

Научная статья
УДК 577.21:616.9
DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-2-197-205>
EDN: OCOJTN



Разработка подходов поиска и анализа CRISPR-Cas-систем на примере штаммов *Klebsiella pneumoniae* как основа создания персонализированной фаготерапии

Л.А. Степаненко*✉, Б.Г. Сухов**, В.В. Бединская*, А.Ю. Борисенко*, Т.В. Конькова**

*Иркутский государственный медицинский университет,

г. Иркутск, Российская Федерация

**Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН,

г. Новосибирск, Российская Федерация

Аннотация. В настоящей работе предложен алгоритм поиска и анализа структур CRISPR-Cas-систем бактерий и скрининга фагов через спейсерные последовательности CRISPR кассет с помощью биоинформационных методов исследования в геномах штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Цель работы – с помощью биоинформационных методов исследования определить и изучить структуру CRISPR-Cas-систем бактерий на примере штаммов *Klebsiella pneumoniae* для разработки подходов подбора таргетных бактериофагов. В качестве объекта выбраны 150 полногеномных последовательностей, загруженных из базы данных GenBank. Из них в 52 штаммах, что составило 34,7%, обнаружены CRISPR-Cas-системы. При помощи нескольких алгоритмов поиска в CRISPR-Cas-системах исследуемых штаммов в 46,2% случаев было определено наличие одной CRISPR кассеты, в 53,8% – две. Рядом с кассетами во всех случаях был идентифицирован полный набор Cas-генов, характерный для систем Type-I Subtype-I-E. Общее количество выявленных спейсеров составило 1659, из них 281 спейсер повторялся в двух и более CRISPR-локусах, 505 спейсеров не имели повторов. В кассетах количество спейсеров составляло от 4 до 64. Анализ спейсерного состава CRISPR кассет антибиотикорезистентных и внутригоспитальных штаммов позволил получить информацию об их эволюционной истории и о бактериофагах, против которых направлено действие их CRISPR-систем. Разработанный биоинформационный алгоритм анализа позволяет создать платформу для разработки технологий персонализированной фаготерапии.

Ключевые слова: CRISPR-Cas-система, *Klebsiella pneumoniae*, спейсер, протоспейсер, бактериофаг, биоинформатика, антибиотикорезистентность

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00449, <https://rscf.ru/project/22-25-00449/>.

Для цитирования: Степаненко Л.А., Сухов Б.Г., Бединская В.В., Борисенко А.Ю., Конькова Т.В. Разработка подходов поиска и анализа CRISPR-Cas-систем на примере штаммов *Klebsiella pneumoniae* как основа создания персонализированной фаготерапии // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 2. С. 197–205. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-2-197-205>. EDN: OCOJTN.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Developing approaches for search and analysis of CRISPR-Cas systems on the example of *Klebsiella pneumoniae* strains as a basis for creating personalized bacteriophage therapy

Lilia A. Stepanenko*✉, Boris G. Sukhov**, Viktoria V. Bedinskaya*,
Andrey Yu. Borisenko*, Tatiana V. Kon'kova**

*Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation

**Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. This paper proposes an algorithm for searching and analyzing the structures of CRISPR-Cas systems of bacteria and screening bacteriophages through spacers in CRISPR cassettes using bioinformatic research methods in the genomes of *Klebsiella pneumoniae* strains. The aim was to determine and study the structure of CRISPR-Cas systems of bacteria on the example of *Klebsiella pneumoniae* strains using bioinformatic research methods in order to develop approaches for the selection of target bacteriophages. The research object included 150 genome-wide

sequences downloaded from the GenBank database. Of these sequences, CRISPR-Cas systems were detected in 52 strains, which amounted to 34.7%. Using several search algorithms in the CRISPR-Cas systems of the studied strains, the presence of one and two CRISPR cassette was determined in 46.2 and 53.8% of cases, respectively. In all the cases, a complete set of Cas genes characteristic of Type-I Subtype-I-E systems was identified next to the cassettes. The total number of the identified spacers was 1659, of which 281 spacers were repeated in two or more CRISPR loci, while 505 spacers had no repeats. The number of spacers in the cassettes ranged from 4 to 64. The analysis of the spacer composition in CRISPR cassettes of antibiotic-resistant and hospital strains provided information on their evolutionary history and on the bacteriophages which are targeted by their CRISPR systems. The developed bioinformatic analysis algorithm enables creating a platform for the development of personalized bacteriophage therapy technologies.

Keywords: CRISPR-Cas system, *Klebsiella pneumoniae*, spacer, protospacer, bacteriophage, bioinformatics, antibiotic resistance

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation grant no. 22-25-00449, <https://rscf.ru/project/22-25-00449/>.

For citation: Stepanenko L.A., Sukhov B.G., Bedinskaya V.V., Borisenko A.Yu., Kon'kova T.V. Developing approaches for search and analysis of CRISPR-Cas systems on the example of *Klebsiella pneumonia* strains as a basis for creating personalized bacteriophage therapy. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(2):197-205. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-2-197-205>. EDN: OCOJTN.

ВВЕДЕНИЕ

CRISPR-Cas-система (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated proteins – короткие палиндромные повторы, систематично расположенные группами с CRISPR ассоциированными белками) – это специфическая адаптивная система защиты бактерий от чужеродных генетических элементов [1]. В современном мире с увеличением количества расшифрованных геномов подобные локусы повторов были обнаружены у многих архей и бактерий [2]. Системы CRISPR-Cas защищают клетки бактерий от вирусов, мобильных генетических элементов и прочей инородной ДНК. В организации CRISPR-Cas-систем принято выделять три структуры: CRISPR кассеты, лидерная последовательность и кластер Cas-генов. CRISPR кассеты представляют собой набор коротких повторяющихся последовательностей, между которыми находятся уникальные спейсерные сайты размером от 26 до 72 п.н., комплементарные участкам фагов и плазмид [3]. Ассоциированное действие Cas-генов и CRISPR кассет обеспечивает устойчивость бактериальных клеток к фагам, которые содержат протоспейсеры – последовательности, комплементарные спейсерам CRISPR кассет [4–6]. Современная классификация CRISPR-Cas-систем основана на организации кластера Cas-генов и на особенностях архитектуры кодируемых ими белковых комплексов. Согласно последней версии классификации, CRISPR-Cas-системы разделяют на 2 класса, объединяющих 6 типов [7–9].

Механизм действия CRISPR-Cas-систем обычно разделяют на три стадии: 1) адаптация, или приобретение новых спейсеров; 2) транскрипция CRISPR кассеты и процессинг пре-crPHK на короткие направляющие crPHK-фрагменты; 3) интерференция, во время которой происходит специфическое распознавание протоспейсера мишени и внесения разрыва в него [10–12]. Развитие технологий, основанных на механизме интерференции, опосредованном Cas-белками, позволило достаточно просто, избирательно и эффективно вносить направленные разрывы в целевые участки ДНК, производя переворот в области редакти-

рования геномов. Однако биология систем CRISPR-Cas, а именно их функционирование в качестве противовирусных иммунных агентов бактерий, не менее интересна и перспективна.

В последние десятилетия в структуре возбудителей инфекционных заболеваний произошли значительные изменения. Помимо открытия новых агентов, в инфекционной патологии значительно увеличилась роль широко известных микроорганизмов, появилось понятие «оппортунистические инфекции», которые возникают на фоне иммунодефицитных состояний и вызываются преимущественно условно-патогенными микробами [13]. К таким бактериям относится *Klebsiella pneumoniae*, которая является одним из наиболее распространенных возбудителей инфекционных болезней. Клебсиеллы могут вызывать различные инфекционные заболевания человека: инфекции мочевыводящих и дыхательных путей, острые кишечные инфекции, септицемии, инфекции кожи и мягких тканей и т. д. [14–16]. В то же время *Klebsiella pneumoniae* является одним из основных возбудителей нозокомиальных инфекций. Появляется все больше публикаций, посвященных возникновению штаммов клебсиелл, проявляющих одновременно признаки множественной устойчивости и гипервирулентности [17–20, 21]. Всемирная организация здравоохранения недавно определила *K. pneumoniae* как значительную угрозу общественному здоровью из-за способности формировать панлекарственную устойчивость и передавать ее другим бактериям посредством горизонтального переноса генов. Поэтому изучение CRISPR-Cas-систем как генетического механизма формирования «иммунной системы» защиты *Klebsiella pneumoniae*, направленного на чужеродные генетические элементы, позволяет понять эпидемиологию и эволюцию исследуемых штаммов, а также создает основу для разработки современных подходов в лечении сложных инфекционных заболеваний путем создания таргетной фаговой терапии.

Цель исследований заключается в том, чтобы с помощью биоинформационных методов определить и изучить структуру CRISPR-Cas-систем бактерий на

примере штаммов *Klebsiella pneumoniae* для разработки подходов подбора таргетных бактериофагов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа проводилась на базе НИИ биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета. Концептуальный дизайн исследований представлен на рис. 1.



Рис. 1. Схема концептуального дизайна исследований

Fig. 1. Scheme of conceptual research design

Для анализа из базы данных GenBank было выбрано 150 полногеномных последовательностей *Klebsiella pneumoniae*, из них у 52 штаммов, что составило 34,7%, обнаружены CRISPR/Cas-системы, они и послужили объектом исследования.

Для поиска локусов CRISPR-Cas-систем и генов Cas, определения их функциональных и структурных характеристик использовали три программных метода моделирования: Macromolecular System Finder (MacSyF, версия 1.0.2) с вспомогательными пакетами makeblastDB (версия 3.0) и HMMER (версия 2.2.28) и онлайн доступных софтов: CRISPRCas Finder¹ и CRISPRone². Для детекции бактериофагов в обнаруженных спейсерных участках использовали программу CRISPRtarget. Результаты считались достоверными при совпадении повторов и спейсеров в ряде программ [22].

Выравнивание и построение деревьев при филогенетическом анализе проведено с помощью программы MEGA X по методу ближайших соседей (NJ Neighbor-Joining) с анализом достоверности топологии бутстрэп-методом (число реплик – 500) и с использованием модели генетических дистанций Maximum Composite Likelihood. Для «укоренения» дерева при его построении по полногеномным нуклеотидным последовательностям к выборке исследуемых организмов добавлен штамм другого вида, но одного семейства: *Escherichia coli* strain NCTC9112 (NZ_LR134079.1), который составил аутгруппу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При анализе установлено, что в 28,9% случаев штаммы *Klebsiella pneumoniae* были выделены от

больных с диагнозом «пневмония», в 19,2% – из очага нозокомиальной вспышки, в 3,9% – из крови больных с диагнозом «абсцесс печени». По одному случаю – из крови недоношенного новорожденного отделения интенсивной терапии, из раны ожогового больного, из мочи больного с инфекцией верхних отделов мочевыводящей системы. В 40,4% случаев были представлены только отсекуированные геномы без какой-либо информации.

При этом у больных пневмонией *Klebsiella pneumoniae* была выделена в 40,0% случаев из мочи, по 13,3% случаев – из крови, мокроты, ректального мазка и неопределенные изоляты, в 6,7% – из раны. В очаге нозокомиальной вспышки *Klebsiella pneumoniae* в 30,0% случаев выделена при исследовании брюшной дренажной жидкости, по 20,0% – из носа, секрета трахеи, ректального мазка, в 10,0% – из мокроты.

При помощи нескольких алгоритмов поиска в CRISPR-Cas-системах исследуемых штаммов в 46,2% случаев было определено наличие одной CRISPR кассеты, в 53,8% – две.

Рядом с кассетами во всех случаях был идентифицирован полный набор Cas-генов, характерный для систем Type-I Subtype-I-E (cas2, cas1, cas5, cas7, cas6, cse2gr11, cas8, cas3), что свидетельствует о функциональной способности CRISPR-систем бактерий (рис. 2). Локализация, характеристика и количество обнаруженных кассет, а также Cas-генов в геномах полностью совпадают с их определением в исследуемых штаммах, по данным NCBI.



Рис. 2. Схематичное изображение CRISPR-Cas-системы Type-I Subtype-I-E в геноме штаммов *Klebsiella pneumoniae* с одной и двумя кассетами (данные из GenBank, NZ_CP011624.1, NZ_CP006798.1)

Fig. 2. Schematic representation of the Type-I Subtype-I-E CRISPR-Cas-system in the genome of *Klebsiella pneumoniae* strains with one and two cassettes (data from GenBank, NZ_CP011624.1, NZ_CP006798.1)

¹ CRISPRCasFinder [Электронный ресурс]. URL: <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index> (17.11.2022).

² CRISPRone [Электронный ресурс]. URL: <https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/> (17.11.2022).

Анализ спейсерного состава CRISPR кассет показал, что общее количество выявленных спейсеров составило 1659, из них 281 спейсер повторялся в двух и более CRISPR-локусах, 505 спейсеров не имели повторов. Внутри кассет спейсерных повторов не регистрировалось. В кассетах количество спейсеров составляло от 4 до 64. При этом в штаммах, содержащих одну кассету, суммарное количество спейсеров было больше по сравнению со штаммами, содержащими две кассеты. Определение аналогичных последовательностей спейсеров в кассетах различных штаммов может свидетельствовать об универсальности выбираемого фрагмента генома вируса и интеграции его в локус CRISPR кассеты бактерий при их встрече.

При анализе были определены достаточно разнообразные консенсусные последовательности повторов всех найденных CRISPR кассет, что может свидетельствовать о широкой циркуляции штаммов и обмене генетической информацией между представителями одного или разных видов (рис. 3).

При анализе CRISPR кассет в геномах исследуемых бактерий вызвала интерес следующая инфор-

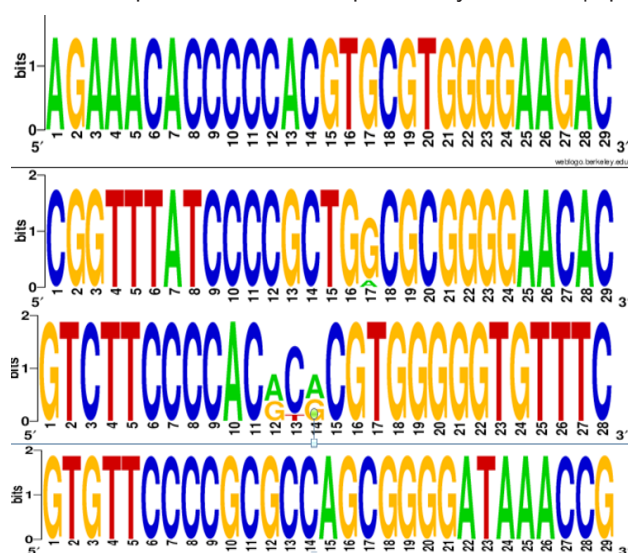


Рис. 3. Консенсусные последовательности повторов CRISPR кассет штаммов *Klebsiella pneumoniae*

Fig. 3. Consensus sequences of CRISPR cassettes repeats of strains *Klebsiella pneumoniae*

мация. Из 52 исследуемых штаммов у 29 (55,8%) после полного секвенирования, по данным NCBI, были определены гены устойчивости к антибактериальным препаратам, из них 27 штаммов (93,1%) обладали карбапенемазной активностью, и по 3,5% изолятов имели устойчивость к рифампицину и сульфаниламидам. Пять штаммов из данной группы обладали различным сочетанием генов карбапенемаз (NDM-1, OXA-48, OXA-181), которые располагались на плазидах и были связаны с другими детерминантами устойчивости, включая β -лактамазы расширенного спектра и метилазу ArgM, кодирующую устойчивость к аминогликозидам. Поэтому они обладали множественной антибиотикоустойчивостью и были определены как панрезистентные.

Данные штаммы имели в составе генома по две CRISPR кассеты. При этом у четырех изолятов отмечалось сходство спейсеров одной из кассет, два из них обладали идентичным набором спейсеров в двух кассетах, хотя все они были выделены в разное время и в разных регионах мира (США, Южная Корея; Шанхай, Цзянси, Китай). Интересно отметить, что один из пяти штаммов, выделенный во Франции в 2017 году, имел совершенно индивидуальный спейсерный состав, который не совпадал ни с одним из исследуемых 52 штаммов. Данный факт может свидетельствовать о едином происхождении штаммов, которые в результате широкой циркуляции изменялись генетически, но при этом сохраняли структуру CRISPR кассет. Для подтверждения вышесказанного был проведен филогенетический анализ исследуемых штаммов (рис. 4).

На рис. 4 четко прослеживается образование трех кластерных групп. Штаммы со сходным спейсерным

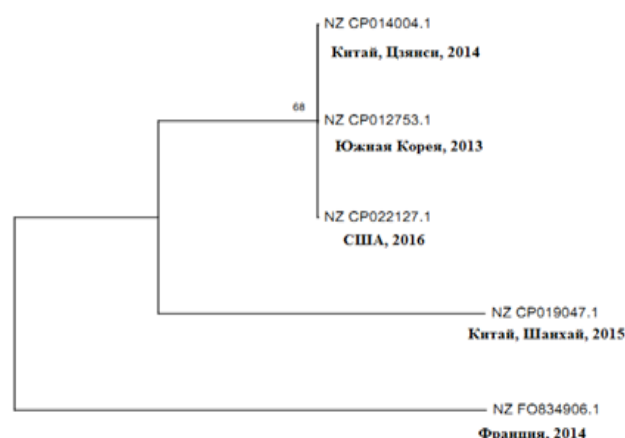


Рис. 4. Филогенетический анализ антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* на основании нуклеотидных последовательностей 23SrRNA (использована модель генетических дистанций Maximum Composite Likelihood)

Fig. 4. Phylogenetic analysis of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains based on 23S rRNA nucleotide sequences (used the model of genetic distances Maximum Composite Likelihood)

составом CRISPR кассет имеют близкородственное происхождение, т.е. одного предка (один узел). Также прослеживается появление новых предков, которые в процессе обмена генетической информацией приобретают новые свойства и признаки, но при этом сохраняют структуру CRISPR кассет. Штамм из Франции с индивидуальным набором спейсеров имеет совершенно иное происхождение.

В результате скрининга спейсерных последовательностей данных антибиотикорезистентных штаммов было установлено наибольшее их соответствие протоспейсерам фагов бактерий рода *Klebsiella*, *Salmonella*, относящихся к одному семейству Enterobacteriaceae (табл. 1).

Интересно отметить, что в CRISPR кассетах исследуемых штаммов отмечалось соответствие участка

Таблица 1. Разнообразие бактериофагов, соответствующих идентичным спейсерам в четырех штаммах *Klebsiella pneumoniae* с множественной антибиотикорезистентностью

Table 1. Diversity of bacteriophages corresponding to identical spacers in four strains of *Klebsiella pneumoniae* with multiple antibiotic resistance

Номер доступа штамма GenBank	Нуклеотидная последовательность спейсера	Бактериофаг	Номер доступа бактериофага GenBank	Количество нуклеотидных замен
NZ_CP014004.1	TTCATCACGTGTGAGCGGATTGGCTCTATCCT	<i>Klebsiella</i> phage 6 LV-2017	KY271400	2
NZ_CP012753.1				
NZ_CP022127.1				
NZ_CP019047.1				
NZ_CP014004.1	TGCCTCCAATGCAATCACCGGCTGTAACCGG	<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231	1
NZ_CP012753.1				
NZ_CP022127.1				
NZ_CP014004.1	CGTCATCAGCGCCTTGTTCAGCGGCGACCACC	<i>Salmonella</i> phage FSL SP-062	KC139634	2
NZ_CP012753.1				
NZ_CP019047.1				
NZ_CP014004.1 NZ_CP012753.1	TCCAGTCGTCGTAGTCTCGGTAATGTCCTCGA	<i>Klebsiella</i> phage ST512-KPC3phi13.1	MK448235	1
		<i>Klebsiella</i> phage ST11-VIM1phi8.1	MK448233	1
		<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231	1
		<i>Klebsiella</i> phage 2b LV-2017	KY271395	1
		<i>Klebsiella</i> phage 2 LV-2017	KY271396	2

одного спейсера протоспейсерам нескольких фагов бактерий одного семейства. Это может свидетельствовать о том, что бактерии «разумно» приобретают новые спейсеры из участков ДНК, консервативных для фагов бактерий одного семейства. Таким образом, бактерия одним спейсером может защититься от нескольких фагов.

Данный анализ исследуемых штаммов показал достаточно широкий спейсерный состав их CRISPR кассет, поэтому можно предположить, что они обладают не только антибиотикорезистентностью, но и устойчивостью ко многим бактериофагам. Таким образом, персонифицированный подход к комплексному подбору антибиотиков и бактериофагов в перспективе поможет решить вопрос о лечении заболеваний, вызванных данными штаммами.

Дальнейший анализ был проведен в группе из девяти штаммов, выделенных от больных, проходивших лечение в многопрофильном стационаре Нижней Саксонии (Германия), где была зарегистрирована нозокомиальная вспышка, вызванная *Klebsiella pneumoniae*. Установлено, что восемь из девяти выделенных штаммов имели в геноме по одной CRISPR кассете, состоящих из 35 спейсеров, полностью идентичных друг другу. По данным NCBI, они являлись изолятами одной генетической группы ST 147. Один штамм (NZ_CP018458.1) имел две CRISPR кассеты с индивидуальным набором спейсеров и относился к ST 15. Это также может свидетельствовать о едином происхождении восьми выявленных в очаге штаммов, которые в условиях стационара обменивались генетической информа-

цией, приобретая новые свойства, но при этом сохраняя структуру CRISPR кассеты. Для подтверждения вышесказанного был проведен филогенетический анализ исследуемых штаммов из нозокомиальной вспышки и группы штаммов, выделенных при пневмониях (рис. 5).

Построение дерева проводилось по полногеномным нуклеотидным последовательностям. На рис. 5

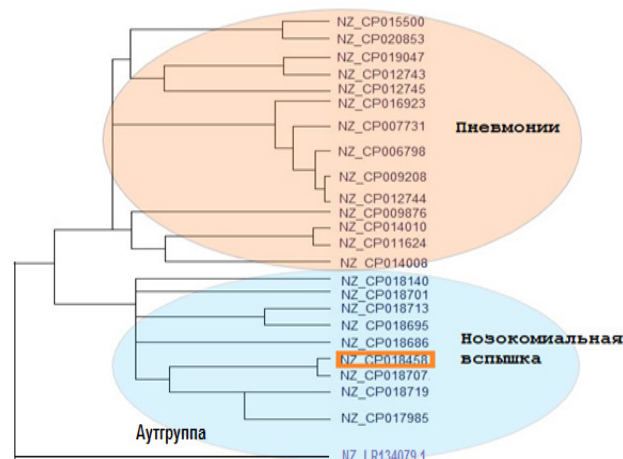


Рис. 5. Филогенетический анализ штаммов *Klebsiella pneumoniae* из нозокомиальной вспышки (данные GenBank; *Escherichia coli* NCTC9112 (аутгруппа); использована модель генетических дистанций Maximum Composite Likelihood)

Fig. 5. Phylogenetic analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains from a nosocomial outbreak (GenBank data; *Escherichia coli* NCTC9112 (outgroup); used the model of genetic distances Maximum Composite Likelihood)

Таблица 2. Разнообразие спейсеров и соответствующих им протоспейсеров фагов в геномах штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных при нозокомиальной вспышке в Германии

Table 2. Diversity of spacers and their corresponding phage protospacers in the genomes of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated during a nosocomial outbreak in Germany

Номер доступа штамма GenBank	Спейсер/кассета	Протоспейсер	Номер доступа GenBank	Количество нуклеотидных замен
NZ_CP017985	3/1	<i>Klebsiella phage</i> ST101-KPC2phi6.1	MK448231	0
NZ_CP018140	14/1	<i>Klebsiella phage</i> YMC1601N133_KPN_BP	MF476925	0
NZ_CP018686	17/1	<i>Klebsiella phage</i> 2b LV-2017	KY271395	0
NZ_CP018695	10/1	<i>Klebsiella phage</i> ST101-KPC2phi6.1	MK448231	1
NZ_CP018701	10/1	<i>Klebsiella phage</i> 2 LV-2017	KY271396	1
NZ_CP018707	10/1	<i>Klebsiella phage</i> 2b LV-2017	KY271395	1
NZ_CP018713	10/1	<i>Enterobacteria phage epsilon</i> 15	AY150271	1
NZ_CP018719	33/1	<i>Klebsiella phage</i> 2 LV-2017	KY271396	1
	6/1	<i>Klebsiella phage</i> ST405-OXA48phi1.2	MK416007	1
	6/1	<i>Klebsiella phage</i> 2b LV-2017	KY271395	1

четко прослеживается образование двух кластерных групп по нозологиям. Видно, что все штаммы из внутригоспитальной вспышки произошли от одного предка (один узел). Также прослеживается появление новых предков, которые в процессе дивергенции приобретают новые свойства и признаки, но при этом сохраняют структуру CRISPR кассет. Данный подход раскрывает эволюционную историю происхождения исследуемых штаммов и может быть использован для эпидемиологического анализа антибиотикорезистентных штаммов при внутригоспитальных вспышках.

Скрининг фагов через спейсерные последовательности показал, что в CRISPR кассетах данных штаммов спейсеры имели полное соответствие протоспейсерам фагов, специфичных для семейства Enterobacteriaceae (табл. 2). Интересно отметить, что в CRISPR кассетах исследуемых штаммов отмечалось явление праймированной адаптации, т.е. соответствие нескольких спейсеров кассеты протоспейсерам одного и того же фага. Так, спейсеры 11 и 17 соответствовали протоспейсерам *Klebsiella phage* 2b LV-2017, а спейсеры 10 и 33 протоспейсерам *Klebsiella phage* 2 LV-2017. Это можно объяснить тем, что в процессе эволюции в геноме бактериофага появляются замены, что снижает эффективность его узнавания эффекторным комплексом бактерий, которые, в свою очередь, приобретают новые дополнительные спейсеры из ДНК данного фага [17]. Наличие этого механизма повышает эффективность защитного действия систем CRISPR-Cas.

К большинству так называемых более древних спейсеров, расположенных отдаленно от лидерной последовательности, не было выявлено полного совпадения протоспейсерам фагов из известных баз данных.

Полученная информация о количестве и степени идентичности спейсеров протоспейсерам бактериофагов свидетельствует о генетических взаимодействиях в эволюционной истории между представителями разных видов внутри семейства и о предполагаемой устойчивости штаммов к определенным фагам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования с помощью биоинформатических методов были определены CRISPR-Cas-системы в 34,7% геномов *Klebsiella pneumoniae*, что указывает на их ограниченное распространение среди данных бактериальных видов. Выявлено наличие одной или двух CRISPR кассет с полным набором Cas-генов, в связи с чем можно утверждать, что данная система является активной, т.е. она способна к приобретению новых спейсеров, транскрипции CRISPR кассет, распознаванию и уничтожению чужой ДНК. Анализ спейсерного состава CRISPR кассет антибиотикорезистентных и внутригоспитальных штаммов позволил получить информацию об их эволюционной истории и о бактериофагах, против которых направлено действие их систем CRISPR-Cas. Таким образом, с помощью данного подхода был определен спектр фагов, к которым исследуемые штаммы *Klebsiella pneumoniae* предположительно обладают устойчивостью. Разработанный биоинформационный алгоритм анализа и его дальнейшее применение в изучении различных возбудителей с CRISPR-Cas-системой в геноме в перспективе дает возможность отбора целевых фагов и позволяет создать платформу для разработки технологий персонализированной фаготерапии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012. Vol. 109, no. 39. P. E2579–E2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>.
2. Mojica F.J.M., DiezVillasenor C., Soria E., Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced

repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria // Molecular Microbiology. 2000. Vol. 36, no. 1. P. 244–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>.

3. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin // Microbiology (Reading). 2005. Vol. 151,

no. 8. P. 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>.

4. Mojica F.J.M., DiezVillasenor C., Garcia Martinez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // *Journal of Molecular Evolution*. 2005. Vol. 60, no. 2. P. 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>.

5. Shmakov S.A., Makarova K.S., Wolf Y.I., Severinov K.V., Koonin E.V. Systematic prediction of genes functionally linked to CRISPR-Cas systems by gene neighborhood analysis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. Vol. 115, no. 23. P. 5307–5316. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803440115>.

6. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies // *Microbiology*. 2005. N 151. P. 653–663. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>.

7. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems // *Nature Reviews Microbiology*. 2015. Vol. 13, no. 11. P. 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>.

8. Shmakov S., Smargon A., Scott D., Cox D., Pyzocha N., Yan W., et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems // *Nature Reviews Microbiology*. 2017. Vol. 15, no. 3. P. 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>.

9. Koonin E.V. CRISPR: a new principle of genome engineering linked to conceptual shifts in evolutionary biology // *Biology & Philosophy*. 2019. Vol. 34, no. 9. <https://doi.org/10.1007/s10539-018-9658-7>.

10. Barrangou R., Flemaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // *Science*. 2007. Vol. 315. P. 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.

11. Gasiunas G., Sinkunas T., Siksnys V. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014. Vol. 71. P. 449–465. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1438-6>.

12. Hille F., Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016. Vol. 371, no. 1707. P. 20150496. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0496>.

13. Косенчук В.В., Рыбалкина Т.Н., Бошьян Р.Е., Каражас Н.В., Корниенко М.Н., Веселовский П.А. [и др.]. Роль возбудителей оппортунистических инфекций как этиологических агентов внутриутробных инфекций // *Детские инфекции*. 2019. Т. 18. N 3. С. 17–24. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2019-18-3-17-24>.

14. Brauberg C.A., Palacios M., Miller V.L. *Klebsiella*:

a long way to go towards understanding this enigmatic jetsetter // *F1000Prime Reports*. 2014. Vol. 6, no. 64. <https://doi.org/10.12703/P6-64>.

15. Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Николаева И.В., Семенова Д.Р., Любин С.А., Агапова И.В. [и др.]. Клебсиеллезный неонатальный сепсис // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2016. Т. 11. N 1. С. 82–86. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2016.11004>.

16. Moore R., O'Shea D., Geoghegan T., Mallon P.W.G., Sheehan G. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: an emerging infection in Ireland and Europe // *Infection*. 2013. Vol. 41, no. 3. P. 681–686. <https://doi.org/10.1007/s15010-013-0408-0>.

17. Агеевец В.А., Агеевец И.В., Сидоренко С.В. Конвергенция множественной резистентности и гипервирулентности у *Klebsiella pneumoniae* // *Инфекция и иммунитет*. 2022. Т. 12. N 3. С. 450–460. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-COM-1825>.

18. Gu D., Dong N., Zheng Z., Lin D., Huang M., Wang L., et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study // *The Lancet Infectious Diseases*. 2018. Vol. 18, no. 1. P. 37–46. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30489-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30489-9).

19. Lam M.M.C., Wyres K.L., Duchene S., Wick R.R., Judd L.M., Gan Y.H., et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination // *Nature Communications*. 2018. Vol. 9, no. 1. P. 2703. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05114-7>.

20. Liu Y., Long D., Xiang T.X., Du F.L., Wei D.D., Wan L.G., et al. Whole genome assembly and functional portrait of hypervirulent extensively drug-resistant NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST86 // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019. Vol. 74, no. 5. P. 1233–1240. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz023>.

21. Murray C.J.L., Ikuta K.Sh., Sharara F., Swetschinski L., Aguilar G.R., Gray A., et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // *Lancet*. 2022. Vol. 399, no. 10325. P. 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).

22. Степаненко Л.А., Джигоев Ю.П., Злобин В.И., Борисенко А.Ю., Саловарова В.П., Арефьева Н.А. [и др.]. Разработка подходов скрининга высокоспецифичных бактериофагов на основе биоинформационного анализа структур CRISPR-Cas систем *Corynebacterium diphtheriae* // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 2. С. 216–227. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-216-227>.

REFERENCES

1. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences. 2012;109(39):E2579-E2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>.

2. Mojica F.J.M., DiezVillasenor C., Soria E., Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced

- repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*. 2000;36(1):244-246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>.
3. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading)*. 2005;151(8):2551-2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>.
4. Mojica F.J.M., DiezVillasenor C., Garcia Martinez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*. 2005;60(2):174-182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>.
5. Shmakov S.A., Makarova K.S., Wolf Y.I., Severinov K.V., Koonin E.V. Systematic prediction of genes functionally linked to CRISPR-Cas systems by gene neighborhood analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(23):5307-5316. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803440115>.
6. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005;151(4):653-663. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>.
7. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2015;13(11):722-736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>.
8. Shmakov S., Smargon A., Scott D., Cox D., Pyzocha N., Yan W., et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2017;15(3):169-182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>.
9. Koonin E.V. CRISPR: a new principle of genome engineering linked to conceptual shifts in evolutionary biology. *Biology & Philosophy*. 2019;34(9). <https://doi.org/10.1007/s10539-018-9658-7>.
10. Barrangou R., Flemaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315:1709-1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.
11. Gasiunas G., Sinkunas T., Siksnys V. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014;71:449-465. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1438-6>.
12. Hille F., Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016;371(1707):20150496. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0496>.
13. Kosenchuk V.V., Rybalkina T.N., Boshyan R.E., Karazhas N.V., Kornienko M.N., Veselovsky P.A., et al. The role of opportunistic pathogens as etiological agents of intrauterine infections. *Detskii infektsii = Children Infections*. 2019;18(3):17-24. (In Russian). <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2019-18-3-17-24>.
14. Brauberg C.A., Palacios M., Miller V.L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jetsetter. *F1000Prime Reports*. 2014;6(64). <https://doi.org/10.12703/P6-64>.
15. Khaertynov Kh.S., Anokhin V.A., Nikolaeva I.V., Semenova D.R., Lyubin S.A., Agapova I.V., et al. *Klebsiella neonatal sepsis. Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*. 2016;11(1):82-86. (In Russian). <https://doi.org/10.14300/mnnc.2016.11004>.
16. Moore R., O'Shea D., Geoghegan T., Mallon P.W.G., Sheehan G. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: an emerging infection in Ireland and Europe. *Infection*. 2013;41(3):681-686. <https://doi.org/10.1007/s15010-013-0408-0>.
17. Ageevets V.A., Ageevets I.V., Sidorenko S.V. Convergence of multiple resistance and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(3):450-460. (In Russian). <https://doi.org/10.15789/2220-7619-COM-1825>.
18. Gu D., Dong N., Zheng Z., Lin D., Huang M., Wang L., et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018;18(1):37-46. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30489-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30489-9).
19. Lam M.M.C., Wyres K.L., Duchene S., Wick R.R., Judd L.M., Gan Y.H., et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. *Nature Communications*. 2018;9(1):2703. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05114-7>.
20. Liu Y., Long D., Xiang T.X., Du F.L., Wei D.D., Wan L.G., et al. Whole genome assembly and functional portrait of hypervirulent extensively drug-resistant NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST86. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;74(5):1233-1240. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz023>.
21. Murray C.J.L., Ikuta K.Sh., Sharara F., Swetschinski L., Aguilar G.R., Gray A., et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
22. Stepanenko L.A., Dzhoiev Yu.P., Zlobin V.I., Borisenko A.Yu., Salovarova V.P., Arefieva N.A., et al. Development of screening approaches of highly specific bacteriophages based on bioinformatic analysis of CRISPR-Cas structures of *Corynebacterium diphtheriae* systems. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):216-227. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-216-227>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Степаненко Лилия Александровна,
к.м.н., старший научный сотрудник,
НИИ биомедицинских технологий,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
steplia@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5792-7283>

Сухов Борис Геннадьевич,
к.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории
наночастиц,
Институт химической кинетики и горения
им. В.В. Воеводского СО РАН,
630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3,
Российская Федерация,
boris_sukhov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9751-6454>

Бединская Виктория Владимировна,
аспирант,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
vika-2801@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-9536-4795>

Борисенко Андрей Юрьевич,
к.б.н., ассистент,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
89500720225@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6094-5864>

Конькова Татьяна Владимировна,
к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории
наночастиц,
Институт химической кинетики и горения
им. В.В. Воеводского СО РАН,
630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3,
Российская Федерация,
konbuivol_2@yahoo.com
<https://orcid.org/0009-0002-0706-8692>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный
вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 24.10.2022.
Одобрена после рецензирования 27.01.2023.
Принята к публикации 30.05.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Lilia A. Stepanenko,
Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher,
Institute of Biomedical Technologies,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
steplia@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5792-7283>

Boris G. Sukhov,
Cand. Sci. (Chemistry), Leading Researcher,
Laboratory of Nanoparticles,
Voevodsky Institute of Chemical Kinetics
and Combustion,
3, Institutskaya St., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
boris_sukhov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9751-6454>

Victoria V. Bedinskaya,
Postgraduate Student,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
vika-2801@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-9536-4795>

Andrey Yu. Borisenko,
Cand. Sci. (Biology), Assistant,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
89500720225@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6094-5864>

Tatyana V. Kon'kova,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
Laboratory of Nanoparticles,
Voevodsky Institute of Chemical Kinetics
and Combustion,
3, Institutskaya St., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
konbuivol_2@yahoo.com
<https://orcid.org/0009-0002-0706-8692>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding
the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all
the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 24.10.2022.
Approved after reviewing 27.01.2023.
Accepted for publication 30.05.2023.