Оригинальная статья / Original article
УДК 601.4: 616.931
DOI: https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-216-227

Разработка подходов скрининга высокоспецифичных бактериофагов на основе биоинформационного анализа структур CRISPR-Cas систем *Corynebacterium diphtheriae*

© Л.А. Степаненко*, Ю.П. Джиоев*, В.И. Злобин*, А.Ю. Борисенко*, В.П. Саловарова **, Н.А. Арефьева **, И.Ж. Семинский *, И.В. Малов*

* Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск, Российская Федерация
** Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: *Целью настоящего исследования являлась разработка подходов скрининга высокоспецифичных бактериофагов на основе биоинформационного анализа структур CRISPR-Cas систем бактерий на примере Corynebacterium diphtheriae. Предложен алгоритм биоинформационного поиска и анализа структур CRISPR-Cas систем бактерий и скрининга фагов через спейсерные последовательности CRISPR-кассет в геномах штаммов Corynebacterium diphtheriae. В качестве объекта выбраны 22 полногеномные последовательности, загруженные из базы данных GenBank. Из них у 21 штамма обнаружены CRISPR-Cas системы. При помощи нескольких алгоритмов поиска в CRISPR-Cas системах исследуемых штаммов в 23,8% случаев определено наличие одной CRISPR-кассеты, в 76,2% случаев – двух. Рядом с кассетами идентифицирован полный набор Cas-генов, характерный для двух типов систем: Type-I Subtype-I-E и Type-II Subtype-II-C. Анализ спейсерного состава CRISPR-кассет показал наличие от 3 до 42 спейсеров в кассетах. Совокупное количество выявленных спейсеров составило 297. Из них 64 спейсера повторялись в двух и более CRISPR-кассетах, 159 спейсеров не имели повторов. Три пары исследуемых штаммов из данной группы имели полное совпадение спейсерных и консенсусных последовательностей, хотя были выделены в разное время и в разных странах мира. Для подтверждения их единого происхождения был проведен филогенетический анализ. Скрининг фагов через спейсерные последовательности показал наибольшее соответствие спейсеров протоспейсерам фагов, специфичных для бактерий семейства Mycobacteriaceae, Gordoniaceae, Streptomycetaceae, Corynebacteriaceae, относящихся к одному типу Actinobacteria. Был выявлен один штамм, обладающий множественной антибиотикорезистентностью, и с помощью данной технологии определена его предполагаемая устойчивость к бактериофагам. Таким образом, разработанная технология биоинформационного анализа позволила получить сведения о предполагаемой устойчивости CRISPR-Cas системы исследуемых штаммов к обнаруженным фагам, что в перспективе дает возможность создания платформы для разработки подходов персонифицированной фаготерапии.*

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*, бактериофаг, CRISPR-Cas система, спейсер, протоспейсер, биоинформатика, антибиотикорезистентность

Для цитирования: Степаненко Л.А., Джиоев Ю.П., Злобин В.И., Борисенко А.Ю., Саловарова В.П., Арефьева Н.А., Семинский И.Ж., Малов И.В. Разработка подходов скрининга высокоспецифичных бактериофагов на основе биоинформационного анализа структур CRISPR-Cas систем *Corynebacterium diphtheria. 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

Development of screening approaches of highly specific bacteriophages based on bioinformatic analysis of CRISPR-Cas structures of *Corynebacterium diphtheriae* systems

Lilia A. Stepanenko*, Yuri P. Dzhioev*, Vladimir I. Zlobin*, Andrey Yu. Borisenko*, Valentina P. Salovarova, Nadezhda A. Arefieva**, Igor Zh. Seminsky*, Igor V. Malov***

* Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation
** Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: *This study aims to develop approaches for screening highly specific bacteriophages based on bioinformatic analysis of CRISPR-Cas structures of bacterial systems using the example of Corynebacterium diphtheriae. We proposed an algorithm for bioinformatic search and analysis of CRISPR-Cas structures of bacteria systems and phage screening through spacer sequences of CRISPR-cassette in genomes of Corynebacterium strains. 22 genome-wide sequences loaded from the GenBank database were selected as the target. 21 strains out of 22 had CRISPR-Cas systems. Using several search algorithms in CRISPR-Cas systems, one CRISPR-cassette was found in 23.8% of the tested strains and two in 76.2% of cases. Near the cassettes, a complete set of Cas-genes was identified, characteristic of two types of systems: Type-I Subtype-I-E and Type-II Subtype-II-C. The conducted analysis of the CRISPR-cassette spacer composition showed 3 to 42 spacers in the cassette. The cumulative total number of identified spacers amounted to 297, 64 spacers of which repeated in two or more CRISPR-cassettes, 159 spacers had no replicates. The three pairs of strains under study from this group had a complete match of spacer and consensus sequences, although they were isolated at different times and in multiple countries. A phylogenetic analysis was performed to confirm their common origin. Phages screening through the spacer sequences showed the highest compliance of the spacers with the phages protospacers, characteristic of the bacteria of the Mycobacteriaceae, Gordoniaceae, Streptomycetaceae, Corynebacteriaceae family belonging to the Actinobacteria type. One strain with multiple antibiotic resistance was identified, and its expected bacteriophage resistance was determined using this method. Thus, the developed bioinformatic analysis technology allowed the information on the expected resistance of the tested strains CRISPR-Cas system against the detected phages to be obtained, which in the long term enables the development of a platform of personalised bacteriophage treatment approaches.*

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*, bacteriophage, CRISPR-Cas system, spacer, protospacer, bioinformatics, antibiotic resistance

For citation: Stepanenko LA, Dzhioev YuP, Zlobin VI, Borisenko AYu, Salovarova VP, Arefieva NA, Seminsky I.Zh, Malov IV. 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

ВВЕДЕНИЕ

Система CRISPR-Cas вот уже несколько лет широко применяется в генетической инженерии как простая, дешевая и быстрая технология редактирования генома. В 2020 г. Нобелевский комитет Королевской шведской академии наук вручил Нобелевскую премию по химии за один из самых востребованных методов современной генетической инженерии, известный как «генетические ножницы», или CRISPR-Cas9. [1]. Однако изучение структуры и функционирования систем CRISPR-Cas в качестве противовирусных иммунных агентов бактерий не менее интересно и увлекательно. Данные исследования посвящены изучению разнообразия и функциональности естественных систем бактерий.

CRISPR-Cas системы представляют собой системы антивирусного иммунитета, которые присутствуют в большинстве архей и многих бактерий и защищают их от вирусов, мобильных генетических элементов и прочей инородной ДНК [2]. В организации CRISPR-Cas систем принято выделять три структуры: CRISPR-кассеты, лидерную последовательность и кластер Cas-генов. CRISPR-кассеты представляют собой набор коротких повторяющихся последовательностей, в промежутках которых находятся уникальные спейсерные сайты (26–72 п.н.), комплементарные участкам фагов и плазмид, с которыми данная бактерия встречалась и к которым может проявлять устойчивость [3]. Спейсеры полностью интегрированы в геном клетки и передаются ее потомкам при делении. Перед CRISPR-кассетой расположена лидерная последовательность (рис. 1). Данная структура содержит промотор и обеспечивает однонаправленную транскрипцию CRISPR-кассеты [4].

Современная классификация CRISPR-Cas систем основана на организации кластера Cas-генов и на особенностях архитектуры кодируемых ими белковых комплексов. Согласно последней версии CRISPR-Cas разделяют на 2 класса, объединяющих 6 типов [5–7]. Механизм действия CRISPR-Cas систем обычно разделяют на три стадии [8]:

1) приобретение новых спейсеров или адаптация;

2) транскрипция CRISPR-кассеты и процессинг пре-crРНК на короткие направляющие crРНК-фрагменты;

3) интерференция, во время которой происходит специфическое распознавание и уничтожение чужеродных генетических элементов.

Эта базовая идея лежит в основе работы всех систем CRISPR-Cas, однако, детали у разных типов и подтипов, а, следовательно, у разных видов микроорганизмов различаются.

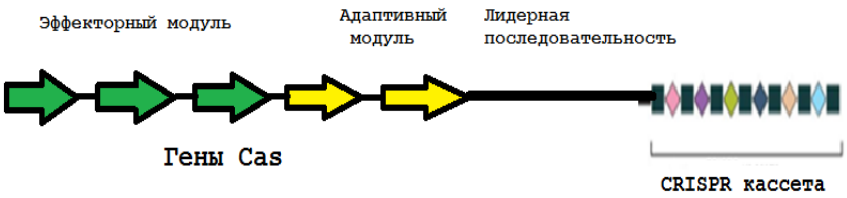

Рис. 1. Упрощенная схема строения CRISPR-Cas системы

Fig. 1. Simplified diagram of the structure of the CRISPR-Cas system

Дифтерия – инфекционное заболевание, которое является одним из самых тяжелых бактериальных инфекций человека. До введения массовой вакцинации она уносила тысячи жизней, особенно среди детского населения [9]. В течение болезни токсинпродуцирующие *C. diphtheriae* локально колонизируют слизистую оболочку и производят токсин, который всасывается в кровоток и вызывает поражение сердечной мышцы, демиелинизацию нервных волокон, что приводит к параличу неба и глазных мышц [10]. На совещании ВОЗ в 1993 г. был сделан вывод о том, что для ликвидации дифтерии требуется охват иммунизацией не менее 90% детей и 75% взрослых[1]. Однако массовый отказ от вакцинации и, как следствие, снижение уровня коллективного иммунитета способствуют сохранению циркуляции токсигенных *C. diphtheriae* и возникновению спорадических случаев заболевания в определенных группах риска. Поскольку вакцинация против дифтерии проводится с использованием инактивированной формы токсина, считается, что она не предотвращает бессимптомную колонизацию и скрытую передачу токсигенных штаммов патогена, что способствует их циркуляции среди населения. Поэтому токсигенные бактерии дифтерии по-прежнему остаются объектом интенсивного эпидемиологического надзора [11].

Начиная с конца 1990-х гг. во всем мире появляется все больше информации о возникновении кожных и инвазивных форм инфекции (бактериемия и эндокардит), вызванных нетоксигенными штаммами, смертность от которых достигает более 40% [12, 13]. Можно предположить, что появление и распространение данных штаммов связано с изменением эволюционной динамики *C. diphtheriae*, что требует более глубокого изучения и понимания популяционной генетики.

В основе клинического лечения дифтерии лежит применение дифтерийной сыворотки, оказывающей антитоксическое действие, тем самым предотвращая или уменьшая системные эффекты токсина [14]. Тем не менее противомикробное лечение имеет решающее значение, поскольку способствует уничтожению как *токс*-положительных, так и *токс*-отрицательных бактерий и ограничивает передачу инфекции среди населения. Пенициллин и эритромицин являются препаратами первой линии для лечения дифтерии. Однако во многих регионах мира все чаще сообщается о снижении восприимчивости или полной резистентности *C. Diphtheriae* к данным препаратам или возникновению штаммов с множественной лекарственной устойчивостью [15–18]. При этом нужно учитывать, что гены антибиотикорезистентности посредством горизонтального переноса приводят к возникновению устойчивости к противомикробным препаратам во множестве сублиний [19]. Таким образом, сохранение на фоне проводимой вакцинопрофилактики циркуляции токсигенных форм *C. Diphtheriae*, появление тяжелых заболеваний, вызванных нетоксигенными штаммами, и распространение штаммов с множественной антибиотикорезистентностью диктуют необходимость поиска альтернативных методов борьбы с ними. В связи с этим в медицинской практике вновь возрастает интерес к применению бактериофагов для лечения инфекций бактериального происхождения. Изучение структурных и функциональных особенностей CRISPR-Cas системы бактерий позволит разработать современные подходы в лечении сложных инфекционных заболеваний путем создания таргетной фаговой терапии.

Цель данного исследования – разработка подходов скрининга высокоспецифичных бактериофагов на основе биоинформационного анализа структур CRISPR-Cas систем бактерий на примере *Corynebacterium diphtheriae*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работу проводили на базе лаборатории молекулярной вирусологии и биотехнологии НИИ биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета. Для достижения указанной цели был разработан концептуальный дизайн исследований (рис. 2).

[1]Эпидемия дифтерии в Европе: чрезвычайная ситуация и ответные меры. Отчет о заседании ВОЗ (Санкт-Петербург, 5–7 июля 1993 г.). СПб.: б.и., 1993. 162 с.

Рис. 2. Схема концептуального дизайна исследований

Fig. 2. Research conceptual design diagram

Объектом служили полногеномные последовательности *Corynebacterium diphtheriae,* загруженных из базы данных GenBank. На исследование были взяты штаммы, у которых обнаружены CRISPR-Cas системы, – 21 из 22

Для поиска CRISPR-Cas систем использовали методы программного моделирования MacSyFinder (Macromolecular SystemFinder, ver. 1.0.2). Поиск структурных и функциональных характеристик Cas-генов осуществляли при помощи вспомогательных программных пакетов makeblastdb (ver.2.2.28) и HMMER (ver.3.0). Для детекции и анализа CRISPR-кассет в геноме использовали онлайн-приложения CRISPI: a CRISPR Interactive database (http://crispi.genouest.org); CRISPRFinder (http://crispr.u-psud.fr/Server). Для поиска фагов расшифрованные спейсерные последовательности в формате FASTA были загружены в онлайн-приложение CRISPRTarget (http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html) и Mycobacteriophage Database (http://phagesdb.org/blast/). При филогенетическом анализе выравнивание и построение дерева было проведено с помощью программы MEGA X по методу максимального правдоподобия (ML –Ma-ximum-Likelihood) с использованием бутстрэп-анализа (число реплик –1000). Для «укоренения» дерева к выборке исследуемых организмов добавлены еще два штамма другого вида, но одного рода*: Corynebacterium minutissimum strain NCTC10288* (NZ_LS483460.1) и *Corynebacterium minutissimum strain* NCTC10285 (NZ_LR134339.1), которые составили аутгруппу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При анализе было установлено, что в 47,6% случаев штаммы *Corynebacterium diphtheriae* были выделены от больных с диагнозом дифтерия ротоглотки, в 19,1% случаев – с диагнозом эндокардит, в 4,8% случаев – из смыва из бронхов от пациентов с пневмонией на фоне рака легких. В 28,8% случаев были представлены только отсеквенированные геномы коллекционных штаммов. При этом у больных с диагнозом дифтерия ротоглотки *Corynebacterium diphtheriae* была выделена: в 38,1% случаев – из носоглотки, в 14,3% – из смыва из бронхов. У пациентов с диагнозом эндокардит во всех случаях возбудитель был выделен из крови, это составило 19% всех случаев.

При помощи нескольких алгоритмов поиска в CRISPR-Cas системах исследуемых штаммов в 23,8% случаев было определено наличие одной CRISPR-кассеты, в 76,2% случаев – двух.

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) и Type-II Subtype-II-C (cas2, cas1, cas9), что свидетельствует о функциональной активности CRISPR-систем исследуемых штаммов (рис. 3, 4). В четырех штаммах содержался набор *Cas*-генов двух типов.

Рис. 3. Схематичное изображение CRISPR-Cas системы Type-I Subtype-I-E в геноме штаммов Corynebacterium diphtheria (данные из GenBank, NZ_LN831026.1)

Fig. 3. Schematic representation of the CRISPR-Cas system Type-I Subtype-I-E in the genome of Corynebacterium diphtheria strains (data from GenBank, NZ_LN831026.1)

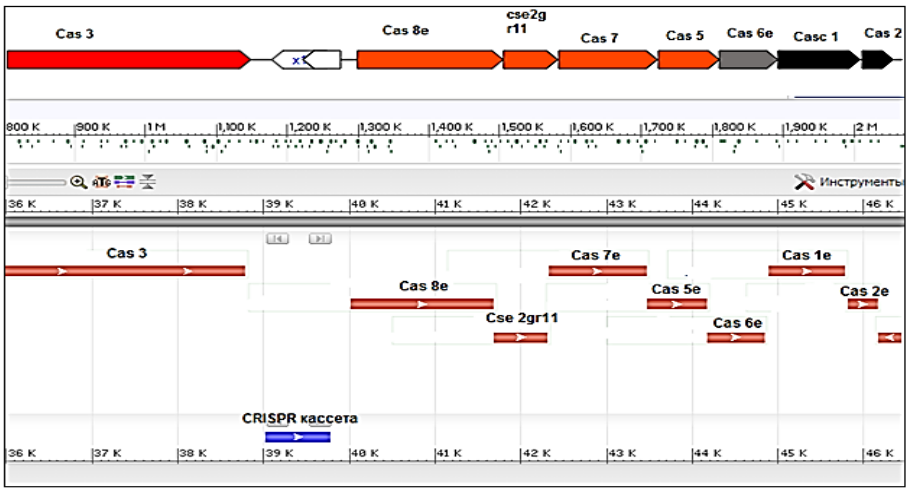

Рис. 4. Схематичное изображение CRISPR-Cas системы Type-II Subtype-II-C в геноме штаммов Corynebacterium diphtheria (данные из GenBank, NC_016785.1)

Fig. 4. Schematic representation of the CRISPR-Cas system Type-II Subtype-II-C in the genome of Corynebacterium diphtheria strains (data from GenBank, NC_016785.1)

Анализ спейсерного состава CRISPR-кассет показал, что количество спейсеров в кассетах составляло от 3 до 42. Совокупное количество выявленных спейсеров составило 297. Из них 64 спейсера повторялись в двух и более CRISPR-кассетах, 159 спейсеров не имели повторов. В пяти штаммах внутри кассет регистрировались спейсерные повторы. Наличие одинаковых спейсеров в кассетах различных штаммов может свидетельствовать о том, что при встрече бактерий с одним и тем же вирусом или плазмидой из их ДНК вырезается и интегрируется в локус CRISPR-кассеты в качестве нового спейсера не случайно выбранный фрагмент генома, а универсальный.

Консенсусные последовательности повторов всех найденных CRISPR-кассет были достаточно разнообразны, что может свидетельствовать как о различном происхождении исследуемых штаммов, так и о широкой циркуляции данных штаммов и обмене генетической информацией между представителями одного или разных видов (рис. 5).

Рис. 5. Консенсусные последовательности повторов CRISPR-кассет штаммов Corynebacterium diphtheriae

Fig. 5. Consensus sequences of CRISPR cassettes repeats of strains Corynebacterium diphtheriae

При исследовании CRISPR-кассет вызвало интерес следующее: в трех парах исследуемых штаммов отмечалось 100%-е совпадение спейсерных и консенсусных последовательностей повторов. При этом в одной паре первый штамм был выделен в Индии в 1973 г. из носоглотки пациента с диагнозом дифтерия, второй изолирован от больного в Нью-Йорке в 1896 г. Последний штамм являлся высокотоксигенным и поэтому использовался в лабораторных целях для производства токсина. Во второй паре оба штамма впервые были выделены в США в 1954 и 1969 гг. и относились к эталонным коллекционным. Однако первый штамм отличался наличием интегрированного нового спейсера, расположенного около лидерной последовательности. В последней паре оба штамма были выделены в Бразилии (Рио-де-Жанейро): один был изолирован из носоглотки больного дифтерией в 1981 г., другой – из образца крови пациента, страдающего смертельным эндокардитом, в 1993 г. Таким образом, исследуемые штаммы имели в составе CRISPR-кассет спейсеры с одинаковой нуклеотидной последовательностью, хотя были выделены в разное время и в разных регионах мира. Проведенный анализ подтверждает единое происхождение штаммов, которые в результате циркуляции изменялись генетически, приобретая новые свойства, но при этом, возможно, сохраняли структуру CRISPR-кассеты. Для подтверждения данного высказывания был проведен филогенетический анализ всех исследуемых штаммов. Построение дерева проводилось по последовательностям 16S rRNA (рис. 6).

На картине филогенетического древа четко прослеживается образование трех кластерных групп от одного узла (единого предка). При этом каждая исследуемая пара (выделены цветом на рисунке) имеет единый внутренний узел и, следовательно, одно происхождение. Таким образом, мы видим единое происхождение новых штаммов, которые в процессе дивергенции приобретают новые свойства и признаки, при этом сохраняя структуру CRISPR-кассет. Данный подход может быть использован для проведения эпидемиологических исследований при расследовании вспышек заболевания.

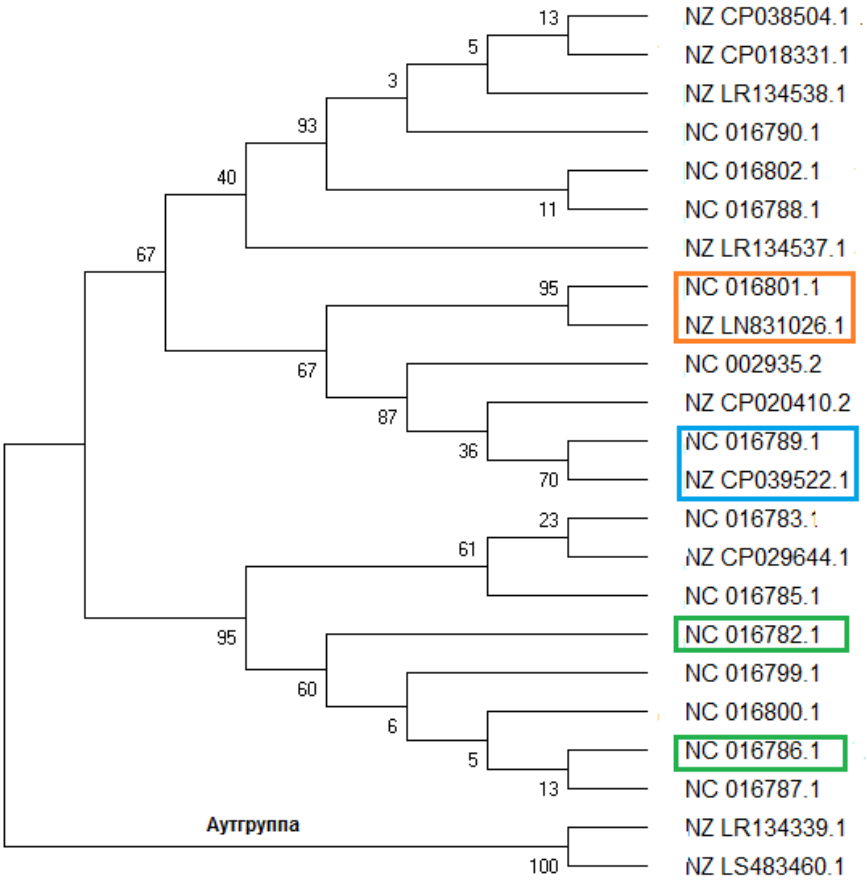

Рис. 6. Филогенетическое дерево исследуемых штаммов Corynebacterium diphtheriae и Corynebacterium minutissimum (аутгруппа) построенное на основании нуклеотидных последовательностей 16S rRNA

Fig. 6. Phylogenetic tree of the studied strains of Corynebacterium diphtheria and Corynebacterium minutissimum (outgroup), built on the basis of 16S rRNA nucleotide sequences

В результате скрининга спейсерных последовательностей было установлено, что во всех исследуемых штаммах в CRISPR-кассетах выявлено их соответствие протоспейсерам фагов бактерий семейства *Mycobacteriaceae, Gordoniaceae, Streptomycetaceae, Corynebacteriaceae*, относящихся к одному типу *Actinobacteria* (табл. 1).

Нужно отметить, что к большинству так называемых «древних» спейсеров, которые, как правило, располагаются отдаленно от лидерной последовательности, не было выявлено полного соответствия протоспейсеров фагов из известных баз данных. Анализ бактериофагов показал, что все фаги бактерий семейства *Gordoniaceae* были выделены впервые из почвы. Это объясняется тем, что бактерии данного семейства устойчивы к неблагоприятным условиям существования и участвуют в биоремедиации благодаря способности утилизировать хлорароматические соединения. *Corynebacterium phage* были разделены на две группы. Первая группа впервые была выделена из биовара *Corynebacterium pseudotuberculosis Equi 39*, являющегося грамположительным плеоморфным факультативным внутриклеточным патогеном. Впервые он был изолирован от буйвола в Египте, у которого было диагностировано отечное заболевание кожи. Вторая группа была впервые выделена из обогащенной пробы сточных вод в США (штат Алабама). *Mycobacterium phage* впервые были изолированы из почвы в США (штат Колорадо) в разные годы. *Streptococcus phage* являлся умеренным бактериофагом *Streptococcus oralis*, который был выделен из наддесневого зубного налета человека в Швейцарии. В двух штаммах спейсеры имели наибольшее соответствие провирусному гену фага SK137 (skl). Данный ген (skl) кодирует фермент пептидогликангидролазу, участвующий в лизисе пептидогликана грамположительных бактерий. На основании этого можно предположить, что грамположительная *Corynebacterium diphtheriae* приобрела данный спейсер для формирования устойчивости к данному фагу (табл. 2).

Таблица 1. Разнообразие спейсеров и соответствующих им протоспейсеров фагов в геномах штаммов Corynebacterium diphtheria

Table 1. Diversity of spacers and corresponding phage protospacers in the genomes of Corynebacterium diphtheriae strains

Спейсер	Номер доступа GenBank	Протоспейсер	Номер доступа GenBank	Кол-во нуклеотидных замен
Spacer 3_1	Nctc11397	Gordonia phage Phorbesphlower	MN175604	2
Spacer 3_1	Nctc11397	Gordonia phage Kuwabara	MN892485	2
Spacer1_1	Nz_cp029644.1	Corynebacterium phage Bran	MK977714	1
Spacer2_1		Streptococcus phage PH10	FN391954	4
Spacer2_1		Phage SK137 Proviralhol gene	AM040720	4
Spacer4_1	Nz_cp038504.1	Corynebacterium phage LGCM-V8, LGCM-V6, LGCM-V9, LGCM-V7, LGCM-V5, LGCM-V4, LGCM-V3	KY624615 KY624612 KY624616 KY624614 KY624613 KY624611 KY624610	0
Spacer3_1	Nz_cp018331.1	Streptococcus phage PH10	FN391954	4
Spacer3_1		Phage SK137 Proviralhol gene	AM040720	4
Spacer12_1	Nz_cp039522.1	Corynebacterium phage LGCM-V8, LGCM-V6, LGCM-V9, LGCM-V7, LGCM-V5, LGCM-V4, LGCM-V3	KY624615 KY624612 KY624616 KY624614 KY624613 KY624611 KY624610	2
Spacer2_1	Nc_016782.1	Corynebacterium phage LGCM-V8, LGCM-V6, LGCM-V9, LGCM-V7, LGCM-V5, LGCM-V4, LGCM-V3, LGCM-VI, LGCM-V2	KY624615 KY624612 KY624616 KY624614 KY624613 KY624611 KY624610 KY566218 KY613597	2
Spacer1_1	Nc_016800.1	Corynebacterium phage Stiles Corynebacterium phage Dina Corynebacterium phage Stab Corynebacterium phage Troy	MK977710 MK977706 MK937613 MH926061	5

		corynebacterium phage Lederberg Corynebacterium phage Bran Corynebacterium phage Samw	MK977712 MK977714 MH727560	
Spacer1_1	Nc_016801.1	Corynebacterium phage Bran	MK977714	1
Spacer 3_1		Gordonia phage Phorbesphlower	MN175604	2
Spacer 3_1		Gordonia phage Kuwabara	MN892485	2
Spacer 2_1	Nc_016786.1	Corynebacterium phage LGCM-V8, LGCM-V6, LGCM-V9, LGCM-V7, LGCM-V5, LGCM-V4, LGCM-V3, LGCM-VI, LGCM-V2	KY624615 KY624612 KY624616 KY624614 KY624613 KY624611 KY624610 KY566218 KY613597	2
Spacer 12_1	Nc_016789.1	Corynebacterium phage LGCM-V4, LGCM-V3, LGCM-VI, LGCM-V2	KY624611 KY624610 KY566218 KY613597	2
Spacer 1_1	Nc_016790.1	Corynebacterium phage Stiles Corynebacterium phage Dina Corynebacterium phage Stab Corynebacterium phage Troy corynebacterium phage Lederberg Corynebacterium phage Bran Corynebacterium phage Samw	MK977710 MK977706 MK937613 MH926061 MK977712 MK977714 MH727560	5

Таблица 2. Информация об идентифицированных бактериофагах

Table 2. Information on identified bacteriophages

Бактериофаги	Источник выделения фага	Место выделения фага
Gordonia phage Phorbes Phlower	почва	США, Пельсильвания
Gordonia phage Kuwabara	почва	США Гринсборо, Северная Каролина
Streptococcus phage PH10	наддесневой зубной налет человека	Швейцария
Phage SK137 proviralhol gene	профаг Streptococcus mitis	Мадрид, Испания
Corynebacterium phage LGCM-V8, LGCM-V6, LGCM-V9, LGCM-V7, LGCM-V5, LGCM-V4, LGCM-V3	кожа больного отеком буйвола	Египет
Corynebacterium phage Stiles Corynebacterium phage Dina Corynebacterium phage StAB Corynebacterium phage Troy Corynebacterium phage Lederberg Corynebacterium phage Bran Corynebacterium phage SamW	обогащенные пробы сточных вод	США: Бирмингем, Алабама

Полученная информация о количестве и степени разнообразия бактериофагов свидетельствует о генетических взаимодействиях в эволюционной истории как между представителями разных видов внутри семейства, так и между представителями разных семейств внутри одного типа.

Интересно отметить, что в CRISPR-кассетах исследуемых штаммов наблюдалось соответствие участка одного спейсера протоспейсерам нескольких фагов бактерий одного семейства. Это может свидетельствовать о том, что бактерия «разумно» приобретает новые спейсеры из участков ДНК, консервативных для фагов бактерий одного семейства. Таким образом, бактерия одним спейсером может «защититься» от нескольких фагов.

По данным, представленным в базе данных NCBI, один из 22 исследуемых штаммов (NC_016800.1) обладал множественной антибиотикорезистентностью. Данный штамм имел наименьший спейсерный состав (три спейсера) и универсальную последовательность консенсусных повторов. При скрининге фагов было определено, что только первый спейсер имел наибольшее соответствие протоспейсерам семи *Corynebacterium phage*, представленным в табл. 3. Таким образом, была определена не только устойчивость данного штамма к антибактериальным препаратам, но и к бактериофагам.

Таблица 3. Разнообразие протоспейсеров фагов соответствующих первому спейсеру в геноме антибиотикорезистентного штамма Corynebacterium diphtheria (NC_016800.1)

Table 3. Diversity of phage protospacers corresponding to the first spacer in the genome of antibiotic-resistant strain Corynebacterium diphtheria (NC_016800.1)

Спейсер	Протоспейсер	Номер доступа GenBank
Spacer 1_1	Corynebacterium phage Stiles	MK977710
	CorynebacteriumphageDina	MK977706
	CorynebacteriumphageStAB	MK937613
	CorynebacteriumphageTroy	MH926061
	CorynebacteriumphageLederberg	MK977712
	CorynebacteriumphageBran	MK977714
	CorynebacteriumphageSamW	MH727560

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, данный подход позволяет провести подробный биоинформационный и сравнительный анализ структур CRISPR-Cas систем бактерий, определить их тип, дать полную характеристику спейсерных структур CRISPR-кассет исследуемых бактерий. Скрининг фагов через спейсерные последовательности CRISPR-кассет в геномах штаммов *Corynebacterium diphtheriae* позволил нам получить информацию о генетических взаимодействиях между представителями разных видов внутри одного типа. Данные исследования также позволили определить предполагаемую устойчивость CRISPR-Cas систем исследуемых штаммов к обнаруженным фагам. Дальнейшее применение разработанного биоинформационного алгоритма анализа дает возможность отбора таргетных фагов и в перспективе позволит создать платформу для разработки технологий персонифицированной фаготерапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ивашко С. Нобелевская премия по химии досталась открывателям самого быстрого и точного метода генетического редактирования // Коммерсантъ Наука. 2020. N 33. С. 5.

2. Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria // Nucleic Acids Research. 2013. Vol. 41. Issue 8. P. 4360–4377. https://doi.org/10.1093/nar/gkt157

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. Issue 8. P. 2551–2561. https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0

4. Bhaya D., Davison M., Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation // Annual Review of Genetics. 2011. Vol. 45. P. 273–297. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430

5. 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. Issue 11. P. 722–736. https://doi.org/10.1038/nrmicro3569

6. 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. Issue 3. P. 169–182. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184

7. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems // Current Opinion in Microbiology. 2017. Vol. 37. P. 67–78. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008

8. Hille F., Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance // Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences. 2016. Vol. 371. Issue 1707. https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0496

9. Byard R.W. Diphtheria – 'The strangling angel' of children // Journal of Forensic and Legal Medicine. 2013. Vol. 20. Issue 2. P. 65–68. https://doi.org/10.1016/j.jflm.2012.04.006

10. Zasada A.A. *Corynebacterium diphtheriae* infections currently and in the past // Przegląd Epidemiologiczny. 2015. Vol. 69. Issue 3. P. 439–444.

11. Mattos-Guaraldi A.L., Moreira L.O., Damasco P.V., Hirata R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world-an overview // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2003. Vol. 98. Issue 8. P. 987–993. https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000800001

12. Zasada A.A. Nontoxigenic highly pathogenic clone of *Corynebacterium diphtheriae,* Poland, 2004-2012 // Emerging Infectious Diseases. 2013. Vol. 19. Issue 11. P. 1870–1872. https://doi.org/10.3201/eid1911.130297

13. Kolodkina V., Titov L., Sharapa T., Grimont F., Grimont P.A.D., Efstratiou A. Molecular epidemiology of C. diphtheriae strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus // BMC Infectious Diseases. 2006. Vol. 6. P. 129–137. https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-129

14. Sharma N.C., Efstratiou A., Mokrousov I., Mutreja A., Das B., Ramamurthy T. Diphtheria // Nature Reviews Disease Primers. 2019. Vol. 5. Issue 1. P. 81. https://doi.org/10.1038/s41572-019-0131-y

15. Paveenkittiporn W., Sripakdee S., Koobkratok O., Sangkitporn S., Kerdsin A. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of outbreak-associated Corynebacterium diphtheriae in Thai-

land, 2012 // Infection, Genetics and Evolution. 2019. Vol. 75. P. 104007. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104007

16. Kneen R., Pham N.G., Solomon T., Tran T.M., Nguyen T.T., Tran B.L., et al. Penicillin vs. erythromycin in the treatment of diphtheria // Clinical Infectious Diseases. 1998. Vol. 27. Issue 4. P. 845–850. https://doi.org/10.1086/514959

17. Pereira G.A., Pimenta F.P., Wink dos Santos F.R., Damasco P.V., Hirata R., Mattos-Guaraldi A.L. Antimicrobial resistance among Brazilian Corynebacterium diphtheriae strains // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2008. Vol. 103. Issue 5. P. 507–510. https://doi.org/10.1590/s0074-0276200 8000500019

18. Husada D., Soegianto S.D.P., Kurniawati I.S., Hendrata A.P., Irawan E., Kartina L., et al. First-line antibiotic susceptibility pattern of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Indonesia // BMC Infectious Diseases. 2019. Vol. 19. Issue 1. P. 1049. https://doi.org/10.1186/s12879-019-4675-y

19. Hennart M., Panunzi L.G., Rodrigues C., Gaday Qu., Baines S.L., Barros-Pinkelnig M., et al. Population genomics and antimicrobial resistance in Corynebacterium diphtheria // Genome Medicine. 2020. Vol. 12. Issue 1. P. 107. https://doi.org/10.1186/s13073-020-00805-7

REFERENCES

1. Ivashko S. The Nobel prize in chemistry went to the discoverers of the fastest and most accurate method of genetic editing. *Kommersant" Nauka*. 2020;33:5. (In Russian)

2. Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Research.* 2013;41(8):4360–4377. https://doi.org/10.1093/nar/gkt157

3. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. 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. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Review of Genetics*. 2011;45:273–297. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430

5. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2015;13(11):722–736. https://doi.org/10.1038/nrmicro3569

6. 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

7. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*. 2017;37:67–78. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008

8. 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

9. Byard RW. Diphtheria – 'The strangling angel' of children. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 2013;20(2):65–68. https://doi.org/10.1016/j.jflm.2012.04.006

10. Zasada AA. *Corynebacterium diphtheriae* infections currently and in the past. *Przegląd Epidemiologiczny.* 2015;69(3):439–444.

11. Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV, Hirata R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world-an overview. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2003;98(8):987–993. https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000800001

12. Zasada AA. Nontoxigenic highly pathogenic clone of *Corynebacterium diphtheriae,* Poland, 2004-2012. *Emerging Infectious Diseases*. 2013;19(11):1870–1872. https://doi.org/10.3201/eid1911.130297

13. Kolodkina V, Titov L, Sharapa T, Grimont F, Grimont PAD, Efstratiou A. Molecular epidemiology of C. diphtheriae strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus. *BMC Infectious Diseases*. 2006;6:129–137. https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-129

14. Sharma NC, Efstratiou A, Mokrousov I, Mutreja A, Das B, Ramamurthy T. Diphtheria. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019;5(1):81. https://doi.org/10.1038/s41572-019-0131-y

15. Paveenkittiporn W, Sripakdee S, Koobkratok O, Sangkitporn S, Kerdsin A. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of outbreak-associated Corynebacterium diphtheriae in Thailand, 2012. *Infection, Genetics and Evolution.* 2019;75:104007. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104007

16. Kneen R, Pham NG, Solomon T, Tran TM, Nguyen TT, Tran BL, et al. Penicillin vs. erythromycin in the treatment of diphtheria. *Clinical Infectious Diseases.* 1998;27(4):845–850. https://doi.org/10.1086/514959

17. Pereira GA, Pimenta FP, Wink dos Santos FR, Damasco PV, Hirata R, Mattos-Guaraldi AL. Antimicrobial resistance among Brazilian Corynebacterium diphtheriae strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(5):507–510. https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000500019

18. Husada D, Soegianto SDP, Kurniawati IS, Hendrata AP, Irawan E, Kartina L, et al. First-line antibiotic susceptibility pattern of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Indonesia. *BMC Infectious Diseases.* 2019;19(1):1049. https://doi.org/10.1186/s12879-019-4675-y

19. Hennart M, Panunzi LG, Rodrigues C, Gaday Qu, Baines SL, Barros-Pinkelnig M, et al. Population genomics and antimicrobial resistance in Corynebacterium diphtheria. *Genome Medicine*. 2020;12(1):107. https://doi.org/10.1186/s13073-020-00805-7

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Степаненко Лилия Александровна,
к.м.н., старший научный сотрудник
лаборатории молекулярной вирусологии
и биотехнологии,
НИИ биомедицинских технологий,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: steplia@mail.ru

Джиоев Юрий Павлович,
к.б.н., заведующий лабораторией
молекулярной вирусологии и биотехнологии,
НИИ биомедицинских технологий,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
e-mail: alanir07@mail.ru

Злобин Владимир Игоревич,
д.м.н., академик РАН,
заведующий кафедрой микробиологии,
вирусологии и иммунологии,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
e-mail: vizlobin@mail.ru

Борисенко Андрей Юрьевич,
ассистент кафедры микробиологии,
вирусологии и иммунологии,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
e-mail: 89500720225@mail.ru

Саловарова Валентина Петровна,
д.б.н., профессор, заведующая кафедрой
физико-химической биологии,
Иркутский государственный университет,
664011, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5,
Российская Федерация,
e-mail: vsalovarova@gmail.com

Арефьева Надежда Александровна,
студентка,
Иркутский государственный университет,
664011, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5,
Российская Федерация,
e-mail: arefieva.n4@gmail.com

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Lilia A. Stepanenko,
Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher,
Laboratory of Molecular Virology
and Biotechnology,
Research Institute of Biomedical Technologies,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
✉ e-mail: steplia@mail.ru

Yuri P. Dzhioev,
Cand. Sci. (Biology), Head of the Laboratory
of Molecular Virology and Biotechnology,
Research Institute of Biomedical Technologies,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation?
e-mail: alanir07@mail.ru

Vladimir I. Zlobin,
Dr. Sci. (Medicine), Academician of RAS,
Head of the Department of Microbiology,
Virology and Immunology,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: vizlobin@mail.ru

Andrey Yu. Borisenko,
Postgraduate, Teaching Assistant,
Department of Microbiology, Virology
and Immunology,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: 89500720225@mail.ru

Valentina P. Salovarova,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Head of the Department of Physical
and Chemical Biology,
Irkutsk State University,
5, Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664011,
Russian Federation,
e-mail: vsalovarova@gmail.com

Nadezhda A. Arefieva,
Student,
Irkutsk State University,
5, Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664011,
Russian Federation,
e-mail: arefieva.n4@gmail.com

Семинский Игорь Жанович,
д.м.н., профессор, заведующий кафедрой паталогической физиологии
и клинической лабораторной диагностики,
Иркутский государственный медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
e-mail: i.seminskiy@ismu.baikal.ru

Малов Игорь Владимирович,
д.м.н., профессор, ректор, заведующий кафедрой инфекционных болезней,
Иркутский государственный медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
e-mail: i.malov@ismu.baikal.ru

Igor Zh. Seminsky,
Dr. Sci. (Medicine), Professor,
Head of the Department of Pathological Physiology
and Clinical Laboratory Diagnostics,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: i.seminskiy@ismu.baikal.ru

Igor V. Malov,
Dr. Sci. (Medicine), Professor, Rector,
Head of the Department of Infectious Diseases,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: i.malov@ismu.baikal.ru

Заявленный вклад авторов
Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors
The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

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

Поступила в редакцию 16.12.2020.
Одобрена после рецензирования 18.02.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.

The article was submitted 16.12.2020.
Approved after reviewing 18.02.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.