получены электрокомпетентные клетки *S. aureus* штамма RN4220, которые были на

первом этапе трансформированы плазмидой pCN-EF2132tet, после чего были получены электрокомпетентные клетки *S. aureus*, несущие данную плазмиду. Они были трансформированы плазмидой pCAS9counter, несущей спейсер. Для инициации рекомбинации и получения делеции участка, кодирующего 308–337 аминокислоты, был использован донорный олигонуклеотид, последовательность которого была приведена ранее. После двух последовательных трансформаций плазмидами pCN-EF2132tet и pCAS9counter-gdpP было отобрано 12 трансформантов. Клетки трансформантов пассировали при 42°C в течение 18 ч для элиминации плазмид pCN-EF2132tet и pCAS9counter-gdpP. Потерю плазмид оценивали по отсутствию роста на селективных средах с антибиотиками эритромицином и хлорамфениколом. Для подтверждения наличия целевой делеции было проведено секвенирование по Сэнгеру с праймерами, фланкирующими область делеции. Один из 12 клонов содержал целевую делецию в гене *gdpP*.

Проверка мутантного фенотипа включала следующие фенотипические характеристики: культурально-морфологические параметры, определение чувствительности к антибиотикам и оценка скорости роста. Определение чувствительности к антибиотикам проводили методом серийных разведений в бульоне Мюллера–Хинтона с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК). Оценку скорости роста осуществляли при измерении оптической плотности (при длине волны 600 нм) с интервалом 10 мин в сердечно-мозговом бульоне при культивировании в течение 15 ч в планшетном шейкер-инкубаторе. Оценку результатов кривых роста проводили в программе R

с помощью пакета Growthcurver [11]. Мутантный штамм не отличался по культуральным, морфологическим характеристикам при оценке роста на кровяном агаре. Через 24 ч он давал характерные беловато-серые колонии диаметром 3–5 мм (при культивировании более 48 ч, колонии приобретали умеренно желтоватый цвет). Скорость роста не изменялась, так время удвоения клеток составляло 28.2 ± 3 мин, по сравнению с контрольным штаммом без делеции в *gdpP* – 27.8 ± 2 мин ($p = 0.123$). ЛАГ-фаза роста также не изменялась и была одинаковой как для контрольного штамма, так и мутантного (160.5 ± 3 мин). Общая скорость роста (r) составляла 0.03 мин^{-1} для обоих штаммов. Не было выявлено изменений в чувствительности к разным антибиотикам. Так, уровень МПК к бета-лактамам антибиотикам: пенициллину, цефокситину, оксациллину, амоксициллину, меропенему, не превышал 0.25–1 мкг/мл для обоих штаммов. МПК гликопептидных и липогликопептидных антибиотиков также не изменялась. Эти данные свидетельствуют о том, что привнесенная делеция в *gdpP* не влияет на чувствительность к антибиотикам, действующим на клеточную стенку. Также не было обнаружено изменения чувствительности к антибиотикам других групп: макролидам, линкозамидам, аминогликозидам, оксазолидинонам и даптомицину.

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. Делеция в линкерном участке между доменами GGDEF и DHH/DHHA1 белка GdpP не влияет на фенотип и чувствительность к антибиотикам у *S. aureus*.

Исследование поддержано грантом Российской государственной научной фонды 18-75-10114-П.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tong S.Y., Davis J.S., Eichenberger E. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management // Clin. Microbiol. Rev. 2015. V. 28. № 3. P. 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
2. Monk I.R., Foster T.J. Genetic manipulation of *Staphylococcus*-breaking through the barrier // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2012. V. 2:49. P. 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00049>
3. Kreiswirth B.N., Lofdahl S., Betley M.J. et al. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage // Nature. 1983. V. 305. № 5936. P. 709–712. <https://doi.org/10.1038/305709a0>
4. Chen W., Zhang Y., Yeo W.S. et al. Rapid and efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. № 10. P. 3790–3795. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b13317>
5. Penewit K., Holmes E.A., McLean K. et al. Efficient and scalable precision genome editing in *Staphylococcus aureus* through conditional recombineering and CRISPR/Cas9-mediated counterselection // mBio. 2018. V. 9. № 1. <https://doi.org/10.1128/mBio.00067-18>
6. Liu Q., Jiang Y., Shao L. et al. CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* // Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai). 2017. V. 49. № 9. P. 764–770. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx074>
7. Yin W., Cai X., Ma H. et al. A decade of research on the second messenger c-di-AMP // FEMS Microbiol. Rev. 2020. V. 44. № 6. P. 701–724. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa019>
8. Zarrella T.M., Bai G. The many roles of the bacterial second messenger cyclic di-AMP in adapting to stress cues // J. Bacteriol. 2020. V. 203. № 1. <https://doi.org/10.1128/JB.00348-20>
9. Gostev V., Sopova J., Kalinogorskaya O. et al. In vitro cef-taroline resistance selection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involves different genetic pathways // Microb. Drug. Resist. 2019. V. 25. № 10. P. 1401–1409. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0130>
10. Gostev V., Kalinogorskaya O., Ivanova K. et al. In vitro selection of high-level beta-lactam resistance in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* // Antibiotics (Basel). 2021. V. 10. № 6. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060637>
11. Sprouffske K., Wagner A. Growthcurver: An R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves // BMC Bioinformatics. 2016. V. 17. № 172. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1016-7>

The Influence of Deletion in the Non-Catalytic Domain of GdpP Mediated by Genome Editing with CRISPR/Cas9 on the Phenotype of *Staphylococcus aureus*

Yu. V. Sopova^{a, b, *}, M. E. Velizhanina^{a, c}, D. A. Kandina^{a, d}, V. V. Gostev^{e, f}, P. S. Chulkova^e, O. S. Sulian^e, and S. V. Sidorenko^{e, f}

^aSaint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

^bSt. Petersburg Branch of the Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 198504 Russia

^cAll-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Pushkin, 196608 Russia

^dPushkin Leningrad State University, Pushkin, 196605 Russia

^ePediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, 197022 Russia

^fMechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, 195067 Russia

*e-mail: y.sopova@spbu.ru

The high cellular level of cyclic di-adenosine monophosphate (c-di-AMP), which in turn results in resistance to cell-wall targeted antibiotics in *Staphylococcus aureus*. An increase in intracellular molecules of c-di-AMP is due to mutations in the DHH/DHHA1 domain of the GdpP protein. The influence of mutations in the other domains of GdpP has not been fully studied. The aim of this study was to obtain a targeted non-frame-shifting deletion in the GdpP protein's linker region between the GGDEF and DHH/DHHA1 domains. Restriction-modification deficient strain *S. aureus* RN4220 was used for genome editing. Two vectors with thermosensitive origins of replication were used. The first pCN-EF2132tet vector contained the *Enterococcus faecalis* EF2132 recombinase gene; the second pCAS9counter vector contained the *Streptococcus pyogenes* RNA-directed Cas9 nuclease gene. The *S. aureus* RN4220 strain was transformed with the pCN-EF2132tet vector to obtain recombining competent cells, and then a donor oligonucleotide was introduced simultaneously with the counterselection vector. A recombinant strain with a target deletion (90 bp) in GdpP (amino acids 308–337) was obtained after two sequential transformations. The mutant strain showed no changes in the phenotype: lag phase, growth rate, doubling time, and colony morphology did not differ from the progenitor strain. Susceptibility to cell-wall targeted antibiotics was the same as in the progenitor strain. Thus, mutations in the linker region between the GGDEF and DHH/DHHA1 domains of the GdpP do not affect susceptibility to antibiotics in *S. aureus*.

Keywords: GdpP, *Staphylococcus aureus*, CRISPR/Cas9, genome editing.