

IN SILICO СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ CRISPR-СИСТЕМ ШТАММОВ YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS, ВЫЗЫВАЮЩИХ РАЗЛИЧНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА

Н.П. Перетолчина^{1,2}, Ю.П. Джиоев¹, А.Ю. Борисенко¹, Л.А. Степаненко¹, Е.А. Воскресенская³, В.Т. Климов², О.Н. Рева⁴, В.И. Злобин¹

¹Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия

²Иркутский научно-исследовательский противочумный институт, Иркутск, Россия

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

⁴Центр биоинформатики и вычислительной биологии, Университет Претории, Претория, Южно-Африканская Республика

In silico comparative analysis of crispr-cas system structures of Yersinia pseudotuberculosis causing different clinical manifestations of pseudotuberculosis

N.P. Peretolchina^{1,2}, Yu.P. Dzhioev¹, A.Yu. Borisenko¹, L.A. Stepanenko¹, E.A. Voskresenskaya³, V.T. Klimov², O.N. Reva⁴, V.I. Zlobin¹

¹Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

²Irkutsk Research Antiplague Institute, Irkutsk, Russia

³Saint-Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Pasteur, Saint-Petersburg, Russia

⁴Center for Bioinformatics and Computational Biology, Department of Biochemistry, University of Pretoria, Pretoria, South Africa

Резюме

Цель: сравнить CRISPR-системы двух штаммов, выделенных на различных территориях от пациентов с разными клиническими проявлениями псевдотуберкулеза, и определить специфические различия в спейсерном составе и в структуре cas-белков.

Материалы и методы: проанализированы полногеномные последовательности штаммов *Y. pseudotuberculosis* IP329353 (NC_006155) и IP31758 (NC_009708) различного географического происхождения, выделенные от больных с псевдотуберкулезом с симптомами гастроэнтерита и системными проявлениями инфекции соответственно. Поиск, идентификация и анализ CRISPR систем выполнены с использованием онлайн-приложений CRISPROne, CRISPRDetect и CRISPRTarget.

Результаты: в геноме исследуемых штаммов обнаружены CRISPR-Cas системы, включающие один набор cas-генов и несколько CRISPR-локусов, значительно удаленных друг от друга. В геноме штамма *Y. pseudotuberculosis* IP329353 присутствует три локуса: YP1, находящийся в непосредственной близости от cas-генов, YP2 и YP3. CRISPR-Cas система *Y. pseudotuberculosis* IP31758 представлена только двумя кассетами: YP1 и YP3. CRISPR системы исследуемых штаммов не имеют одинаковых спейсеров.

Заключение: CRISPR-Cas системы исследованных штаммов отличаются количеством CRISPR-локусов, их спейсерным составом и структурой cas-белков. Полученные результаты определяют перспективу использования CRISPR-локусов в качестве специфических молекулярных маркеров штаммов при изучении внутривидового разнообразия и эволюции *Y. pseudotuberculosis*.

Ключевые слова: CRISPR-Cas система, *Y. pseudotuberculosis*, псевдотуберкулез.

Abstract

The aim of this research was to analyze and compare CRISPR loci and cas-proteins of Yersinia pseudotuberculosis strains isolated in different territories from patients with various clinical manifestations of pseudotuberculosis.

Materials and Methods. Complete genomes of *Y. pseudotuberculosis* IP329353 (NC_006155) and IP31758 (NC_009708) were obtained from NCBI Nucleotide Database. Strains were isolated from patients with gastroenteritis and systemic infection respectively. Search, identification, and analysis of CRISPR systems were carried out by online-tools CRISPROne, CRISPRDetect, and CRISPRTarget.

Results. Analyzed strains have CRISPR-Cas systems that include one set of cas-genes and arrays situated at the long distances from each other. We defined three CRISPR arrays in *Y. pseudotuberculosis* IP329353: array YP1 located near cas-genes, arrays YP2 and YP3. CRISPR-Cas system of *Y. pseudotuberculosis* IP31758 includes two arrays – YP1 and YP3. CRISPR systems do not share similar spacers.

Conclusion. CRISPR systems of the analyzed strains differ in CRISPR loci and cas-protein structures that can be used as specific molecular marks of analyzed strains during the study of intra-species variability and evolution of *Y. pseudotuberculosis*.

Key words: CRISPR-Cas system, *Y. pseudotuberculosis*, pseudotuberculosis.

Введение

CRISPR-Cas система (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated proteins, короткие регулярно расположенные палиндромные повторы/CRISPR-ассоциированные белки) является специфическим адаптивным иммунитетом бактерий, действие которого направлено против мобильных генетических элементов (МГЭ). CRISPR-система состоит из CRISPR-локусов и *cas*-генов. CRISPR-локусы представлены набором коротких палиндромных повторов (21-47 пн), разделенных штамм-специфичными спейсерными последовательностями (спейсеры). Данные последовательности комплементарны участкам нуклеиновых кислот фагов и плазмид, с которыми спейсеры способны взаимодействовать и индуцировать разрушение генетического материала МГЭ (рис. 1).

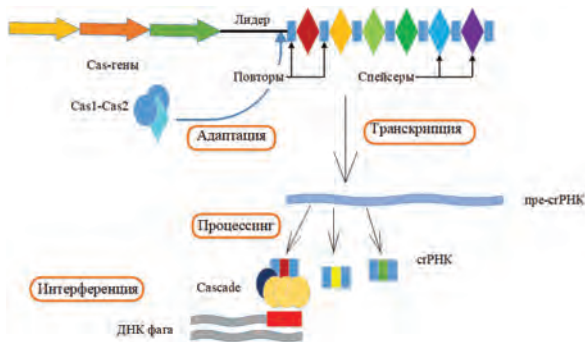


Рис. 1. Структура и принцип функционирования CRISPR-Cas системы первого класса. Во время первичной инфекции бактериофага CRISPR-система с помощью белков *cas1* и *cas2* вырезает и вставляет небольшой фрагмент ДНК бактериофага в начало CRISPR-кассеты бактерии со стороны лидерной последовательности. При вторичном инфицировании бактерии бактериофагом, содержащим интегрированный фрагмент ДНК, запускается транскрипция CRISPR-локуса и синтезируется молекула пре-crRNA, состоящая из всех спейсерных последовательностей и повторов. В процессе созревания пре-crRNA разрезается на фрагменты, включающие в себя одну спейсерную последовательность и фланкирующие её повторы. Зрелая crRNA связывается с комплексом белков, образуя Cascade, эффекторный CRISPR-ассоциированный комплекс противовирусной защиты. Образованная структура узнает протоспейсерную последовательность в геноме бактериофага и активирует нуклеазы, которые разрушают молекулу ДНК бактериофага [11]

При этом *cas*-гены, расположенные в непосредственной близости от кассеты, необходимы для синтеза белков, участвующих в трёх этапах «иммунного ответа» бактерий: адаптации, транскрипции и процессинге CRISPR РНК (crRNA) и интерференции (см. рис. 1) [19]. По структуре и

количеству *cas*-белков, участвующих в узнавании и интерференции чужеродной нуклеиновой кислоты, все CRISPR-системы поделены на 2 класса: системы первого класса образуют комплекс, состоящий из нескольких белков, а системы второго класса используют один белок для узнавания и разрушения нуклеиновой кислоты МГЭ [12].

Представители рода *Yersinia* часто используются исследователями в качестве объекта для изучения меж- и внутривидовой эволюции, так как включают большое число разнообразных патогенных и непатогенных видов: возбудителя особо опасной инфекции – чумы, *Yersinia pestis*, возбудителя псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*, и ряда непатогенных видов иерсиний. Полидетерминантная природа патогенных свойств *Y. pseudotuberculosis* обуславливает многообразие клинических форм инфекции. Известно, что штаммы, циркулирующие на территориях Дальнего Востока, более патогенны, чем европейские штаммы, и вызывают генерализованную форму псевдотуберкулеза, дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку (ДСЛ) [1, 9, 10]. В своих предыдущих публикациях Koskela et al., (2015) и Seecharran et al. (2017) охарактеризовали CRISPR-локусы *Y. pseudotuberculosis* и предположили возможные механизмы приобретения CRISPR/Cas системы и её роль в эволюции бактерии [13, 18].

Цель исследования – сравнение CRISPR-систем двух штаммов, выделенных на различных территориях от пациентов с разными клиническими проявлениями псевдотуберкулеза, и определение специфических различий в спейсерном составе и в структуре *cas*-белков.

Материалы и методы

Изучены полногеномные последовательности штаммов *Y. pseudotuberculosis* IP329353 и IP31758 из базы данных NCBI Nucleotide (NC_006155 и NC_009708 соответственно). Штамм IP329353 выделен от больного псевдотуберкулезом с симптомами гастроэнтерита, штамм IP31758 – на Дальнем Востоке РФ от больного ДСЛ.

Для идентификации CRISPR-локусов и *cas*-генов использованы онлайн-приложения CRISPROne: <http://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone> и CRISPRDetect: http://brownlabtools.otago.ac.nz/CRISPRDetect/predict_crисpr_array.html [7, 20]. Частота встречаемости спейсерных последовательностей в CRISPR-системах штаммов *Y. Pseudotuberculosis*, депонированных в базе данных GenBank и RefSeq, описана посредством алгоритма локального выравнивания и поиска BLAST. Скрининг

фагов и плазмид через спейсерные структуры проводился при помощи онлайн-приложения CRISPRTarget: http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html [6]. Используются следующие критерии для отбора протоспейсерных последовательностей: совпадение нуклеотидов между спейсером и протоспейсером не менее 90% и наличие PAM "GG" со стороны 3'-конца (3'-end PAM-GG-IF, protospacer adjacent motif, мотив, прилежащий к протоспейсеру). Определение профаговых последовательностей в геномах бактерий проводилось через онлайн-приложение PHASTER: <http://phaster.ca> [4].

Результаты и обсуждение

Установлено, что CRISPR-система иерсиний включает в себя от одного до трёх локусов и комплекс *cas*-генов (CRISPR-система первого класса, тип I_F) (рис. 2) [3, 15].



Рис. 2. Структура CRISPR-Cas системы *Y. Pseudotuberculosis*: а) штамм IP32953 и б) штамм IP31758. Белок *cas3f* представлен двумя белками: хеликазой *cas3* и эндонуклеазой *cas2*. Белки *cas1* и *cas2* участвуют в вырезании небольшого фрагмента (протоспейсера) из генетического материала МГЭ и интегрируют его в CRISPR-касsetу. Комплекс Cascade *Y. pseudotuberculosis* образован белками *cas8f*, *cas5f*, *cas6f* и шестью мономерами белка *cas7f*. Cascade узнает чужеродную ДНК и, при наличии мотива, прилежащего к протоспейсеру (PAM, protospacer adjacent motif), и совпадении первых восьми нуклеотидов, активирует белок *cas3f*, который разрезает и запускает деградацию чужеродной нуклеиновой кислоты [5, 14, 15]

CRISPR-системы представлены шестью *cas*-генами и кассетами, количество которых различно: штамм IP32953 имеет три локуса (Y_{P1}, Y_{P2} и Y_{P3}), а штамм IP31758 — два (Y_{P1} и Y_{P3}) (см. рис. 2). Следует отметить, что кассеты расположены в геноме не последовательно и разбросаны по хромосоме, но при этом имеют четкую локализацию между генами: локус Y_{P1} расположен между генами, ответственными за синтез альдо- и кеторедуктазы и образование ионного канала; локус Y_{P2} локализован между генами, отвечающими за метаболизм аминокислот; локус Y_{P3} — между генами транспортного белка и экзонуклеазой. Количество повторов и спейсеров в локусах различно, не было обнаружено гомологичных спейсерных последовательностей в локусах данных штаммов. Последовательности повторов, наоборот, полностью идентичны, несмотря на встречаемость замен в повторах в конце кассеты (рис. 3).



Рис. 3. Консенсусная последовательность повторов штаммов *Y. pseudotuberculosis* IP32953 и IP31758. Размер букв обратно пропорционален частоте замены нуклеотида

Rougach et al. в 2010 показали, что транскрипция кассет начинается с лидерной последовательности, поэтому все CRISPR фрагменты ориентированы со стороны лидерной последовательности [17, 19].

CRISPR-Cas система *Y. pseudotuberculosis* IP32953

В геноме штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 обнаружено три локуса, удаленных друг от друга. Локус Y_{P1} (2965418-2964428) расположен в непосредственной близости от *cas*-генов и состоит из 17 повторов, разделенных 16 спейсерами; локусы Y_{P2} (1284328 – 1284476) и Y_{P3} (1891010 – 1891277) небольшие по длине и включают в себя 2 и 4 спейсера соответственно. Спейсерные последовательности данного штамма обнаружены в локусах CRISPR-систем штаммов *Y. pseudotuberculosis*, находящихся в коллекции Парижского института Пастера (рис. 4A, 4B) [13].

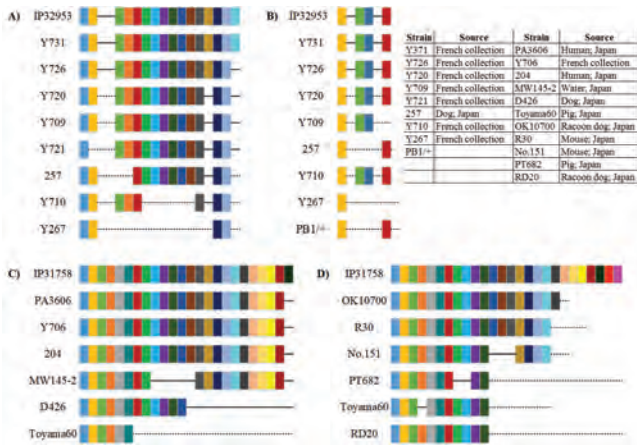


Рис. 4. Встречаемость спейсеров исследуемых CRISPR-систем в геномах *Y. pseudotuberculosis*, доступных в базе данных NCBI Nucleotide: А) CRISPR-локус YP1; В) CRISPR-локус YP3 *Y. pseudotuberculosis* IP32953; С) CRISPR-локус YP1; D) CRISPR-локус YP3 *Y. pseudotuberculosis* IP31758

Скрининг гомологичных последовательностей в геномах бактериофагов и плазмид показал соответствия 8 спейсеров с бактериальными и плазмидными последовательностями (табл. 1).

Как правило, в месте локализации протоспейсера в геноме бактерии обнаружен профаг.

CRISPR-Cas система Y. pseudotuberculosis IP31758

В геноме штамма *Y. pseudotuberculosis* IP31758 обнаружено только 2 локуса: YP1 и YP3. Локус YP1 (1786721 – 1788193) также локализован в непосредственной близости от *cas*-генов, локус YP3 (2726751 – 2728338) удален от них. Локус YP2 идентифицирован программными методами. Но спейсеров в локусах представлено больше: 24 спейсера в локусе YP1 и 26 в локусе YP3. Использование алгоритма сравнения BLASTn позволило выявить гомологичные спейсерные последовательности в CRISPR-системах штаммах, циркулирующих пре-

Таблица 1

Соответствующие протоспейсерные последовательности спейсерам CRISPR-Cas-системы *Y. pseudotuberculosis* IP32953

Спейсер	PAM-3'	Протоспейсер	Бактериофаг	Совпадение
YP1-1	GG	CP009780 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> PB1/+	NC_022747, <i>Vibrio</i> phage VPUSM 8 (intact)	1,00
YP1-4		CP009801 <i>Yersinia intermedia</i> Y228	NC_016158, <i>Escherichia</i> phage HK639 (intact)	1,00
		CP007448 <i>Yersinia enterocolitica</i> LC20	NC_022749, <i>Shigella</i> phage SfIV (intact)	1,00
		CP009364 <i>Yersinia frederiksenii</i> Y225	NC_019927, <i>Cronobacter</i> phage ENT47670 (intact)	0,97
		CP009997 <i>Yersinia kristensenii</i> Y231	NC_019927, <i>Cronobacter</i> phage ENT47670 (intact)	0,97
YP1-15	GG	CP009792 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> YPIII	NC_005886, <i>Burkholderia</i> phage VcepB1A (questionable)	0,97
		CP007230 <i>Yersinia similis</i> strain 228	NC_005886, <i>Burkholderia</i> phage VcepB1A (questionable)	0,97
YP1-16		CP009792 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> YPIII	NC_005886, <i>Burkholderia</i> phage VcepB1A (questionable)	0,97
		CP007230 <i>Yersinia similis</i> strain 228	NC_005886, <i>Burkholderia</i> phage VcepB1A (incomplete)	0,97
YP2-1	GG	NC_009705 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP31758 plasmid_153kb		0,91
YP2-2	GG	NZ_CP028488 <i>Yersinia massiliensis</i> strain GTA plasmid unnamed1		0,97
YP3-1	GG	CP013913.1 <i>Serratia fonticola</i> strain GS2	NC_019501, <i>Enterobacteria</i> phage IME10 (intact)	0,94
		CP011602.1 <i>Kluyvera intermedia</i> strain CAV1151	NC_011976, <i>Salmonella</i> phage epsilon34 (intact)	0,91
YP3-4	GG	CP007230 <i>Yersinia similis</i> strain 228	NC_005886, <i>Burkholderia</i> phage VcepB1A (incomplete)	0,97

PAM-3' – protospacer adjacent motif, мотив, прилегающий к протоспейсеру. CRISPR-Cas система типа I/F узнает мотив 'GG'.

имущественно на территориях Дальнего Востока (Япония) (рис. 4С, 4D). В результате скрининга протоспейсеров в геномах бактериофагов и плазмид обнаружено девять соответствий спейсеров с бактериальными и фаговыми последовательностями. Протоспейсеров в плазмидах не обнаружено (табл. 2).

В данной работе проанализированы два штамма *Y. pseudotuberculosis*, принципиально различающиеся между собой. *Y. pseudotuberculosis* IP32953 был выделен на территории Франции, штамм

IP31758 – на территории Дальнего Востока России. Оба штамма выделены от больных, но клинические проявления псевдотуберкулеза отличаются по тяжести: штамм IP32953 вызывает типичную картину псевдотуберкулеза с преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта; штамм IP31758 является возбудителем ДСЛ [9].

Koskela et al. (2015) и Seecharran et al. (2017) охарактеризовали структуру и механизм эволюции CRISPR-систем иерсиний и выдвинули гипотезу о вертикальном переносе систем, в пользу кото-

Таблица 2

Соответствующие протоспейсерные последовательности спейсерам CRISPR-Cas-системы *Y. pseudotuberculosis* IP31758

Спейсер	ПАМ-3'	Протоспейсер	Бактериофаг	Совпадение
YP1-12		CP010067 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> str. PA3606		0,97
YP1-14	GG	CP009786 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> strain 1	NC_003444, <i>Enterobacteria</i> phage SfV (intact)	1,00
	GG	CP009792 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> YPIII	NC_021857, <i>Shigella</i> phage SfII (intact)	1,00
YP1-20	GG	CP009712 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP32953	NC_022747, <i>Vibrio</i> phage VPUSM 8 (intact)	0,97
		CP009997 <i>Yersinia kristensenii</i> Y231	NC_019927, <i>Cronobacter</i> phage ENT47670 (intact)	0,94
YP3-4	GG	CP010067 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> PA3606	NC_028699, <i>Salmonella</i> phage SEN34 (intact)	1,00
	GG	CP008943 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC6904	NC_028699, <i>Salmonella</i> phage SEN34 (intact)	0,94
YP3-5		CP010067 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> PA3606	NC_028699, <i>Salmonella</i> phage SEN34 (intact)	1,00
		CP010067 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> PA3606	NC_019932, <i>Erwinia</i> phage ENT90 (intact)	0,94
		CP009780 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> PB1/+	NC_009542, <i>Aeromonas</i> phage phiO18P (intact)	0,97
YP3-10	GG	CP009757 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> MD67	NC_005886, <i>Burkholderia</i> phage BcepB1A (questionable)	0,97
		CP009757 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> MD67	NC_009542, <i>Aeromonas</i> phage phiO18P (intact)	0,97
		CP009846 <i>Yersinia enterocolitica</i> 8081	NC_022747, <i>Vibrio</i> phage VPUSM 8 (intact)	1,00
YP3-17	GG	CP009780 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> PB1/+	NC_022747, <i>Vibrio</i> phage VPUSM 8 (intact)	1,00
		CP009781 <i>Yersinia aldovae</i> 670-83	NC_009542, <i>Aeromonas</i> phage phiO18P (intact)	1,00
		CP007230 <i>Yersinia similis</i> strain 228	NC_016160, <i>Escherichia</i> phage HK75 (intact)	1,00
YP3-20	GG	CP009780 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> PB1/+	NC_022747, <i>Vibrio</i> phage VPUSM 8 (intact)	1,00
	GG	CP009781 <i>Yersinia aldovae</i> 670-83	NC_009542, <i>Aeromonas</i> phage phiO18P (intact)	1,00
	GG	CP007448 <i>Yersinia enterocolitica</i> LC20	NC_022747, <i>Vibrio</i> phage VPUSM 8 (intact)	1,00

рой также свидетельствует отсутствие гомологичных спейсеров в CRISPR-Cas системах изученных штаммов [13, 18]. Кроме того, спейсерные последовательности штамма IP31758 специфичны преимущественно для CRISPR-Cas систем штаммов, выделенных на других территориях Дальнего Востока (Япония) (см. рис. 4), что согласуется с данными о различиях генетических детерминант вирулентности штаммов, распространенных в этом и других регионах мира [10]. Данные различия в составе локусов иерсиний могут быть использованы для идентификации и типирования штаммов.

Основная роль CRISPR-Cas систем — защита бактерий от внедрения чужеродных МГЭ. Поэтому 72 спейсера исследованных систем проанализированы с целью определения оригинальных протоспейсерных последовательностей. В результате выявлено всего 8 и 9 совпадений протоспейсер-спейсер систем штаммов *Y. pseudotuberculosis* IP32953 и *Y. pseudotuberculosis* IP31758 соответственно. Невозможность идентификации большинства спейсеров может быть объяснена:

- отсутствием секвенированных последовательностей в базе данных NCBI Nucleotide;
- частыми точечными мутациями в протоспейсерных последовательностях бактериофагов, которые позволяют им избежать узнавание фрагмента ДНК активным комплексом [8].

Однако отмечено, что спейсеры наиболее часто отбираются CRISPR-системой из консервативных частей фагов, например фрагменты гена, кодирующего структурный белок хвоста бактериофага. В результате при скрининге протоспейсеров в геномах бактериофагов встречаются совпадения не только с оригинальным бактериофагом, но и с другими вирусами, имеющими эту же последовательность ДНК. Данный факт, безусловно, затрудняет определение источника спейсера.

Большая часть протоспейсеров обнаружена в бактериальных геномах. Данные участки генома бактерий, как правило, соответствуют геномам профагов. Как известно, лизогенные бактериофаги способны спонтанно активироваться и образовывать новые вирусные частицы, способные к инфицированию бактерий [2]. Это приводит к тому, что часть бактериальных клеток может приобрести устойчивость к заражению лизогенными бактериофагами.

Плазмидные последовательности также могут быть источником спейсеров CRISPR-систем. В частности, локус YP2 штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 состоит из двух спейсеров, один из которых на 91% совпадает с фрагментом плазмиды pVM82 *Y. pseudotuberculosis* IP31758. Данная плазида кодирует несколько факторов патогенности, участвующих в развитии инфекционного процесса [9, 16]. Возможной причиной приобретения дан-

ного спейсера является наличие в геноме плазмиды гена интегразы бактериофага, который является свидетелем предшествующих явлений горизонтального переноса в плазмидной последовательности. Таким образом, можно предположить, что приобретение спейсера к данной плазмиде может являться точкой расхождения штаммов иерсиний.

Недавнее открытие CRISPR-систем у бактерий привело к развитию многих практических направлений в бактериологии и медицине: определение устойчивости бактерий к бактериофагам, типирование штаммов, редактирование геномов и т.д. Более подробное изучение систем позволит использовать принципы их функционирования более эффективно.

Результаты проведенного исследования являются основой для использования CRISPR-типирования при мониторинге циркулирующих штаммов на отдельных территориях и выявления возможной связи структурно-функциональных характеристик сайтов CRISPR-Cas систем с клиническими проявлениями иерсиниозов.

Литература

1. Сомова, Л. М. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка: формирование представлений о патоморфогенезе «новой» болезни / Л. М. Сомова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. — 2017. — № 3 (70).
2. Каттер, Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. — 2012.
3. Перетолчина Н. П. Биоинформационный анализ CRISPR/Cas системы штамма *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 / Н. П. Перетолчина [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. — 2016. — Т. 1. — № 5 (111).
4. Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic acids research*, 44(W1), W16-W21.
5. Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular cell*, 54(2), 234-244.
6. Biswas, A., Gagnon, J. N., Brouns, S. J., Fineran, P. C., & Brown, C. M. (2013). CRISPRTarget: bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets. *RNA biology*, 10(5), 817-827.
7. Biswas, A., Staals, R. H., Morales, S. E., Fineran, P. C., & Brown, C. M. (2016). CRISPRDetect: a flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC genomics*, 17(1), 356.
8. Datsenko, K. A., Pougach, K., Tikhonov, A., Wanner, B. L., Severinov, K., & Semenova, E. (2012). Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nature communications*, 3, 945.
9. Eppinger, M., Rosovitz, M. J., Fricke, W. F., Rasko, D. A., Kokorina, G., Fayolle, C., & Ravel, J. (2007). The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. *PLoS Genet*, 3(8), e142.
10. Fukushima H, Matsuda Y, Seki R, Tsubokura M, Takeda N, Shubin F.N., Paik IK, Zheng XB. (2001). Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high-

pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3541-3547.

11. Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, 172(6), 1239-1259.

12. Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current opinion in microbiology*, 37, 67-78.

13. Koskela, K. A., Mattinen, L., Kalin Mänttari, L., Vergnaud, G., Gorgé, O., Nikkari, S., & Skurnik, M. (2015). Generation of a CRISPR database for *Yersinia pseudotuberculosis* complex and role of CRISPR based immunity in conjugation. *Environmental microbiology*, 17(11), 4306-4321.

14. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., & Horvath, P. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 722.

15. Medina-Aparicio, L., Dávila, S., Rebollar-Flores, J. E., Calva, E., & Hernández-Lucas, I. (2018). The CRISPR-Cas system in Enterobacteriaceae. *Pathogens and disease*.

16. Nörenberg, D., Wieser, A., Magistro, G., Hoffmann, C., Meyer, C., Messerer, M., & Schubert, S. (2013). Molecular analysis of a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain containing virulence protein of *Y. pseudotuberculosis* among Far East scarlet-like fever serotype I strains. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8), 583-594.

17. Pougach, K., Semenova, E., Bogdanova, E., Datsenko, K. A., Djordjevic, M., Wanner, B. L., & Severinov, K. (2010). Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 77(6), 1367-1379.

18. Seecharran, T., Kalin-Manttari, L., Koskela, K., Nikkari, S., Dickins, B., Corander, J., Skurnik, M., & McNally, A. (2017). Phylogeographic separation and formation of sexually discrete lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbial genomics*, 3(10).

19. Westra, E. R., Buckling, A., & Fineran, P. C. (2014). CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nature reviews Microbiology*, 12(5), 317-326.

20. Zhang, Q., & Ye, Y. (2017). Not all predicted CRISPR-Cas systems are equal: isolated cas genes and classes of CRISPR like elements. *BMC bioinformatics*, 18(1), 92.

References

1. Somova, L.M. (2017). Far eastern scarlet-like fever: formation of representations about pathomorphogenesis of «new» disease. *Health. Medical ecology. Science*, 3 (70).

2. Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (Eds.). (2004). *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press.

3. Peretolchina, N.P., Dzhioev, Y.P., Borisenko, A.Y., Voskresenskaya, E.A., Paramonov, A.I., Stepanenko, L.A., Kolbaseeva O.V., Zlobin, V.I. (2016). Bioinformatical analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 CRISPR/Cas system. *Acta Biomedica Scientifica*, 1(5 (111)).

4. Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic acids research*, 44(W1), W16-W21.

5. Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular cell*, 54(2), 234-244.

6. Biswas, A., Gagnon, J. N., Brouns, S. J., Fineran, P. C., & Brown, C. M. (2013). CRISPRTarget: bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets. *RNA biology*, 10(5), 817-827.

7. Biswas, A., Staals, R. H., Morales, S. E., Fineran, P. C., & Brown, C. M. (2016). CRISPRDetect: a flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC genomics*, 17(1), 356.

8. Datsenko, K. A., Pougach, K., Tikhonov, A., Wanner, B. L., Severinov, K., & Semenova, E. (2012). Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nature communications*, 3, 945.

9. Eppinger, M., Rosovitz, M. J., Fricke, W. F., Rasko, D. A., Kokorina, G., Fayolle, C., & Ravel, J. (2007). The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. *PLoS Genet*, 3(8), e142.

10. Fukushima H, Matsuda Y, Seki R, Tsubokura M, Take-da N, Shubin F.N., Paik IK, Zheng XB. (2001). Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3541-3547.

11. Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, 172(6), 1239-1259.

12. Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current opinion in microbiology*, 37, 67-78.

13. Koskela, K. A., Mattinen, L., Kalin Mänttari, L., Vergnaud, G., Gorgé, O., Nikkari, S., & Skurnik, M. (2015). Generation of a CRISPR database for *Yersinia pseudotuberculosis* complex and role of CRISPR based immunity in conjugation. *Environmental microbiology*, 17(11), 4306-4321.

14. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., & Horvath, P. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 722.

15. Medina-Aparicio, L., Dávila, S., Rebollar-Flores, J. E., Calva, E., & Hernández-Lucas, I. (2018). The CRISPR-Cas system in Enterobacteriaceae. *Pathogens and disease*.

16. Nörenberg, D., Wieser, A., Magistro, G., Hoffmann, C., Meyer, C., Messerer, M., & Schubert, S. (2013). Molecular analysis of a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain containing virulence protein of *Y. pseudotuberculosis* among Far East scarlet-like fever serotype I strains. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8), 583-594.

17. Pougach, K., Semenova, E., Bogdanova, E., Datsenko, K. A., Djordjevic, M., Wanner, B. L., & Severinov, K. (2010). Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 77(6), 1367-1379.

18. Seecharran, T., Kalin-Manttari, L., Koskela, K., Nikkari, S., Dickins, B., Corander, J., Skurnik, M., & McNally, A. (2017). Phylogeographic separation and formation of sexually discrete lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbial genomics*, 3(10).

19. Westra, E. R., Buckling, A., & Fineran, P. C. (2014). CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nature reviews Microbiology*, 12(5), 317-326.

20. Zhang, Q., & Ye, Y. (2017). Not all predicted CRISPR-Cas systems are equal: isolated cas genes and classes of CRISPR like elements. *BMC bioinformatics*, 18(1), 92.

Авторский коллектив:

Перетолчина Надежда Павловна – аспирант Иркутского государственного медицинского университета; лаборант-исследователь Иркутского научно-исследовательского противочумного института; тел.: 8(3952) 24-30-16; 8(3952)22-01-43, e-mail: nadine1lenz@gmail.com

Джиоев Юрий Павлович – ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета, к.б.н.; тел.: 8(3952)24-29-86, e-mail: alanir07@mail.ru

Борисенко Андрей Юрьевич – аспирант Иркутского государственного медицинского университета; тел.: 8(3952)24-30-16, e-mail: 89500720225@mail.ru

Степаненко Лилия Александровна – старший научный сотрудник Научно-исследовательского института биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета, к.м.н.; тел.: 8(3952)24-29-86, e-mail: steplia@mail.ru

Воскресенская Екатерина Александровна – ведущий научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии, руководитель Российского референс-центра по мониторингу иерсиниозов Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, к.б.н.; тел.: 8(812)232-94-85, e-mail: tsenevapasteur@yandex.ru

Климов Валерий Тимофеевич – старший научный сотрудник отдела эпидемиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института, к.б.н.; тел.: 8(3952)22-01-43, e-mail: 41klimov@mail.ru

Рева Олег Николаевич – доцент кафедры биохимии Центра биоинформатики и вычислительной биологии Университета Претории, PhD; тел.: +27-12-420-58-10, e-mail: oleg.reva@up.ac.za

Злобин Владимир Игоревич – заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, директор Научно-исследовательского института биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета, д.м.н., академик РАН; тел.: 8(3952)24-30-16, e-mail: vizlobin@mail.ru