



Отговорът на CRISPR на антибиотичната резистентност

Научна информация

Бързата поява на резистентни към антибиотици бактерии и сравнително ограниченото развитие на нови антибактериални молекули представляват **сериозна заплаха за съвременната медицина**, като е застрашена способността да се лекуват и предотвратят инфекции. **Прекомерната употреба на антибиотици** както при животните, така и при хората улесни появата на мултирезистентни (MDR) бактерии. Освен това много антибиотици нямат специфичност, безразборно убиват патогенни и непатогенни бактерии и допринасят за трудното лечение на обикновени инфекции. Това подчертава **критичната необходимост от нови терапевтични средства**, които заобикалят съществуващите механизми на лекарствена резистентност, като същевременно добавят по-висока специфичност. За постигането на тази цел се проучват **CRISPR/Cas системите** (*clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat*, което означава – групирани, равномерно разпределени, кратки палиндромни повторения, свързани с CRISPR протеинови системи) като **възможни нови антимикробни средства** с механизъм за насочване на антибиотиците по последователността на бактериални геноми и/или гени за резистентност. Тези обещаващи целеви терапии са във фокуса на синтетичните биологични компании като *Locus Biosciences, Intellia Therapeutics* и *Eligo Bioscience*. Въпреки че тези технологии са предимно в предклинична фаза, основната цел е да се осигури създаването на прецизни антимикробни средства за инфекциозните заболявания.

Много преди **CRISPR** да стане „суперзвезда“, която редактира генома, тя е изиграла **важна роля в защитата на бактериите от атаката на бактериофагите**. Сега изследователите го връщат – заедно с новия си набор от умения – обратно към бактериите, за да решат нарастващия проблем с антибиотичната резистентност и да предложат реалистични средства за отглеждането на микробиоми. Изследователите пренасочват бактериални CRISPR системи, за да атакуват собствените хромозоми на гостоприемника.

През последните пет години системата **CRISPR-Cas** придоби сериозна слава, тъй като изследователите я превърнаха в **мощен и прецизен инструмент за редактиране на генома**. От въвеждането си от *Jennifer Doudna* и *Emmanuelle Charpentier* през 2012 г., **редактирането на гени CRISPR възстанови надеждата за генна терапия**, разшири способността да се създават животински модели на човешко заболяване, показва **обещаващо лечение на вирусните инфекции** и предостави **опростени инструменти за редактиране на гени**.

Невинаги е било ясно обаче, че CRISPR ще стане такава иновативна „суперзвезда“. Всъщност, тя води началото си като защитен механизъм при бактериите от нахлуващи фаги. „Спомням си, че за първи път научих за CRISPR преди седем години,

когато малко беше известно за основните му механизми, да не говорим за биотехнологичния му потенциал. *Беше поразителен начина, по който системата успя да направи разграничение между себе си и себе си и колко лесно би било системата да се насочи към бактериалния геном, сякаш е чужд генетичен материал*“, е казал *Chase Beisel* от Държавния университет в Северна Каролина.

Изследователите, които са познавали CRISPR, преди да стане супер известен инструмент, изменят първоначалната му функция, като я използват, за да убиват бактериите, вместо да ги защитават. Подходът изглежда **обещаващ инструмент в борбата срещу антибиотичната резистентност** и предлага по-голяма прецизност от терапията с пробиотици за промяна на човешкия микробиом с цел подобряване на здравния статус.

Rodolphe Barrangou, също от Държавния университет в Северна Каролина, е работил с CRISPR повече от десетилетие и работата му е свързана с тестване на CRISPR за рязане на различни последователности, но когато са били насочени към бактериалната хромозома, повечето от клетките са умрели. **"Смъртта е основният резултат; редактирането е страничен ефект, а не обратното – тъй като възстановяването на ДНК не е толкова напреднало при бактериите, както при еукариотите. След това осъзнахме, че можем да използваме самонасочването, за да убиваме, а не да редактираме бактерии."** е публикувано в научните му трудове. Когато бактериофагът инвазира археите или бактериите, системата CRISPR съхранява части от фаговата ДНК като вид имунна памет. След това клетката може да транскрибира РНК от съхранената последователност, да я свърже с ензима Cas и да настрои дуото да наблюдава клетката за съвпадащи нашественици. Когато РНК открие съвпадение, Cas разрязва фаговото ДНК, предотвратявайки възпроизвеждането му. Екипът на *Barrangou* работи върху тезата, че ако могат да **доставят специфични РНК в бактериите, те биха могли да провокират гостоприемниковата CRISPR система да елиминира плазмидите, носещи гени за антибиотична резистентност, да предотврати разпространението им или дори да разреже собствената хромозома на клетката, избирателно елиминирайки някои бактерии от популацията.** През 2014 г. екипът на *Barrangou* и *Beisel* предоставят доказателство за този принцип в списанието *mBio*, където те показват, че **могат да предизвикат клетъчна смърт или с гостоприемникови CRISPR системи, или чрез импортиране на компонентите на CRISPR в клетките, и че клетъчната смърт настъпва независимо от това къде в генома са били насочени системите.** Техният подход им дава възможност специално да елиминират определени бактерии от смесени култури и да управляват нивото на клетъчна смърт. С тези резултати екипът показва **потенциала за разработване на този метод, основан на CRISPR, като нов клас антибиотици.**

"Красотата на CRISPR досега е, че той може да атакува и убива резистентни към антибиотици бактерии толкова лесно, колкото чувствителните към антибиотици бактерии. Другата полза е, че CRISPR може да бъде насочен само към патогените, потенциално запазвайки местните бактерии и техните ползи за здравето", подчертава *Beisel*.

За да внедрят тази **система CRISPR като антибиотик**, изследователите са въвели няколко различни възможности за доставка, като **бактериофагите** показват **най-обещаващ потенциал**. Предизвикателството при бактериофагите обаче е, че те са много

сложни „системи“, които не са основно проучени. В много отношения все още учените залагат на изучаване на бактериофагите и как могат те да бъдат модифицирани, за да опаковат надеждно целевия ДНК фрагмент, представляващ интерес и да го доставят на определена бактериална популация. Екипът на *Beisel* работи по модифициране на бактериофаговите въси, които разпознават и свързват прицелните бактерии, за да разширят обхвата на потенциалните бактериални цели за CRISPR антибиотиците.

Много литични бактериофаги имат вродени микробицидни и антивирусни свойства, които *Dave Ousterout* от университета Дюк планира да вземе предвид и да използва за създаването на антибиотици, базирани на CRISPR, за да повиши терапевтичната ефикасност. Докато литичните фаги могат да убиват клетките сами и да имат отлични профили за безопасност, те трябва да се размножават в рамките на клетката гостоприемник, за да упражняват своя ефект и да имат ограничен обхват на гостоприемника, който признак не е лесен за промяна. Зареждането им с CRISPR заобикаля необходимостта от репликация, за да убие клетката, и избягва регулаторни опасения, които произтичат от използването на размножаващ се и потенциално мутиращ фаг. „С CRISPR-въоръжени фаги, тези терапии могат да бъдат разработени и оптимизирани срещу по-традиционни фармакокинетични параметри, като персистиране, време и продължителност на инфекцията, концентрация на частици мястото на инфекцията“, е обяснил в научните си доклади *Ousterout*.

Докато CRISPR, пренасян във фаги, изглежда идеален за лечение на бактериални инфекции, всички антимикуробни агенти оказват силен селективен натиск, повишавайки възможността бактериите да развият резистентност. Поради гъвкавостта на CRISPR системите, изследователите могат да продължат да изпреварват естествено възникващите промени в тези системи и бързо да преработят новите поколения антибиотици, базирани на CRISPR, за да надхитрят бактериалната еволюция.

„Ние сме силно уверени, че CRISPR-Cas3, поради способността си да се насочва едновременно към много сайтове в генома, може да избегне потенциални механизми за съпротива“ е доказал *Ousterout*. За убиване на клетки, Cas3 е по-добър вариант от Cas9, който обикновено се използва в задачи за редактиране на генома; CRISPR Cas9 създава двойни скъсвания, които клетките могат да поправят, докато **разцепването на Cas3 в генома е необратимо**. „Нашият подход за разработване на подходящи бактериофагови вектори зависи от използването на коктейл от фаги, които атакуват бактериите по различни начини. Взети заедно, тези подходи ще смекчат шансовете за бърза съпротива и придобиване на резистентност.“ е посочил екипът на *Ousterout*.

Въпреки че разработването на нов клас антибиотици е основен приоритет за човешкото и животинското здраве, тази технология може да се разпростре далеч отвъд терапията и лечението на бактериални инфекции. През последните години микробиомът стана почти толкова „интересен“, колкото самия CRISPR, и доказва, че влияе на човешкото здраве по изненадващи начини – от метаболизма, сърдечната функция и болката до невродегенерацията и психичното здраве. Много изследователи виждат потенциала на CRISPR за промяна на микробиома с цел подобряване на здравето и са готови да разработят начини за това. Фекалните трансплантации и пробиотици се оказаха полезни в ограничени случаи и лечението е с временен характер, тъй като селективният натиск вероятно ще върне бактериалната популация обратно към

първоначалния си баланс. „Тази CRISPR технология има потенциала да даде възможност за високо селективно отстраняване на избрани видове в сложни полимикробни съобщества като човешкия или животинския микробиом“, върху което работи Ousterout и екипът му.

Това ниво на прецизност улеснява много по-задълбочените изследвания на микробните съобщества, тъй като отделните микробни членове могат да бъдат елиминирани селективно, за да се определи тяхната роля в общата бактериална популация. Тези системи също така предлагат реалистичен механизъм за микробно „земеделие“ – избирателно култивиране на здрави микробиоми.

Barrangou, Beisel, Ousterout и екипите им наскоро са основали Locus BioSciences (<https://www.locus-bio.com/technology/>) за разработване на антимикробни средства с тесен спектър за справяне с огнищата на резистентни към антибиотици бактериални инфекции. В момента компанията разработва бактериофаг доставяна CRISPR система за елиминиране на *C. difficile*, без да се увреждат други чревни микроорганизми. "Смятаме, че това ще позволи възстановяването на нормалния микробиом и ще осигури защита срещу персистиращи инфекции, причинени от *C. Difficile*. С това доказателство за ефикасност за ново антимикробно средство с тесен спектър Locus BioSciences ще премине към прилагане на тази технология към други бактерии в микробиома, които могат да причинят различни заболявания при хората и животните, като колит, диабет и потенциално дори неврологични разстройства.“ е казал Ousterout.

Barrangou и екип са представили на конференция за CRISPR през 2017 г. в Big Sky, Монтана, че новото CRISPR антимикробно лекарство действа и се толерира добре при смъртоносни инфекции и при определени животински модели.

Повече информация за проучванията на Barrangou, Beisel и Ousterout може да бъде намерено на следните линкове:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28888103/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29902258/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7064742/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20056882/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28581505/>

<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0516-x>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24473129/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25326321/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30156038/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30175907/>

<https://crisprmedicineneeds.com/news/promising-data-from-first-ever-crispr-phage-therapy-trial/>

<https://insights.bio/immuno-oncology-insights/journal/article/425/repurposing-crispr-cas-systems-as-dna-based-smart-antimicrobials>

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.00928-13?permanently=true&>

Специфично за последователността насочване от CRISPR/Cas

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

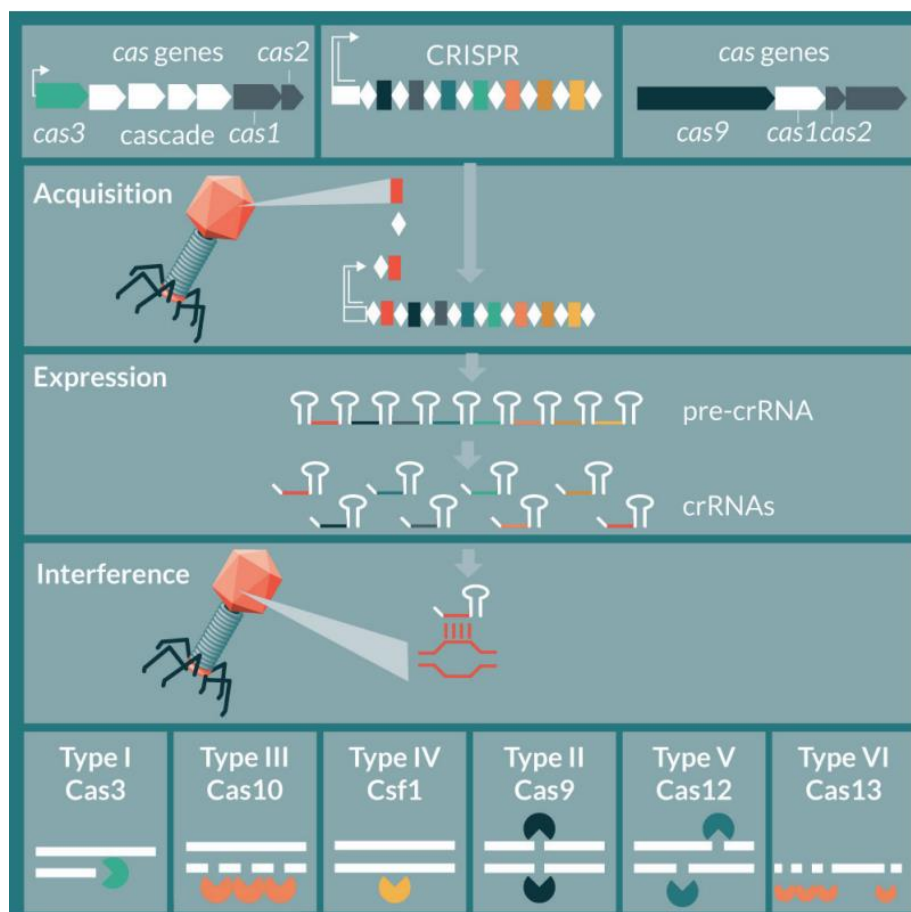
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



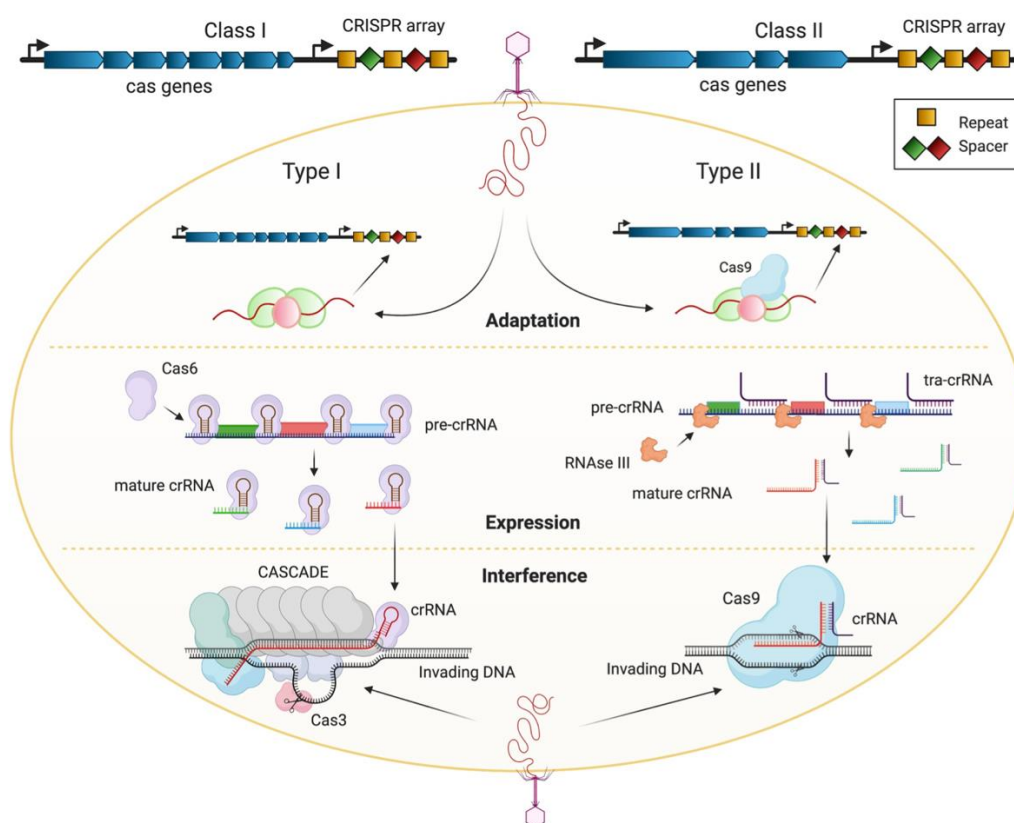
В проучването си, *Dennise Palacios Arayan, Kelli L. Palmern, Breck A. Duerkop* на тема „*CRISPR-based antimicrobials to obstruct antibiotic-resistant and pathogenic bacteria*“ доказват още веднъж, че **CRISPR/Cas системите са адаптивни защитни механизми срещу мобилни генетични елементи (MGE)**. Основен отличителен белег на тези системи е масивът CRISPR, локус в генома, състоящ се от уникални спейсърни елементи, редувани от еднакви повторения. Ефекторните протеини функционират като интерференционни молекули за заглушаване на чужди генетични елементи. По време на адаптацията някои типове CRISPR интегрират кратък фрагмент от чужда ДНК в масива CRISPR, като по този начин **осигуряват генетична памет за инвазия на MGE**, наричана спейсър (Фиг. 1). Транскрипцията на CRISPR масива дава прекурсорни CRISPR РНК (pre-crRNAs), които са ензимно обработени в зрели crRNAs (Фиг. 1). При инвазия на бактерии от MGE с комплементарна последователност, crRNAs насочват ефекторните протеини към тези мишени за ензимно разцепване, като в крайна сметка причиняват специфично за последователността елиминиране на нахлуващата молекула (Фиг. 1).

Системите **CRISPR/Cas са групирани в 2 класа** и допълнително класифицирани в 6 подтипа (I-VI). Типове I, III и IV използват протеинови комплекси с няколко вида за интерференция, докато типове II, V и VI използват единичен ефекторен протеин.



Фиг. 1.1: Групи CRISPR/Cas системи и механизмът им на действие

CRISPR/Cas системи тип I използват водещ, свързан с РНК субединичен комплекс, наречен „CRISPR-асоцииран комплекс за антивирусна защита (*Cascade*)“, в комбинация с ефекторна нуклеаза, Cas3. Създадения водещ РНК:ДНК целеви комплекс стабилизира *Cascade*, позволявайки набирането на Cas3 и последващото екзонуклеазно разцепване на ДНК мишената (Фиг. 1). **Системите CRISPR/Cas тип II** кодират двойната РНК-управлявана ендонуклеаза, Cas9. Веднъж създаден crRNA, Cas9 разпознава и свързва комплементарната целева последователност чрез ДНК:сдвояване на база РНК. Ако допълнителното сдвояване на базата между crRNA и мишената е достатъчно, Cas9 генерира двуверижно ДНК скъсване в целевата последователност (Фиг. 1).



Фиг. 1.2: Принцип на действие на CRISPR/Cas имуниен отговор

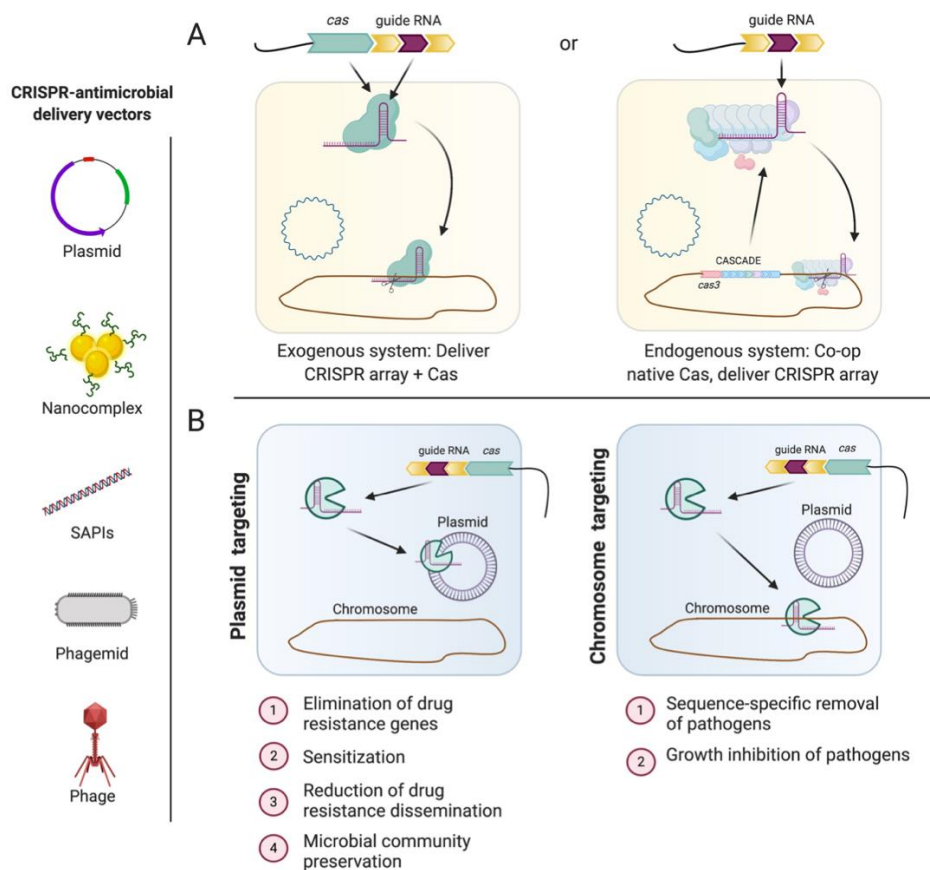
Докато системите CRISPR от тип I и тип II са най-широко използваните като CRISPR антимикуробни средства, тъй като са податливи на генетични модификации и механизмът им на действие е добре проучен, системата VI тип наскоро е предложена като алтернатива, тъй като инхибира растежа на бактериите при насочване към плазмид или хромозома.

CRISPR антимикуробни средства

Системите CRISPR/Cas могат да бъдат проектирани така, че да са насочени към почти всяка последователност от интерес, което е довело до революция в редактирането на генома. Системите CRISPR/Cas също са пренасочени като потенциални

антимикробни средства, където фокусът е **премахването на нежелани генетични белези при микроорганизмите**. За различни антимикробни средства, базирани на CRISPR, са предложени два **различни подхода**: „*co-opting*“ **ендогенни „естествени“ системи в бактерии за доставяне на самонасочени CRISPR масиви** или **доставяне на пълна екзогенна „чужда“ система за самонасочване към бактерии** (фиг. 2).

Ключова характеристика на CRISPR/Cas е неговата целева специфичност, която позволява да се **прави разлика между коменсални и патогенни бактерии**, както стана ясно и от проучванията на *Barrangou, Beisel, Ousterout*. Водещите РНК могат да бъдат проектирани така, че да се насочат към антибиотична резистентност, вирулентност или основни гени, специфични за патогените. В зависимост от експерименталния дизайн, **целевите резултати включват клетъчна смърт или инхибиране на растежа на прицелната бактерия, целенасочено изтриване на гени от патогени, загуба на подвижни елементи, като плазмиди с антибиотична резистентност, или транскрипционна репресия на прицелен ген(и)** (фиг. 2). Разположението на целевата последователност (хромозома или плазмид) и дали мишената кодира съществена функция са критични фактори. За разлика от еукариотните геноми, които толерират разцепването на CRISPR/Cas9 чрез инициране на механизми за възстановяване, разцепването на бактериални хромозоми на всяко място обикновено е смъртоносно. Освен това, други проучвания показват **сенсублизация на резистентни към лекарства патогени чрез директно насочване към плазмиди, съдържащи гени за резистентност към антибиотици**. Тази стратегия води до „*plasmid curing*“ („*plasmid curing*“ е процес на премахване на кодираните от плазмидата характеристики и белези като антибиотична резистентност, вирулентност, разграждане на ароматни съединения и др. в бактериите) като по този начин **намалява разпространението на резистентни на антибиотици бактерии**. Изследователите също са използвали **каталитично неактивен Cas9 (dCas9) за потискане на транскрипцията на гена на резистентност към метицилин *mecA* в *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli***. Разнообразието от тези приложения показва колко **ценни могат да бъдат CRISPR/Cas системите в борбата с бързо появяващите се MDR бактерии**.



Фиг. 2: Стратегии за разработване на антимикробни средства на базата на CRISPR

CRISPR антимикробни средства за достигане на бактериална клетъчна смърт

Новаторската работа на *Edgar* и *Qimron* е довела до първите открития за това как способностите за самонасочване могат да бъдат проектирани в системата CRISPR/Cas. Тези учени модифицират системата CRISPR от *E. coli* тип I-E, за да се насочат към **ендогенен профаг**, показвайки, че **98% от целевите бактерии са убити**. Съвсем наскоро естествената система I-B CRISPR/Cas3 на *Clostridioides difficile* е предназначена за **самонасочване**, използвайки **рекомбинантен бактериофаг** за доставяне на CRISPR, **насочен към хромозомите**. Сравнявайки ефективността на убиване на бактериофагите *C. difficile* с или без полезен товар CRISPR, демонстрират, че **добавянето на самонасочващ се CRISPR подобрява убиването на бактерии in vitro**. Използвайки миши модел на чревна инфекция с *C. difficile*, вегетативният **брой на C. difficile е намален приблизително 10 пъти**, когато мишките са изследвани с CRISPR-усилени бактериофаги. Модифицирани екзогенни CRISPR/Cas системи също са внедрени за специфично за последователността убиване на бактерии. Например, **конструиран тип II CRISPR/Cas9 на Streptococcus pyogenes е успешно използван за насочване към хромозомно кодирани гени на резистентност към антибиотици в E. coli и S. aureus**, причинявайки клетъчна смърт в култури *in vitro*, както и в модели *in vivo* (Фиг. 2).

Докато тези проучвания постигат намалена бактериална тежест, използвайки конструирани системи за насочване на генома на CRISPR/Cas, все пак се съобщава за

появата на мутанти, които избягват клетъчната смърт. Например, някои проучвания описват рекомбинация и делеции, които водят до инактивиране на локусите на CRISPR и елиминиране на *cas* гени и целеви последователности. Това повдига важния въпрос дали антимикуробните средства CRISPR ще срещнат подобна съдба, когато се използват *in vivo* за лечение на бактериални инфекции. За разлика от антибиотиците, които могат да причинят дисбиоза и да подхранват разпространението на резистентни бактерии, CRISPR антимикуробните лекарства убиват само малка част от бактериалната популация, което вероятно позволява на други членове на микробната общност да заемат нишата и да ограничат растежа на устойчиви на CRISPR бактерии. Към днешна дата нито едно проучване *in vivo* не е тествало напълно тази хипотеза и данни. Освен това са предложени някои контрамерки за борба с антимикуробното „бягство“ на CRISPR от патогени. Например, редуцията на масива CRISPR до единично спейсърно повторение може да предотврати рекомбинация между повторения и последващо заличаване на спейсър, а свръхекспресията на *cas9* е показана в *Enterococcus faecalis* за увеличаване на смъртността от самонасочване на CRISPR.

CRISPR антимикуробни средства за атакуване на резистентни плазмиди

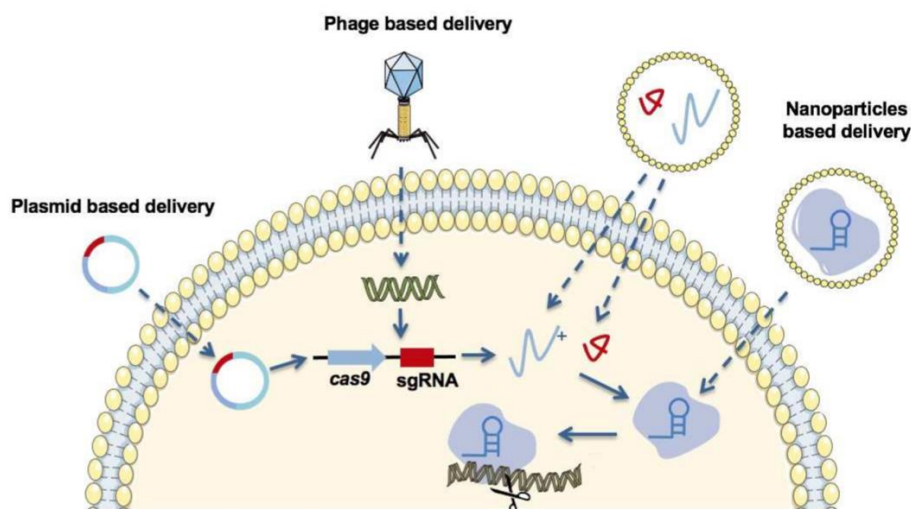
Плазмидите са привлекателни мишени за елиминиране на гени за лекарствена резистентност (Фиг. 3). Пионерските проучвания са използвали конструиран CRISPR/Cas9 за насочване към антибиотично резистентни плазмиди, демонстриращи, че тяхното насочване не води до смърт на бактериални клетки, а по-скоро до чувствителност към антибиотици чрез загуба на плазмид. За да се подобри общата ефикасност, могат да се прилагат подходи като прилагане на положителна селекция за клетки, чувствителни към антибиотици. Например, скорошно проучване използва плазмид, кодиращ бактериоцин, rPD1, за доставяне на CRISPR/Cas9, програмиран да се насочи към гените за резистентност към антибиотици в *E. faecalis*. Поемането на конструирания плазмид от резистентни на антибиотици бактерии-реципиенти води до загуба на целеви резистентни плазмиди, като същевременно осигурява имунитет срещу бактериоцина. Реципиентните клетки, които не са получили конструирания плазмид, са убити от бактериоцина, като по този начин косвено се селектират клетки, които нямат антибиотична резистентност.

Гените за резистентност към антибиотици обикновено се кодират върху самопреносими плазмиди, присъстващи в много копия. За да се определи дали CRISPR/Cas може да унищожи всички плазмидни копия, Tagliaferri и колегите му използват системата CRISPR/Cas9 за насочване към ген на β -лактамаза в щамовете на *E. coli*, съдържащи плазмиди с голям или малък брой копия. Наблюдава се пълно унищожаване на плазмидите с нисък брой копия, но не и на плазмидите с голям брой копия. Важно е, че това проучване подчертава предизвикателствата, поставени от насочването към плазмиди с висок брой копия, и необходимостта от оптимизиране на системата, за да се изчистят напълно гените за антибиотична резистентност, кодирани от тези видове плазмиди.

Въпреки че има много предимства при използването на CRISPR/Cas системи за „*plasmid curing*“, стратегията има ограничения. **Насочването към плазмид** може да **селектира нежелани събития на рекомбинация** в целевия регион. В много случаи гените за резистентност към антибиотици са фланкирани от транспозази или рекомбинази; по този начин директното насочване към тези гени с цел елиминиране на плазмиди не се препоръчва поради **допълнителния риск от селекция на нови варианти на плазмид или за преместване на резистентната касета в хромозомата**. Освен това, така наречените „плазмидни адиктивни системи“ (Тези така наречени „системи за „пристрастяване“ към плазмиди“ изискват дялящи се клетки, за да задържат плазмидите - ако клетката не наследи плазмид поради неправилно разделяне, тя все пак ще наследи някои характеристики за токсини и антитоксини. Въпреки това, антитоксинът ще бъде разграден, оставяйки клетката да бъде убита от по-устойчивия токсин.), като токсин/антитоксини, кодирани от целевия плазмид, могат по невнимание да причинят **клетъчна смърт**.

Доставка на CRISPR антимикробни средства до целеви бактериални клетки: Подходи и съображения

Основно предизвикателство при внедряването на антимикробни средства CRISPR е необходимостта от разработване на стабилни системи за доставка.



Фиг. 3: Различни стратегии за доставка на CRISPR-Cas9 система за редактиране на гени. Доставка на базата на плазмиди: Системата CRISPR-Cas, пренасяна от плазмиди, може да бъде прехвърлена в клетки и транскрибирана в Cas9 mRNA и sgRNA. Cas9 mRNA се транслира в протеин Cas9, който образува рибонуклеопротеинов (RNP) комплекс със sgRNA. След това комплексът RNP редактира целевите гени, насочени от sgRNA. Доставка на базата на фаги: Кодиращите последователности на системата CRISPR-Cas се доставят чрез фаги в клетките. Доставка на базата на наночастици: Cas9 и sgRNA могат да бъдат доставени или под формата на mRNA или Cas9-sgRNA рибонуклеопротеинови комплекси (RNP) с помощта на наночастици.

Две ранни проучвания използват **фагови капсиди** като носители при доставката. Едната група конструира **фагемид на базата на умерения фаг phiNM1**, докато другата проектира **фагемидна система на базата на фага M13**. Много научни екипи използват този подход за **успешно доставяне на Cas9 и насочване на РНК, насочени към гени на вирулентност в *S. Aureus* или *E. coli***. Друг екип от учени е разширил тези проучвания, като проектира **фаг на умерено доставяне с увеличен обхват на гостоприемника, което е постигнато чрез диверсификация на протеина от власинките на фага**. Като алтернатива, други учени са предложили подходи за доставяне чрез вируси. **Подвижните острови на стафилококова патогенност (SAPI)** са адаптирани като **потенциални вектори**. Разработването на тези вектори се състои в **замяна на токсигенните гени на SAPI с товари CRISPR/Cas9**. Ефективността на SAPI антибактериалното средство е демонстрирана в миши модел на подкожна инфекция. **Ниската ефективност на опаковане на товари CRISPR/Cas и еволюцията на устойчивостта на фагите в целевите бактерии** представляват **предизвикателства за по-широкото използване на тези технологии**. За да се избегне ниската ефективност на опаковане, Kang и колегите му ефективно доставят **нанокомплекс от полимер-дериватизиран Cas9 и водеща РНК (Cr-нанокомплекс), предназначена да се насочи към гена на резистентност към метицилин mecA в *S. aureus***. Повече информация за нанокомплексите, използвани съвместно с CRISPR/Cas може да се намери в научния доклад на *Fen Wan, Mohamed S. Draz, Mengjie Gu, Wei Yu, Zhi Ruan* и *Qixia Luo* на тема: „*Novel Strategy to Combat Antibiotic Resistance: A Sight into the Combination of CRISPR/Cas9 and Nanoparticles*“.

И накрая, благодарение на техните гъвкави обхвати на гостоприемника, размер и кодиращ капацитет и независимост на клетъчния рецептор, **конюгативните плазмиди** представляват **атрактивна възможност за доставка на тези системи**. Въпреки това **ниската ефективност на конюгацията и рестрикционните системи, които блокират трансфера на плазмидата, остават значителни ограничения**.

Ефикасност на CRISPR антимикробни средства при модели на инфекция и колонизация

Развитието на CRISPR системите като селективни и титруеми антимикробни средства изисква **допълнително проучване за определяне на терапевтичната ефикасност**. Към днешна дата **само 9 проучвания** включват *in vivo* модели на **инфекция** или колонизация в техния експериментален дизайн за тестване на ефикасността на антимикробни средства на базата на CRISPR. **Само 2 от тези проучвания сравняват ефикасността на антимикробните средства CRISPR/Cas с традиционните антибиотици**. Използвайки модел на колонизация на миша кожа, едно проучване показва, че **насочването на CRISPR/Cas9 към *S. aureus* намалява колонизацията на кожата с *S. aureus* значително в сравнение с други методи на лечение**. За сравнение, лечението със системен стрептомицин „**обезврежда мишките напълно от стафилококи**“. Друго проучване показва, че **лечението с карбеницилин на *Galleria mellonella*, заразено с ентерохеморагична *E. coli*, е по-добро в сравнение с лечението с CRISPR антимикробно средство**. Въпреки че са необходими повече

данни, тези проучвания показват, че вместо да се използват CRISPR антимикробни средства като заместители на конвенционалните антибиотици, те могат да бъдат по-ефективно приложени в комбинираните терапии. Например, в двуетапен експеримент, ларвите на *G. mellonella*, инфектирани с *E. coli*, първо са третирани с CRISPR/Cas9, насочени към blaTEM-1, осигуряващ резистентност към бета-лактами, след това са третирани с цефтриаксон, което е довело до оцеляване на 70% от двойно третираните ларви в сравнение с 30% от ларвите, лекувани само с конвенционални антибиотици. В друг пример, CRISPR антимикробните средства могат да се използват за деколонизация на резистентни на антибиотици бактерии, а не за лечение на инфекции. Насочването на CRISPR към гените за резистентност към антибиотици между антибиотичните лечения може потенциално да намали разпространението на резистентни бактерии след употреба на антибиотик. Само 1 проучване се занимава с този въпрос, като използва миши модел на чревна колонизация на *E. faecalis*. Насочването на CRISPR/Cas9 към гена за резистентност към еритромицин на *E. faecalis* ermB значително намалява общото присъствие на резистентен на еритромицин *E. faecalis* в червата след лечение с антибиотици.

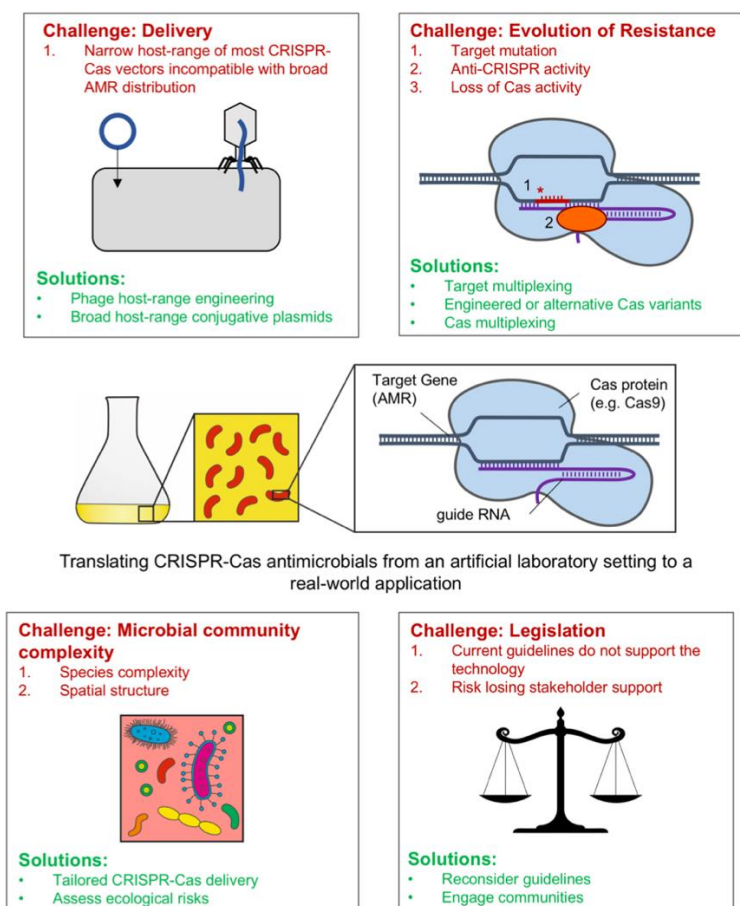
Изводи

Системите CRISPR-Cas са обещаващи инструменти за редактиране на гени за контролиране на разпространението на гени за резистентност към антибиотици сред бактериите и елиминиране на патогени с висока точност. Ефектите извън целта, високата цена, доставката до целта на тези системи, както и ефективността на доставката са основни предизвикателства в това отношение. Тези проблеми могат да бъдат преодолени чрез използването на наноматериали за доставката на системата CRISPR/Cas. Разработени са множество иновативни наночастици от полимери, липиди и злато. Въпреки че е постигнат огромен напредък в проектирането на тези наночастици за оптимизиране на ефекта от системата CRISPR-Cas, постигането на по-висока ефективност и по-безопасното доставяне на системата остава предизвикателство и са необходими допълнителни изследвания. Ефективното опаковане и локализирането на компонентите CRISPR-Cas са две основни пречки за прилагането на NP/CRISPR. За преодоляване на тези проблеми NP могат да бъдат адаптирани по различни начини. Други модификации, като проникващи в клетките пептиди и специфични клетъчни рецептори, могат да подобрят клетъчната интернализация и взаимодействието с целевите клетки. Имуногенността и ефектите извън редактирането също са притеснения относно *in vivo* приложенията. Интеграцията на наночастиците и системата CRISPR е все още в ранен етап. До успешното прилагане на конструирани наночастици и CRISPR-Cas системи за лечение на бактериални инфекции и контрол на разпространението на антимикробно резистентни бактерии предстои дълъг път.

Кризата на общественото здраве с антимикробната резистентност изисква нови подходи за борба с бактериалните инфекции. През последните 10 години системите CRISPR/Cas привличат внимание като програмируеми антимикробни средства, специфични за последователността, способни да се насочат към почти

всяка последователност от целеви специфични бактерии или вирулентни черти от популацията, като оставят микробиома непокътнат, характеристики, които липсват при конвенционалните антибиотици. Използвайки масив от различни методи за доставяне, като фаги и плазмиди, е доказано, че **CRISPR** антимикуробните средства са смъртоносни, когато са насочени към хромозомата. Освен това те могат да се използват за сенсibiliзиране на бактерии към конвенционални антибиотици чрез елиминиране на плазмиди, съдържащи гени за резистентност към антибиотици. Други потенциални приложения на **CRISPR/Cas**, като целенасочено изтриване на гени от патогени и потискане на генната експресия на антибиотична резистентност, трябва да бъдат допълнително изследвани.

Въпреки че това е обещаваща стратегия, са необходими повече проучвания, използващи *in vivo* модели, за да се установи терапевтичната ефикасност на тези антимикуробни средства в сравнение с традиционните антибиотици и да се определи дали инфекциите могат да бъдат лекувани само с **CRISPR** антимикуробни средства или ако те трябва да бъдат комбинирани с антибиотици за подобряване тяхната ефикасност. В допълнение, определянето на ролята, която те биха могли да играят за намаляване на разпространението на резистентност към антибиотици и разширяване на резистентни бактерии в червата след лечение с антибиотици, ще бъде от решаващо значение за пълно разбиране на потенциала на тези технологии.



Фиг. 4: Предизвикателства в прилагането на тези нови антимикуробни средства **CRISPR-Cas** като алтернативи на конвенционалното антибиотично лечение и

потенциални пътища за тяхното преодоляване. Показано е обобщение на пречките, свързани с използването на антимикробни средства на базата на CRISPR-Cas в сложни екологични популации от бактерии. Те включват осигуряване на ефективна доставка на конструкции (горе вляво), пътища на развитие на резистентност към тези нови антимикробни средства (горе вдясно), видово разнообразие и пространствена сложност на бактериалните общности (долу вляво) и несигурност в насоките за използване и подкрепата на заинтересованите страни (долу вдясно).

Предстоящи предизвикателства

Сложни микробни съобщества

Въпреки огромния потенциал на CRISPR-Cas очевидно неутрализирането на бактериите или повторната сенсибилизация на резистентните бактерии понастоящем е оценено само при колонизирани бактериални популации. **Използването на такъв подход в реална среда, където бактериите обикновено са в микробна общност, ще бъде по-голямо предизвикателство.** Естествените микробни общности, открити в човешки, животински и екологични микробиоми, съдържат милиарди клетки на грам матрица, състоящи се от хиляди видове. Дори в рамките на отделни видове или щамове клоналните родове могат да притежават различни плазмиди и други подвижни генетични елементи (MGE), носещи различни гени на резистентност. Количественият PCR и секвенирането от следващо поколение позволяват количествено определяне и характеризиране на бактериални гостоприемници, MGE и резистентни гени. Определянето на наличието на гени на резистентност от специфични бактериални гостоприемници в сложни общности изисква по-времеемки подходи като флуоресцентно активирано клетъчно сортиране на генетично маркирани бактерии и MGE преди друг вид анализи. Алтернативно, наскоро разработени методологии като ePicPCR и Meta3C могат да бъдат използвани за определяне на мобилни гени от специфични бактерии гостоприемници без нужда от култивиране.

Друго предизвикателство, свързано с микробните общности, е трудността да се предскажат реакциите в цялата общност на външна намеса. Въвеждането на антимикробни средства на базата на CRISPR-Cas може да има нежелани повтарящи се ефекти: Ако даден щам е отстранен от популация или неговият растеж или метаболизъм е повлиян от отстраняването на определен плазмид, това може да позволи на други, потенциално по-клинично проблемни видове, да надделеят. Например, добре е установено, че предизвиканите от стрес промени в състава на микробната общност и нивата на метаболитите са свързани с повишаване на чувствителността към инфекция с *Clostridium difficile* в червата, а промените във видовата структура на микробиома са свързани с човешки болестни състояния, включително диабет и парадонтит. Последниците от отстраняването на резистентни микроорганизми чрез CRISPR-Cas в различни микробни общности досега са неизвестни и тези рискове трябва да бъдат оценени.

Методи на доставяне и архитектура на CRISPR-Cas

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056

AMP гени присъстват и се разпространяват сред широк спектър от бактериални видове; те са често кодирани върху плазмиди, които се разпространяват чрез хоризонтален трансфер на гени през различни бактериални видове. Докато фагите могат да бъдат мощни вектори за доставка на CRISPR-Cas, **обхватът на гостоприемника на повечето видове фаги е тесен, което представлява очевидна бариера** за насочване към множество бактериални видове. Нещо повече, използването на този подход в пространствено структурирани и сложни микробиални общности ще осигури допълнително предизвикателство, тъй като **скоростта на среща между фагите и техните гостоприемни бактерии ще бъде намалена**. Предложени са **подходи за заобикаляне на тези предизвикателства**, като например **редактирани фаги** за разширяване на обхвата им на приемане; тази технология обаче остава на предварителен етап. Има и **други потенциални вектори за доставяне**, каквито са **конюгативните плазмиди**, които се прехвърлят между бактериите, но ограниченията като тесния обхват на гостоприемника, **барьерите за поемане и установяване на плазмид и ефективността на конюгирането остават**. И накрая, от **жизненоважно значение е да се разгледа ефикасността на различните системи CRISPR-Cas** при специфични гостоприемници, тъй като цитотоксичността е възпрепятствала ефективното използване на Cas9 при някои видове.

Развитие на резистентност срещу CRISPR-Cas

Друг въпрос е **развитието на резистентността към CRISPR-Cas**. В контекста на CRISPR-фаговите взаимодействия е известно, че **това се случва лесно чрез придобиване на точкови мутации в последователността**, насочена от CRISPR-Cas. По принцип това може да се случи и при резистентните гени, които са насочени за отстраняване, особено ако тези AMP гени са под положителна селекция (например, когато се използват антибиотици, на които AMP генът дава резистентност). Алтернативно, **резистентността може да се развие чрез инактивиране на CRISPR-Cas локуси чрез мутации или делеции в cas гени**, съществени за разцепването на мишени или чрез изтриване на насочващи спейсъри. Данните от проучвания на антимикробни средства, базирани на CRISPR-Cas9, предполагат, че е **много по-малко вероятно да се появят мутации на целеви последователности, отколкото доставянето на дефектни CRISPR системи**. Освен еволюцията на резистентността чрез мутация, резистентността може да се развие и **чрез подбор на анти-CRISPR (acr) гени**, които кодират малки протеини, които се свързват и инактивират критичните компоненти на имунната система CRISPR-Cas. В момента над 20 уникални семейства acr гени, които са насочени към двата типа I и II системи CRISPR-Cas са идентифицирани. Много от белтъчните семейства Acr, насочени към системи I тип CRISPR-Cas, са **идентифицирани във фаги**, инфектиращи *Pseudomonas aeruginosa*, както и **други видове в протеобактерии**. Въпреки че изглежда, че повечето от тези протеини Acr са специално насочени към един подтип CRISPR-Cas, е **идентифициран един Acr, който е насочен както към подтиповете тип I-E, така и към I-F CRISPR-Cas**, което предполага, че може да съществуват **по-широки диапазони на Acr**. Съвсем

наскоро бяха идентифицирани протеини Acr, които са целеви за системи тип II, които обхващат системите CRISPR-Cas9, използвани за редактиране на гени, единият от които е значително широкообхванат в целевия си диапазон. Голямото разнообразие от последователности и високата специфичност на Acr предполага, че те вероятно са повсеместни и вероятно се пренасят от MGE като фаги и плазмиди, за да заобиколят насочването чрез CRISPR-Cas. Както еволюционните последици от насочването на CRISPR-Cas към AMP гените, така и неговото въздействие върху популационната динамика изискват допълнителни проучвания, особено с включване на див тип микробни общности, за да се **разберат екологичните и еволюционните рискове на този подход.**

Законодателство и отговорно управление на антимикробни средства, базирани на CRISPR-Cas

При разработването на система CRISPR-Cas за премахване на AMP гените от бактериални общности в околната среда, използването на **тази технология ще се сблъска с редица законодателни и социални проблеми.** Вниманието и пълната оценка на рисковете при освобождаване или използване на системи за редактиране на гени в околната среда са от съществено значение. Предполага се, че **има нужда от актуализирани неправителствени насоки относно пускането на CRISPR-Cas и други конструкции за редактиране на гени, които могат да се използват за промяна на генетичния материал на популациите в околната среда, както и необходимостта националните и международните органи да разработят насоки и законодателство относно използването на тази нова технология.** В допълнение към техническите насоки, **ангажираността на общността е важна** както за получаване на съвети относно най-добрите практики, така и за оценка на подкрепата на обществеността и заинтересованите страни за използването на такива технологии.

Преодоляване на тези предизвикателства

Въпреки че пречките пред използването на CRISPR-Cas като инструмент за справяне с AMP са многобройни, **има потенциални решения за заобикаляне на някои от тези предизвикателства.** Най-належащият въпрос, пред който е изправено използването на CRISPR-Cas9-медирано премахване на AMP, е **намирането на подходящ вектор за доставяне,** който е съобразен с конкретната му цел. Например, фагово-медираното доставяне може да бъде метод на избор по време на остра инфекция. Въпреки това, дори щамове от един и същ бактериален вид обикновено варират по чувствителност към фаги и може да са желателни алтернативни доставчици. Докато тяхното разпространение в микробните общности е бавно, по-широкият обхват на гостоприемника на някои конюгативни плазмиди би ги направил подходящи кандидати за използване с пробиотици за защита срещу инвазия от бактерии, пренасящи AMP, или за отстраняване на микробиом-свързани резервоари на AMP. Въпреки че усилията, свързани с конюгиращите плазмиди, могат да ограничат разпространението им, те могат бързо да бъдат компенсирани от мутации както в бактериите-

гостоприемници и плазмидът, което би могло да бъде от полза за разпространението на плазмид, кодиращ CRISPR-Cas в общността. **Подобряването на тези персонализирани системи за доставка би било стъпка към справяне със предизвикателството на сложността на микробните общности**, ако може да бъде идентифициран или проектиран подходящ вектор с широк обхват на гостоприемника.

Непредсказуемите екологични реакции на микробната общност към разпространението на вектори за доставяне на CRISPR-Cas ще бъдат основна пречка за осъществимостта на използването на антимикробни средства CRISPR-Cas в реалния свят. Следователно екологичните последици от използването на CRISPR-Cas антимикробни средства в контекста на общността трябва да бъдат внимателно проучени чрез мониторинг на ефекта от отстраняването на AMP гените върху честотата на други бактериални видове и свързаните с тях плаزمиди.

Особено в контекста на дългосрочни приложения, еволюцията на резистентността изглежда почти неизбежна. Въпреки това, резистентността чрез мутация на целеви последователности потенциално може да бъде избегната чрез мултиплексен подход, което включва CRISPR-Cas насочване на множество последователности едновременно, за да се намали вероятността от резистентност. Лекотата, с която **CRISPR-Cas** (и по-специално CRISPR-Cas9) може да бъде препрограмизирана, означава, че **този метод може да бъде адаптиран според нуждите и остава осъществим.** Селекцията за **асг** гени може да бъде смекчена чрез използване на множество варианти на CRISPR-Cas едновременно, което би изисквало различни **Ascs**, за да избегнат насочването или проектирането на нечувствителни към **Asc** варианти на CRISPR-Cas. **Подход, използващ алтернативни на Cas9 нуклеази, като Cas12a**, може също да заобиколи всички проблеми с токсичността и ефикасността на системата при различни бактериални гостоприемници.

Бъдещи перспективи

Остават много препятствия, които трябва да бъдат преодоляни, преди **CRISPR-Cas** да може да се използва за терапия на резистентността в диви микробни общности. Идентифицирането на подходящ метод за доставка ще бъде от ключово значение за пълноценно използване на потенциала на тази технология за ограничаване на разпространението на AMP и мобилните генетични елементи, носещи гените за резистентност в околната и в клинична среда. Простото **препрограмизиране на CRISPR-Cas конструкции за насочване към конкретни гени**, които представляват интерес, **значително ще повиши ефективността**, с която това може да бъде постигнато. Такъв напредък може да има последици за справяне с резервоарите на резистентност и потенциално да помогне за запазване или възстановяване на антимикробната активност на антибиотиците. **Необходими са бъдещи изследвания**, за да се проучи и оптимизира разпространението на CRISPR-Cas в по-реалистични микробни общности и да се разберат и оценят рисковете, свързани с тази технология. В допълнение, **социалните и законодателни предизвикателства**, свързани с широкото използване на тази технология за редактиране на гени, **изискват активно взаимодействие с общностите и разработване на ясни насоки за регулиране на отговорната и**

безопасна употреба. Докато използването на CRISPR-Cas системи, които естествено се срещат върху плазмидите, може да избегне някои от проблемите, свързани с освобождаването на генетично модифицирани организми, разбирането на последиците, свързани с мащабното освобождаване на всеки ДНК елемент, ще бъде от ключово значение за устойчиво и нискорисковото внедряване на тази технология.

„Сега изследователите са изправени пред предизвикателството да докажат, че антибактериалните и антивирусни лекарства, базирани на CRISPR са ефективни при живи животни и при хора, не само в лабораторията, и че те ще бъдат по-евтини от конвенционалните терапии. Все още не сме готови за клиничен праймтайм, но ще стигнем много скоро до там.“ е мнението на *Dr. Barrangou*.

Изготвил:

Красимира Захариева,
Главен експерт в дирекция ОРХВ, към ЦОРХВ

Литературни източници:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30945014/>
- <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0516-x>
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29522745/>
- <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00179/full>
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27606440/>
- <https://insights.bio/immuno-oncology-insights/journal/article/425/repurposing-crispr-cas-systems-as-dna-based-smart-antimicrobials>
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29157535/>
- Citorik R, Mimee M, Lu T. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(11):1141–1145
- Jang H, Song B, Hwang G, Bae S. Current trends in gene recovery mediated by the CRISPR-Cas system <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0466-1>
- Goma A, Klumpe H, Luo M, Selle K, Barrangou R, Beisel C. Programmable Removal of Bacterial Strains by Use of Genome-Targeting CRISPR/Cas Systems. *MBio.* 2014; <https://doi.org/10.1128/mBio.00928-13>
- Ram G, Ross H, Novick R, Rodriguez-Pagan I, Jiang D. Conversion of staphylococcal pathogenicity islands to CRISPR-carrying antibacterial agents that cure infections in mice. *Nat Biotechnol.* 2018; 36 (10):971–976 - https://www.nature.com/articles/nbt.4203?_ga=2.140507059.145238490.1538870400-1937488809.1538870400
- Hamilton T, Pellegrino G, Therrien J, Ham D, Bartlett P, Karas B, et al. Efficient inter-species conjugative transfer of a CRISPR nuclease for targeted bacterial killing. *Nat Commun.* 2019; 10(1):4544. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12448-3>

- Selle K, Fletcher J, Tuson H, Schmitt D, Mcmillan L, Vridhambal G, et al. In Vivo Targeting of *Clostridioides difficile* Using Phage-Delivered CRISPR-Cas3 Antimicrobials. *MBio*. 2020; 11(2):e00019–20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00019-20>
- Kang Y, Kwon K, Ryu J, Lee H, Park C, Chung H. Nonviral Genome Editing Based on a Polymer-Derivatized CRISPR Nanocomplex for Targeting Bacterial Pathogens and Antibiotic Resistance. *Bioconjug Chem*. 2018; 29(11):3936. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00771>
- Vercoe R, Chang J, Dy R, Taylor C, Gristwood T, Clulow J, et al. Cytotoxic Chromosomal Targeting by CRISPR/Cas Systems Can Reshape Bacterial Genomes and Expel or Remodel Pathogenicity Islands. *PLoS Genet*. 2013; <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003454>
- Kim J, Cho D, Park M, Chung W, Shin D, Ko K, et al. CRISPR/Cas9-mediated Re-Sensitization of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Harboring Extended-Spectrum β -lactamases. <https://doi.org/10.4014/jmb.1508.08080> PMID: 26502735
- Wang P, He D, Li B, Guo Y, Wang W, Luo X, et al. Eliminating *mcr-1*-harbouring plasmids in clinical isolates using the CRISPR/Cas9 system. *J Antimicrob Chemother*. 2019; 74(9):2559–2565.
- Yosef I, Manor M, Kiro R, Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(23):7267–7272. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500107112>
- Wang K, Nicholaou M. Suppression of Antimicrobial Resistance in MRSA Using CRISPR-dCas9.
- Li Q, Zhao P, Li L, Zhao H, Shi L, Tian P. Engineering a CRISPR Interference System to Repress a Class I Integron in *Escherichia coli*.
- Tagliaferri T, Guimarães N, Pereira M, Vilela L, Horz H, Dos Santos S, et al. Exploring the Potential of CRISPR-Cas9 Under Challenging Conditions: Facing High-Copy Plasmids and Counteracting Beta-Lactam Resistance in Clinical Strains of Enterobacteriaceae. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00578>
- CRISPR-Cas antimicrobials: Challenges and future prospects - Elizabeth Pursey, David Sünderhauf, William H Gaze, Edze R Westra, Stineke van Houte
- CRISPR/Cas System: A Potential Technology for the Prevention and Control of COVID-19 and Emerging Infectious Diseases - Ronghua Ding, Jinzhao Long, Mingzhu Yuan, Yuefei Jin, Haiyan Yang, Mengshi Chen, Shuaiyin Chen and Guangcai Duan
- Harnessing the CRISPR-Cas Systems to Combat Antimicrobial Resistance - Cheng Duan, Huiluo Cao, Lian-Hui Zhang and Zeling Xu
- <https://www.nytimes.com/2019/10/28/health/crispr-genetics-antibiotic-resistance.html>
- CRISPR-Directed Microbiome Manipulation across the Food Supply Chain - Rodolphe Barrangou and Richard A. Notebaart
- CRISPR-based antimicrobials to obstruct antibiotic-resistant and pathogenic bacteria - Dennise Palacios Araya, Kelli L. Palmer, Breck A. Duerkop
- Genome Editing in Bacteria: CRISPR-Cas and Beyond - Ruben D. Arroyo-Olarte, Ricardo Bravo Rodríguez and Edgar Morales-Ríos
- CRISPR-Cas system in oral microbiome: from immune defense to physiological regulation - Tao Gong, Jumei Zeng, Boyu Tang, Xuedong Zhou and Yuqing Li
- Novel Strategy to Combat Antibiotic Resistance: A Sight into the Combination of CRISPR/Cas9 and Nanoparticles - Fen Wan, Mohamed S. Draz, Mengjie Gu, Wei Yu, Zhi Ruan and Qixia Luo
- Repurposing CRISPR-Cas systems as DNA-based smart antimicrobials - Rodolphe Barrangou & David G Ousterout
- Editing the microbiome the CRISPR way - Gayetri Ramachandran and David Bikard
- Bacterial resistance to CRISPR-Cas antimicrobials - Ruben V. Uribe, Christin Rathmer, Leonie Johanna Jahn, Mostafa Mostafa Hashim Ellabaan, Simone S. Li & Morten Otto Alexander Sommer
- <https://www.biotechniques.com/crispr/the-crispr-answer-to-antibiotic-resistance/>