

УДК 577.213

# Сравнительный анализ мишеней спейсеров CRISPR-Cas заквасочных культур

А. А. Фаткулин<sup>1</sup>, Т. А. Чуксина<sup>1</sup>, Н. П. Сорокина<sup>2</sup>, И. Т. Смыков<sup>2</sup>, Е. В. Кураева<sup>2</sup>,  
Е. С. Масежная<sup>2</sup>, К. А. Смагина<sup>2</sup>, М. Ю. Шкурников<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Высшая школа экономики, факультет биологии и биотехнологии, Москва, 101000 Россия

<sup>2</sup>Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, 109316 Россия

\*E-mail: mshkurnikov@hse.ru

Поступила в редакцию 09.10.2024

Принята к печати 07.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27533

**РЕФЕРАТ** Предприятия молочной промышленности представляют собой уникальную экологическую нишу для бактериофагов молочнокислых бактерий. В ходе эволюции бактерии выработали широкий спектр защитных механизмов, направленных против инфекций, вызванных бактериофагами. Особый интерес представляет система CRISPR-Cas, которая позволяет бактериям приобретать специфичную устойчивость к определенным бактериофагам. В представленной работе изучены системы CRISPR-Cas молочнокислых бактерий. Особое внимание было уделено специфичности спейсеров CRISPR-кассет. Системы CRISPR-Cas выявлены в геномах 43% исследованных молочнокислых бактерий. Кроме того, лишь 13.1% от общего числа спейсеров CRISPR-кассет совпадали с геномами бактериофагов, что свидетельствует о том, что многие из предсказанных спейсеров либо не имеют известных фаговых мишеней, либо направлены против других видов мобильных генетических элементов, например, плазмид.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** бактериофаг, CRISPR-Cas, сыроделие, заквасочные культуры, единое здоровье.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** R-M – система рестрикции-модификации; Abi – система абортирования фаговой инфекции.

## ВВЕДЕНИЕ

В процессе производства ферментированных молочных продуктов применяются заквасочные культуры, которые способствуют сквашиванию молока и формированию продукта с характерными текстурными, ароматическими и вкусовыми свойствами [1]. Однако молочнокислые бактерии могут подвергаться заражению бактериофагами [2], поскольку предприятия молочной промышленности представляют собой уникальную экологическую нишу для бактериофагов молочнокислых бактерий, содержащихся в сыром молоке [3].

В ходе эволюции у бактерий сформировался широкий спектр защитных механизмов, направленных против инфекций, вызванных бактериофагами. К таким механизмам относятся системы abortивной инфекции (Abi), рестрикции-модификации (R-M) и CRISPR-Cas [4]. Особый интерес к системам CRISPR-Cas обусловлен их адаптивной природой, которая позволяет бактериям приобретать и сохранять специфичную устойчивость к определенным

бактериофагам [5]. CRISPR-Cas-опосредованный иммунитет обнаружен примерно у половины секвенированных бактерий, а также у большинства архей [6], что делает его одним из ключевых элементов антивирусной защиты прокариот.

В настоящее время выделяют два класса систем CRISPR-Cas, представленных шестью типами (I–VI), которые различаются по своим механизмам и компонентам [6]. Несмотря на такое разнообразие, все системы CRISPR-Cas обладают рядом характерных черт. Основным элементом каждой системы CRISPR-Cas является CRISPR-локус. Этот локус содержит CRISPR-ассоциированные (cas) гены, ответственные за взаимодействие с чужеродными нуклеиновыми кислотами, а также CRISPR-кассету: короткие палиндромные повторяющиеся последовательности ДНК, разделенные уникальными вставками – спейсерами. Спейсеры представляют собой фрагменты чужеродной ДНК, интегрированные в бактериальный геном в результате предшествующей инфекции [5]. Они определяют последователь-

ность, которую будут распознавать нуклеазы Cas, и, как следствие, играют ключевую роль в иммунитете, опосредованном CRISPR-Cas. Большинство спейсеров имеют небольшую длину, например, для подтипов I-E и I-F характерны спейсеры длиной 31–33 п.н., а для I-B, I-C, I-D и I-U – 34–37 п.н. [7].

Механизм действия системы CRISPR-Cas можно разделить на несколько основных этапов: при попадании в бактериальную клетку чужеродной нуклеиновой кислоты новые спейсеры встраиваются в CRISPR-кассету. Далее спейсеры транскрибируются с образованием предшественников CRISPR-РНК (pre-crRNA), которые затем процессируются в зрелые crRNA и, связываясь с нуклеазами Cas, формируют активный комплекс, способный распознавать и связываться с комплементарной последовательностью чужеродной ДНК или РНК. После связывания с мишенью происходит деградация чужеродного генетического материала, что обеспечивает защиту клетки от повторных инфекций [5]. Для успешной деградации генома бактериофага его участок должен обладать высокой степенью гомологии со спейсером. Например, показано, что наличие трех и более мутаций может привести к почти полной инактивации CRISPR-Cas-иммунитета [8].

В настоящей работе изучены системы CRISPR-Cas молочнокислых бактерий. Особое внимание уделено специфичности спейсеров CRISPR-кассет, что позволило оценить устойчивость исследуемых бактерий к известным бактериофагам.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Геномные последовательности молочнокислых бактерий, а также бактериофагов класса *Caudoviricetes* получены из базы данных NCBI. Геномные данные были предварительно обработаны для удаления дубликатов. Для выявления CRISPR-Cas-систем в бактериальных геномах использовали инструмент PADLOC [9]. Спейсеры в бактериальных геномах предсказывали с помощью MinCED [10], после чего выравнивали с помощью Bowtie2 [11] на последовательности геномов фагов, при выравнивании использовали опции «--end-to-end» и «--very-sensitive». С целью установить функции участков, на которые были выровнены спейсеры, геномы бактериофагов были дополнительно проаннотированы с помощью PharoKka [12]. Для оценки перепредставленности функциональных групп среди мишеней спейсеров для каждой группы рассчитывали долю спейсеров, выровненных на гены этой группы, и долю генов этой группы среди всех генов. Равномерность распределения спейсеров по группам проверяли с использованием точного теста Фишера по принципу «один против всех».

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Из базы данных NCBI были получены последовательности 563 геномов молочнокислых бактерий, принадлежащих к шести видам (табл. 1). Далее в 243 из них с помощью PADLOC выявили системы CRISPR-Cas (табл. 1), что соответствует приблизительно 43% от всех исследуемых геномов. Предсказанные системы CRISPR-Cas относятся к шести различным подтипам: I-B, I-C, I-E, I-G, II-A и II-C (рис. 1). В геномах *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus paracasei* и *Lacticaseibacillus rhamnosus* доминируют системы подтипа II-A, что может косвенно свидетельствовать об их важной роли в защитных механизмах этих видов. Среди штаммов *Lacticaseibacillus casei* распространены подтипы I-C и II-A, в то время как для *Lactobacillus helveticus* характерны подтипы I-B и I-C. В геномах *Propionibacterium freudenreichii* преобладал подтип I-G.

Общее количество предсказанных с помощью MinCED спейсеров в бактериальных геномах составило 6971 (табл. 2), однако многие из них перепредставлены внутри видов. По этой причине количество уникальных спейсеров среди исследуемых видов равно лишь 3477. Распределение длин предсказанных спейсеров (рис. 2) согласуется с ранее опубликованными данными [7]. Последующее выравнивание на геномы 21261 фага класса *Caudoviricetes*, полученные из базы данных NCBI, выявило 916 совпадений (табл. 2), из них только 485 уникальны по последовательности и видовой принадлежности.

Все полученные выравнивания относятся к геномам 69 фагов, описанных ранее как бактериофаги молочнокислых бактерий (рис. 3). Функциональная аннотация геномов фагов показала, что предсказанные спейсеры чаще выравниваются на гены, кодирующие белки хвоста, гены, участвующие в упаковке, и гены, участвующие в метаболизме ДНК (скорректированный  $p$ -value < 0.05) (табл. 3).

### ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании установлено наличие CRISPR-Cas-систем в геномах 43% исследованных молочнокислых бактерий, что подтверждает их важную роль в механизмах защиты этих микроорганизмов от чужеродных нуклеиновых кислот, в том числе от генетического материала бактериофагов. Полученные результаты демонстрируют разнообразие CRISPR-Cas-систем у разных видов молочнокислых бактерий.

Сравнительно низкий процент спейсеров, совпадающих с геномами бактериофагов (лишь 13.1% от общего числа), может свидетельствовать о том,

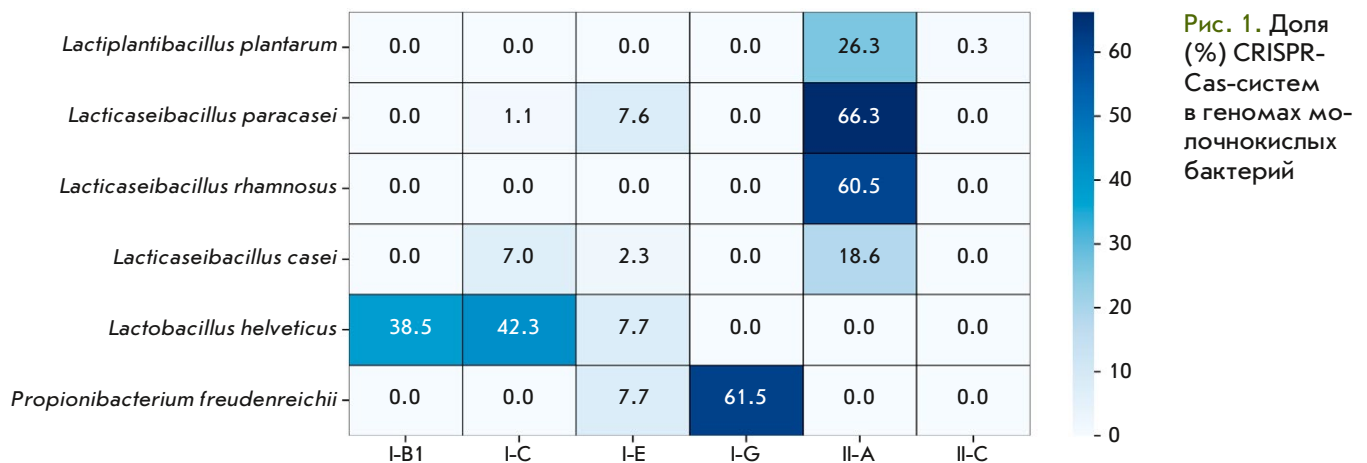


Рис. 1. Доля (%) CRISPR-Cas-систем в геномах молочнокислых бактерий

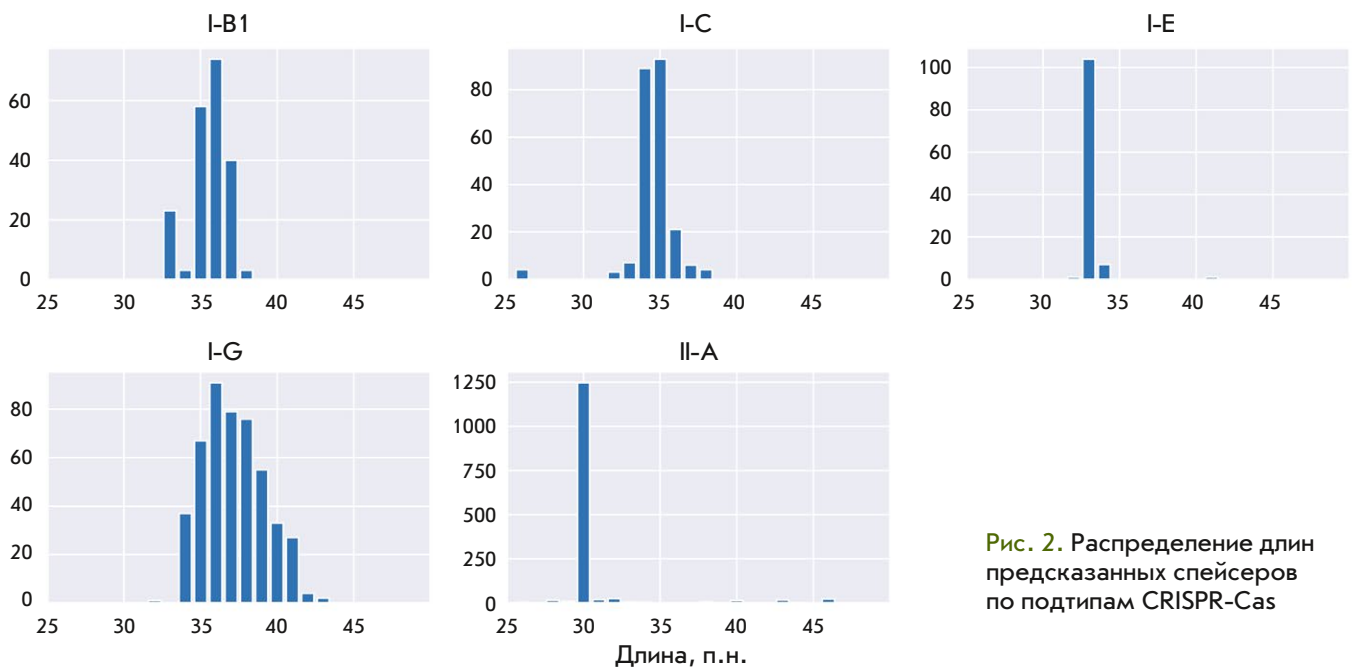


Таблица 1. Распределение систем CRISPR-Cas в геномах молочнокислых бактерий

Вид	Геномы, число	Геномы, содержащие CRISPR-Cas, %
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	300	80 (26.7)
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	92	68 (73.9)
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	76	46 (60.5)
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	43	10 (23.3)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	26	22 (84.6)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	26	17 (65.4)
	563	243

Таблица 2. Распределение спейсеров в геномах молочнокислых бактерий

Вид	Всего предсказано	Идентифицировано в фагах, %
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	1519	67 (4.4)
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2128	296 (13.9)
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1239	289 (23.3)
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	379	53 (14.0)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	778	48 (6.2)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	928	163 (17.6)

Таблица 3. Гены, перепредставленные среди мишеней спейсеров

Ген (согласно аннотации PharoKka)	Скорректированное <i>p</i> -value
Малая субъединица терминазы	$3.8 \times 10^{-6}$
Адаптер головы и хвоста Ad1	$2.5 \times 10^{-3}$
Головной каркасный белок	$3.6 \times 10^{-3}$
Основной белок хвоста	$3.8 \times 10^{-3}$
Экзонуклеаза репарации ДНК	$3.9 \times 10^{-2}$

что многие из предсказанных спейсеров либо не имеют известных фаговых мишеней, либо направлены против других видов мобильных генетических элементов, например, плазмид. Данное наблюдение также подчеркивает необходимость дальнейших исследований, направленных на более глубокое понимание механизмов взаимодействия CRISPR-Cas-систем с различными мобильными генетическими элементами. Кроме того, актуальным остается поиск и описание новых, ранее неизвестных, бактериофагов.

Интересно, что среди мишеней спейсеров перепредставлены гены, отвечающие за упаковку вирусной частицы, гены белков хвоста, а также гены, вовлеченные в метаболизм ДНК, поскольку эти участки должны быть более консервативными в силу своих функций, связанных с основными стадиями жизненного цикла вируса, такими как сборка вириона и проникновение в клетку-хозяина.

Примечательно также, что спектры фагов, резистентность к которым проявляют штаммы *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lactocaseibacillus rhamnosus* и *Lactocaseibacillus casei*, обладают выраженным сходством. Этот факт в совокупности со сходством представленных в геномах данных штаммов систем CRISPR-Cas может указывать на общие механизмы защиты или на сходство эволюционных путей формирования устойчивости этих бактерий к бактериофагам.

В представленном исследовании проведен комплексный анализ систем CRISPR-Cas, обнаруженных в геномах молочнокислых бактерий. Полученные результаты в значительной степени согласуются с ранее опубликованными данными [13, 14], однако мы использовали наиболее актуальные источники информации и сосредоточились на изучении опосредованного CRISPR-Cas иммунитета нескольких штаммов. Кроме того, мы подробнее изучили специфичность выявленных спейсеров,

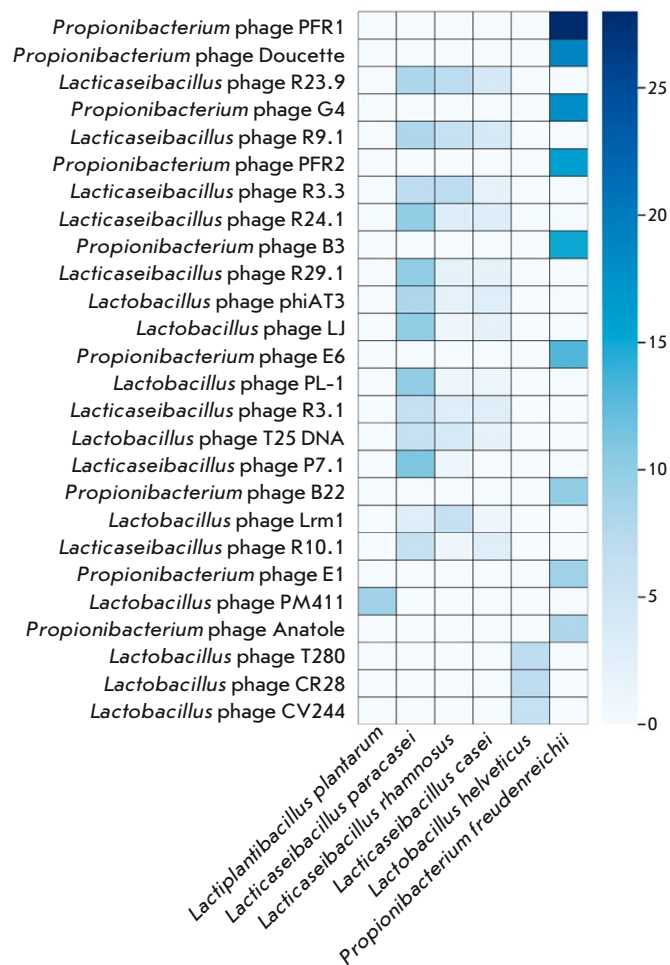


Рис. 3. Выравнивания уникальных спейсеров на геномы бактериофагов. Фаги, на которые выравнивались менее пяти спейсеров от каждого из видов, исключены для улучшения восприятия изображения

а также функции участков, против которых они направлены. Таким образом, полученные результаты не только расширяют текущее понимание роли CRISPR-Cas в адаптивном иммунитете молочнокислых бактерий, но и подчеркивают важность дальнейших исследований в данном направлении.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для лучшего понимания роли системы CRISPR-Cas в защите заквасочных культур от бактериофагов и ее влияния на процесс ферментации необходимы дополнительные исследования. Обилие бактериофагов, инфицирующих заквасочные культуры, на молочных предприятиях еще раз подчеркивает важность анализа спектра резистентности заквасочных культур для их рационального комбинирования в зависимости от спектра фагов в молочном сырье. ●

*Исследование выполнено за счет гранта  
Министерства науки и высшего образования  
Российской Федерации на проведение крупных*

*научных проектов по приоритетным  
направлениям научно-технологического развития  
(Проект № 075-15-2024-483).*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Frantzen C.A., Kleppen H.P., Holo H. // Appl. Environ. Microbiol. 2018. V. 84. № 3. P. e02199-17.
2. Lahbib-Mansais Y., Mata M., Ritzenthaler P. // Biochimie. 1988. V. 70. № 3. P. 429–435.
3. Romero D.A., Magill D., Millen A., Horvath P., Fremaux C. // FEMS Microbiol. Rev. 2020. V. 44. № 6. P. 909–932.
4. van Houte S., Buckling A., Westra E.R. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2016. V. 80. № 3. P. 745–763.
5. Nussenzweig P.M., Marraffini L.A. // Annu. Rev. Genet. 2020. V. 54. № 1. P. 93–120.
6. Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J., Shmakov S.A., Alkhnbashi O.S., Brouns S.J.J., Charpentier E., Cheng D., Haft D.H., Horvath P., et al. // Nat. Rev. Microbiol. 2020. V. 18. № 2. P. 67–83.
7. Kuznedelov K., Mekler V., Lemak S., Tokmina-Lukaszewska M., Datsenko K.A., Jain I., Savitskaya E., Mallon J., Shmakov S., Bothner B., et al. // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. № 22. P. 10849–10861.
8. Xue C., Seetharam A.S., Musharova O., Severinov K., Brouns S.J., Severin A.J., Sashital D.G. // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. № 22. P. 10831–10847.
9. Payne L.J., Todeschini T.C., Wu Y., Perry B.J., Ronson C.W., Fineran P.C., Nobrega F.L., Jackson S.A. // Nucl. Acids Res. 2021. V. 49. № 19. P. 10868–10878.
10. Bland C., Ramsey T.L., Sabree F., Lowe M., Brown K., Kyrpides N.C., Hugenholtz P. // BMC Bioinformatics. 2007. V. 8. № 1. P. 209.
11. Langmead B., Salzberg S.L. // Nat. Meth. 2012. V. 9. № 4. P. 357–359.
12. Bouras G., Nepal R., Houtak G., Psaltis A.J., Wormald P.-J., Vreugde S. // Bioinformatics. 2023. V. 39. № 1. P. btac776.
13. Crawley A.B., Henriksen E.D., Stout E., Brandt K., Barrangou R. // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 11544.
14. Horvath P., Coûté-Monvoisin A.-C., Romero D.A., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R. // Internat. J. Food Microbiol. 2009. V. 131. № 1. P. 62–70.