

ВИКОРИСТАННЯ CRISPR/CAS9 ДЛЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО АНАЛІЗУ ГЕНІВ *TRYPANOSOMA CRUZI*

К.А. Коваленко¹, І.О. Погоріла²

^{1,2}Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, проспект Берестейський, 34, Київ, 03057, Україна

Анотація. Система CRISPR/Cas9 стала важливим інструментом для дослідження генів у *Trypanosoma cruzi* – збудника хвороби Чагаса. У даній статті розглядається застосування CRISPR/Cas9 для вивчення генетичних механізмів, що забезпечують патогенез, резистентність до лікарських засобів *Trypanosoma cruzi* [1].

Ключові слова: CRISPR/Cas9, генетична інженерія, *Trypanosoma cruzi*, функціональний аналіз генів, нокаут генів, паразитологія.

Актуальність. *Trypanosoma cruzi*, збудник хвороби Чагаса, викликає інфекції, що можуть призводити до серйозних кардіологічних ускладнень [2]. Дослідження геному *T. cruzi* завжди було складним через його специфічну структуру та кількість генів. CRISPR/Cas9 забезпечила нові можливості для модифікації генів цього паразита, дозволяючи не тільки ідентифікувати ключові гени, що впливають на виживання та інвазію паразита, але й вивчати механізми стійкості до ліків [3].

Мета роботи. Основна мета – дослідження ефективності системи CRISPR/Cas9 для функціонального аналізу генів *Trypanosoma cruzi*. У роботі детально розглядаються можливості CRISPR/Cas9 для створення нокаутів генів, що дозволяє досліджувати роль конкретних генів у патогенезі, інвазії та лікарській стійкості паразита.

Основний зміст. Протист *Trypanosoma cruzi* є збудником хвороби Чагаса, найпоширенішого інфекційного захворювання в Америці, яке вражає до 20 мільйонів людей і величезну кількість тварин [4]. Дослідження *T. cruzi* і хвороби Чагаса ускладнюється через складність геному паразита та нестачу інструментів для маніпуляції, що ускладнює визначення їхньої ролі у виживанні паразита та патогенності. Окрім значної кількості генів, які не мають аналогів серед інших еукаріотів, геном *T. cruzi* містить величезну кількість генних сімей (англ. Gene families), деякі з яких налічують тисячі генів [5]. Найбільші з цих сімей включають гени, що кодують білки, подібні до транс-сіалідаз, муцинів та муцин-асоційованих білків, які експресуються на поверхні паразита і взаємодіють з хазяями та комахами, що виступають імунологічними мішенями. Хоча методи експресії екзогенних або надекспресії ендогенних генів, а також нокаут генів у *T. cruzi* виявилися корисними, вони залишаються трудомісткими і займають багато часу [6]. Наприклад, стратегія нокауту генів, що ґрунтується на гомологічній рекомбінації ДНК-касети, яка містить маркер для селекції з ліками, оточений приблизно 500 нуклеотидами кодуючих чи некодуючих ділянок цільового гена [7], має низьку ефективність. Цей підхід обмежується нокаутом лише одного алеля на маркер, що уповільнює процес

селекції, займаючи до місяця для кожного алеля. Створення нульових мутантів у *T. cruzi* загалом характеризується низькою ефективністю, а кількість доступних маркерів для селекції є обмеженою [8]. У порівнянні з цим, CRISPR/Cas9-редагування геному у *T. cruzi*, що використовує конститутивну експресію Cas9 разом зі sgRNA та донорним ДНК, показало успішність у створенні нокаутів генів і тегуванні ендогенних генів [9]. Проте цей метод також має недоліки, такі як тривалий час відбору стабільних нокаутних клітин і можливість виникнення позатаргетних ефектів [10]. Інші підходи, які передбачають використання *in vitro* транскрибованих sgRNA разом з Cas9, або через конститутивну експресію [11], або у вигляді RNP-комплексу [12], не підходять для масштабного редагування геному.

Інша стратегія CRISPR/T7RNAP/Cas9, спершу застосована для *Leishmania* та *T. brucei*, була адаптована для *T. cruzi* для тегування генів [13]. Вона зменшує ризик позатаргетних ефектів і сприяє масштабним дослідженням генів [14]. Основні відмінності цього дослідження полягають у використанні специфічного для *T. cruzi* вектора та трансфекції одним sgRNA, що дозволило швидше отримати мутантів із нокаутами генів і визначити важливі гени. Дослідження було зосереджене на генах TcCAMK, TcFLAM6 та TcCC2CP, і результати свідчать, що TcFLAM6 і TcCC2CP важливі для росту епімастигот *T. cruzi*. TcFLAM6 локалізується у джгутику та відіграє роль у функції джгутика, тоді як TcCC2CP, який містить домени зв'язування циклічних нуклеотидів і C2-домени, є необхідним для росту клітин [15]. Цей підхід CRISPR/T7RNAP/Cas9 без клонування може прискорити великомасштабний аналіз нокауту генів і зменшити ризик позатаргетних ефектів. Подальші дослідження TcFLAM6 і TcCC2CP допоможуть краще зрозуміти їхню роль у життєвому циклі *T. cruzi*.

Висновки. *Trypanosoma cruzi*, збудник хвороби Чагаса, є складним об'єктом для досліджень через його геном та обмеженість методів генетичних маніпуляцій. Класичні методи, такі як нокаут генів через гомологічну рекомбінацію, є малоефективними та потребують значного часу. Нові підходи на основі CRISPR/Cas9 дозволяють прискорити процес редагування геному, хоча існують певні недоліки, такі як позатаргетні ефекти. Застосування системи CRISPR/T7RNAP/Cas9 для *T. cruzi* показало кращі результати, дозволяючи швидше та ефективніше отримувати мутанти, що сприяє масштабним генетичним дослідженням.

Література

1. Mesías et al. (2019). Trypanothione synthetase confers growth, survival advantage and resistance to anti-protozoal drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radical Biology and Medicine*, 130, 23-34.
2. É & Menezes Falcão (2020). Chagas cardiomyopathy and heart failure: From epidemiology to treatment. *Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)*, 39(5), 279-289.

3. Minet et al. (2023). Recent advances in genome editing of bloodstream forms of *Trypanosoma congolense* using CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins: Proof of concept. *Experimental Parasitology*, 252, Article 108589. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108589>.
4. Santi et al. (2022). Disruption of multiple copies of the Prostaglandin F2alpha synthase gene affects oxidative stress response and infectivity in *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16(10), Article e0010845. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010845>.
5. Peng et al. (2014). CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *mBio*, 6(1), Article e02097-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02097-14>.
6. Lander et al. (2015). CRISPR/Cas9-induced disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 genes in *Trypanosoma cruzi* reveals their role in flagellar attachment. *mBio*, 6(4), Article e01012-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01012-15>.
7. Costa et al. (2018). Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. PMCID: PMC5897030; PMID: 29608569.
8. Kolev et al. (2011). RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. *Eukaryotic Cell*, 10(9), 1156-1163. <https://doi.org/10.1128/EC.05114-11>.
9. Chiurillo et al. (2021). Drug target validation of the Protein Kinase AEK1, essential for proliferation, host cell invasion, and intracellular replication of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Microbiology Spectrum*, 9(2), Article e0073821. PMID: 34585973; PMCID: PMC8557885.
10. Park et al. (2022). A dual conditional CRISPR-Cas9 system to activate gene editing and reduce off-target effects in human stem cells. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 28, 656-669. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.04.013>. PMID: 35615005; PMCID: PMC9112054.
11. Marcelino et al. (2023). Identification of inhibitors for the transmembrane *Trypanosoma cruzi* eIF2 α kinase relevant for parasite proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 299(7), 104857. PMID: 37230387; PMCID: PMC10300260.
12. Saenz-Garcia et al. (2022). Trypanin disruption affects the motility and infectivity of the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, Article 807236. PMID: 35071054; PMCID: PMC8777028.
13. Rosón et al. (2022). H2B.V demarcates divergent strand-switch regions, some tDNA loci, and genome compartments in *Trypanosoma cruzi* and affects parasite differentiation and host cell invasion. *PLOS Pathogens*, 18(2), Article e1009694. PMID: 35180281; PMCID: PMC8893665.
14. Baker et al. (2021). Systematic functional analysis of *Leishmania* protein kinases identifies regulators of differentiation or survival. *Nature Communications*, 12(1), Article 1244, PMID: 33623024; PMCID: PMC7902614.
15. Chiurillo et al. (2023). Dual localization of receptor-type adenylate cyclases and cAMP response protein 3 unveils the presence of two putative signaling

microdomains in *Trypanosoma cruzi*. *mBio*, 14(4), Article e0106423. PMID: 37477489; PMCID: PMC10470820.