



УДК 579.61: 615.339: 616.98
<https://doi.org/10.26516/2073-3372.2022.40.3>

Характеристика CRISPR/CAS-системы штамма *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 на основе биоинформационного анализа её структур

В. В. Бединская¹, Л. А. Степаненко¹, Е. В. Симонова¹, А. Г. Атлас²,
Е. Б. Ракова¹, В. И. Злобин^{1*}

¹Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск, Россия

²Иркутская городская клиническая больница № 1, г. Иркутск, Россия

Аннотация. Представлен алгоритм биоинформационного поиска и анализа структур CRISPR/Cas-систем бактерий и скрининга фагов и плазмид через спейсерные последовательности CRISPR-кассет в геноме штамма *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071. Описаны обнаруженные CRISPR-локусы и группа Cas-генов, характерная для Type-I Subtype-I-F. Проведён анализ спейсерного состава CRISPR-кассет. Дана полная характеристика бактериофагов, к которым данный штамм обладает устойчивостью с указанием их номера доступа в NCBI. Определены гены, в структуре которых выявлены протоспейсеры фагов и плазмид. Установлено, что данные гены отвечают за синтез ферментов, регулирующих процессы конъюгативного переноса генетической информации и репликации вируса. Предложенный биоинформационный алгоритм позволил выявить структурные и функциональные особенности CRISPR/Cas-системы штамма *P. aeruginosa* DSM 50071.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, CRISPR/Cas, спейсер, протоспейсер, бактериофаг, биоинформатика.

Для цитирования: Характеристика CRISPR/CAS-системы штамма *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 на основе биоинформационного анализа её структур / В. В. Бединская, Л. А. Степаненко, Е. В. Симонова, А. Г. Атлас, Е. Б. Ракова, В. И. Злобин // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2022. Т. 40. С. 3–14. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2022.40.3>

Research article

Characterization of CRISPR/CAS System in *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 Based on Bioinformatic Analysis of its Structures

V. V. Bedinskaya¹, L. A. Stepanenko¹, E. V. Simonova¹, A. G. Atlas²,
E. B. Rakova¹, V. I. Zlobin^{1*}

¹Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation

²Irkutsk City Clinical Hospital N 1, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. An algorithm for bioinformatic search and analysis of the structures of CRISPR/Cas systems of bacteria and screening of phages and plasmids through spacer sequences of CRISPR cas-

settes in the genome of the *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 50071 is presented. Using several search algorithms in the CRISPR/Cas system of the studied strain, the presence of three CRISPR loci and a group of Cas genes characteristic of Type-I Subtype-I-F was determined. Analysis of the spacer composition of CRISPR cassettes showed the presence of 31 to 43 spacers and a universal consensus repeat in all cassettes. Screening of the spacer sequences of the CRISPR cassettes of the studied strain showed their correspondence to the protospacers of phages and plasmids of bacteria of the families Pseudomonadaceae and Enterobacteriaceae. A complete characterization of bacteriophages to which this strain is resistant is given with their accession number in NCBI. A complete identification of spacers to protospacers of phages specific for bacteria of the Pseudomonadaceae family, most often isolated from the lungs of patients with bronchiectasis, pneumonia, as well as from hospitals and reservoirs, has been established. Full correspondence between spacers and protospacers of bacterial plasmids with pan-resistance and causing the development of respiratory failure and pneumonia was revealed. Correspondence of a segment of one spacer with protospacers of several bacterial phages of the same family was noted. This may indicate that the bacterium “expediently” acquires new spacers from DNA regions that are conserved for phages of bacteria of the same family. Genes that have phage protospacers in their structure have been identified. It has been established that these genes are responsible for the synthesis of enzymes that regulate the processes of virus reproduction. Therefore, activation of the CRISPR/Cas system in the genome of this strain will allow the restriction endonuclease to introduce breaks into unmethylated DNA, which will lead to disruption of the synthesis of this enzyme, and, consequently, disruption of bacteriophage replication. Correspondences of spacer sequences with protospacers of plasmids included in the structure of genes responsible for the synthesis of conjugative transfer enzymes were revealed. These results suggested that activation of the CRISPR/Cas system of this strain would disrupt the processes replication of bacteriophage and conjugation. The proposed algorithm made it possible to obtain information about the structure of the CRISPR/Cas system of the *P. aeruginosa* DSM 50071 strain, about its resistance to certain phages and plasmids. In the future, this will serve as the basis for creating approaches for targeted therapy of infectious diseases.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, CRISPR/Cas, spacer, protospacer, bacteriophage, bioinformatics.

For citation: Bedinskaya V.V., Stepanenko L.A., Simonova E.V., Atlas A.G., Rakova E. B., Zlobin V.I. Characterization of CRISPR/CAS System in *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 Based on Bioinformatic Analysis of its Structures. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2022, vol. 40, pp. 3-14. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2022.40.3> (in Russian)

Введение

Неферментирующие грамотрицательные бактерии (НФГБ), в частности *Pseudomonas aeruginosa*, занимают лидирующие позиции среди возбудителей внутрибольничных инфекций (ВБИ) в силу высокой вирулентности и контагиозности, природной резистентности к различным классам антимикробных препаратов (АМП), устойчивости к действию многих антисептиков и дезинфектантов [IMP-43 and IMP-44 ... , 2013; Multidrug and Extensive ... , 2015]. Известно, что *P. aeruginosa* в 30–50 % случаев является причиной нозокомиальных инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии и занимает четвёртое место по частоте выявляемости среди возбудителей ВБИ в целом [*Pseudomonas aeruginosa* ... , 2012]. Благодаря широкому распространению в окружающей среде больничных стационаров и постоянному воздействию антибиотиков и дезинфектантов («селективный прессинг») нозокомиальные изоляты синегнойной палочки демонстрируют сегодня практически все известные механизмы устойчивости к антиинфекционным препаратам [Харченко, 2015], что создаёт значительные трудности при выборе адекватной эмпирической терапии полирезистентной синегнойной инфекции.

В этой связи в медицинской практике вновь возрастает интерес к применению бактериофагов для лечения инфекций бактериального происхождения. Мы рассматриваем новые подходы подбора бактериофагов как средство защиты от патогенной флоры через изучение структур CRISPR/Cas-систем, лежащих в основе механизмов взаимодействия между фагами и бактериями. CRISPR/Cas – это прокариотическая адаптивная иммунная система, используемая для распознавания и расщепления вторгающихся нуклеиновых кислот [Advances in CRISPR/Cas-based ... , 2020]. Система представлена CRISPR-локусом, экспрессирующим некодирующие РНК, и генами Cas (CRISPR-associated), кодирующими Cas-нуклеазы, обеспечивающие гидролиз целевой ДНК [Система CRISPR/Cas9 ... , 2016]. Эти системы антивирусного иммунитета присутствуют в большинстве архей и многих бактерий и защищают их от вирусов, мобильных генетических элементов и прочей инородной ДНК [Makarova, Wolf, Koonin, 2013].

CRISPR-локус состоит из лидерной последовательности, задающей направление транскрипции CRISPR-кассеты и представленной АТ-богатыми участками длиной 400 п. н., которые не содержат открытых рамок считывания. CRISPR-кассеты – участки геномов, содержащие CRISPR-повторы, разделённые спейсерами. В непосредственной близости от CRISPR-кассет находятся локусы Cas-генов. Кодируемые ими Cas-белки содержат функциональные домены, обеспечивающие различные взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами, что способствует реализации молекулярных механизмов адаптивного иммунитета [CRISPR/Cas-системы ... , 2020; Hille, Charpentier, 2016; Genome editing ... , 2020; Bacterial resistance ... , 2021]. Системы CRISPR-Cas действуют в три этапа: адаптация, биогенез CRISPR РНК (crRNA) и интерференция. Впоследствии это приводит к разрушению чужеродного генетического материала [CRISPR-Cas у *Streptococcus* ... , 2019; Engineered CRISPR-Cas systems ... , 2021].

Цель настоящей работы – представить полную характеристику CRISPR/Cas-системы штамма *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 и провести поиск и анализ фагов и плазмид через расшифрованные спейсерные последовательности её CRISPR-кассет.

Материалы и методы

В качестве объекта использована геномная последовательность *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071(NZ_CP012001.1), загруженная из базы данных GenBank. Алгоритм биоинформационного анализа структур CRISPR/Cas-систем описан ранее в публикациях авторов [Детекция и анализ ... , 2018; Использование биоинформационных ... , 2015]. Для поиска CRISPR/Cas-системы использовались возможности симулятора MacSyFinder v. 1.0.2, поиск структурных и функциональных характеристик Cas-генов осуществлялся при помощи вспомогательных программных пакетов makeblastdb v. 2.2 и HMMER v. 3.0. Для поиска CRISPR-кассет в геноме использовались возможности онлайн-базы данных CRISPI (<http://crispi.genouest.org>) [CRISPI ... , 2009]. Для поиска фагов расшифрованные спейсерные последовательности в формате FASTA были загружены в онлайн-приложение CRISPRTarget (<http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget>) [CRISPRTarget ... , 2013].

Результаты и обсуждение

Штамм DSM 50071 впервые описан в 1872 г. Й. Шрётером [First Complete Genome ... , 2015]. Имеет размер генома около 6,3 Мб, круговая ДНК состоит из 6 317 050 п. н. и содержит 5857 генов. Является типовым штаммом, т. е. обладает всеми генотипическими и фенотипическими свойствами, характерными для вида. При проведении биоинформационного анализа в структуре CRISPR/Cas-системы штамма были обнаружены три CRISPR-локуса (рис. 1).

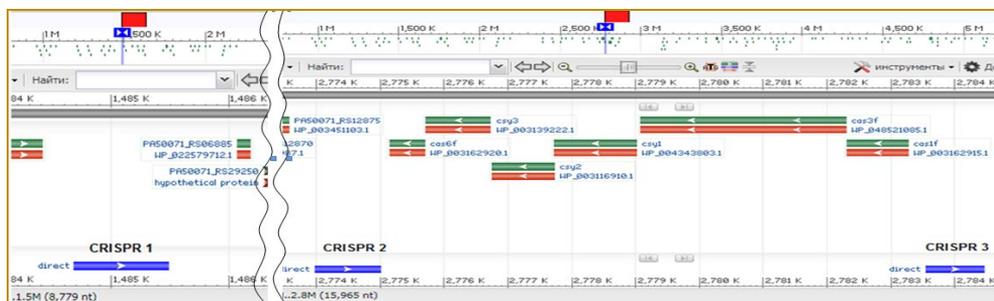


Рис. 1. Схематичное расположение Cas-генов и CRISPR-кассет в геноме штамма *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 (NZ_CP012001.1)

Рядом со вторым и третьим локусами обнаружена группа Cas-генов, характерная для CRISPR/Cas-системы Type-I Subtype-I-F. Составлена полная характеристика спейсерного состава CRISPR-кассет (табл. 1).

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности спейсеров в CRISPR-кассетах штамма *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 (NZ_CP012001.1)

Номер спейсера	Позиция	Спейсер	Размер спейсера, н. о.
CRISPR-кассета 1			
1	1484680	GCTAGTTCGTCAGCAAGAAGAGCGGCCCGCTA	32
2	1484740	TTGCTGGCGCCCGCGGTGAGCTTCGCGTACTC	32
3	1484800	AAATAAAGAGATGCCCTTTCTACTGTGATCAA	32
4	1484860	TGGTCGTCTCGCAATCCGCCTCGGCCGCTGGC	32
5	1484920	CGGTAGAGACGTCGGTGAGCGCTGCGATCTGC	32
6	1484980	GCAATCGATCAGGCTATGACCGCCGAAGCCTA	32
7	1485040	TCGACGTTGCCGACCCGCGGCCGCGCCCGGTT	32
8	1485100	TCGGCCAAGGCTCCGGCATCGAGCACGATGCC	32
9	1485160	TTGAGGAACAGGCGCGCTACGTCCGCCGCGAA	32
10	1485220	TTGATGATGCCGTCCTGCTGTTTGCCGGCGAT	32
11	1485280	TACGGGCAGTCACGGCGAAAGGCACTCAGCGA	32
12	1485340	TCGCGCAATGATTTACGCCGCGGAGCGCATAG	32
13	1485400	ATAGATAACACGTGTGACCGCGACCACTACCG	32
14	1485460	CTCAAGAAAGAGCAGAACGGCCAGCTTGCGCC	32

Окончание табл. 1

Номер спейсера	Позиция	Спейсер	Размер спейсера, н. о.
CRISPR-кассета 2			
1	2773971	TTTGCCGGGTCACACTGCCCGGACCCGCCACC	32
2	2774031	CAGGGCGCGCCCGGAGAAAAGTCACGCGCTTCGA	33
3	2774092	TCGGGAAAGAGACCATGACCATCGGTGAAAAC	32
4	2774152	ATCCGGGCTGCGCAGATCACCCGGCCAGCTT	32
5	2774212	AGGCACTGCAGGCCTACCGGCGTACCCTGCGC	32
6	2774272	ACGTCAATGCAGAACTCGAACGTGCTGTGCAT	32
7	2774332	ACCCAGTGAAATCAGTCCCGGCGCTCGTATCG	32
8	2774392	TTCGACGGCCACGCTCAGCCGGCCAGGCC	32
9	2774452	GAGATCATCCGGCGCAAGCGGGAACAGCTGCT	32
10	2774512	TCACGACCTTCTCGAACGTTCCAGGTACGTA	32
11	2774572	AAGGTCAATTCCCAGGTGAAGCAACTGGTGCC	32
12	2774632	GTAGCAGAGAACTCAACAGCCCGACTGGACG	32
13	2774692	GTAGGGATTGTGAGCGTCGAGGAGCGCCAGGGC	33
14	2774753	TGCAACTCGAAAACATCGAACGCCGGCGCCGA	32
15	2774813	CTGAGCTAACCCGGCTGGGATCCAAATCCTAC	32
16	2774873	TCCTTCGGCTCCGCCGGCCGGATCGCTGCAT	31
CRISPR-кассета 3			
1	2784472	ACTGGGCTTCGCGGGAGAGGCTTCCAAAATT	32
2	2784412	ACCACGAACGAACAGTTTTTTCAGTTTTTCA	32
3	2784352	ACAGTCGGTCATCTTTCACGCGACAAGTAATG	32
4	2784292	GGCCAGTCCGTGCCGATTCCGCCGGCGTGGAG	32
5	2784232	TGGACCTGGCAAAGCTGGAGTGGGCGCGGCTG	32
6	2784172	TGGACGGCAAACAAGATCGTAGGGCGCTGCC	32
7	2784112	TGGGCGTCAAGGCCGTA CTGACTTCATTA	32
8	2784052	ACTGACGACCGTCACGCTGACCCGACCGGAGA	32
9	2783992	ATGTCCCCGACCGTCGACAGGCCGTCAGCGGTT	32
10	2783932	GCCCTGGGCGCCTGGTTCGAGCCGACCGATGT	32
11	2783872	AGGTCAACGACCAGCGTCGGAGCCTCGGGCTT	32
12	2783812	TGGGACACCCGACGCTGCGAGACGCTTGATA	32
13	2783752	ATCGCCGGCATGAACGAGGCGCATGCGAAGTT	32
14	2783692	TGGCCGTAACCCGTGGTTCAGGCTGAGCGGCAC	32
15	2783632	AAGAGGAGCCTGAACATGGCCCAAATTTCTAA	32

Так, CRISPR-кассета 1 имеет размер 807 н. о. и состоит из 14 спейсеров размером 32 н. о., разделённых повторами по 28 н. о. Кассета располагается на расстоянии 1 288 484 н. о. от второго и третьего CRISPR-локусов, а также от Cas-генов. При этом она имеет аналогичную второй кассете нуклеотидную последовательность повторов. CRISPR-2 с размером 1047 н. о. содержит 16 спейсеров размером от 31 до 33 н. о., разделённых консервативными повторами размером 28 н. о. В CRISPR-кассете 3 размером 927 н. о. обнаружены 15 спейсеров размером 32 н. о., разделённых повторами по 28 н. о.

Последовательность консенсусных повторов в составе всех трёх кассет консервативна, что свидетельствует о стабильности данного типа CRISPR-локусов (рис. 2).



Рис. 2. Консенсусная последовательность повторов в CRISPR-кассетах штамма *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 (NZ_CP012001.1)

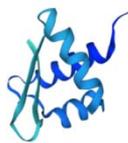
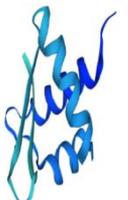
Скрининг спейсерных последовательностей CRISPR-кассет исследуемого штамма показал их соответствие протоспейсерам фагов и плазмид бактерий семейств Pseudomonadaceae и Enterobacteriaceae (табл. 2). Дальнейший анализ определил, что в первой CRISPR-кассете седьмой спейсер полностью соответствует *Pseudomonas* phage Dobby (MK034952), впервые изолированному из почечного камня. Протоспейсер фага входит в состав гена, отвечающего за синтез белка ДНК-(цитозин-5)-метилтрансферазы. Данный фермент катализирует метилирование нуклеотидных остатков в составе ДНК вируса. При активации CRISPR/Cas-системы будет нарушен синтез данного фермента, что позволит эндонуклеазе рестрикции бактерии вносить в неметилированную ДНК разрывы, в результате чего окажется нарушена репликация вируса.

Таблица 2

Список спейсеров, соответствующих им протоспейсеров и белков, кодируемых генами протоспейсеров фагов в геноме штамма *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 (NZ_CP012001.1)

Спейсер	Бактериофаг (плазмида) протоспейсер	Номер доступа GenBank	Белок, кодируемый геном протоспейсера фага	Структура белка, кодируемого геном протоспейсера фага
CRISPR 1				
7	<i>Pseudomonas</i> phage Dobby	MK034952	ДНК (цитозин-5) метилтрансфераза	
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E6130952, плазмида рНХ613 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , штамм КРНИН39, плазмида рКРН-704	NZ_CP020602.1 NZ_CP014764.1	Белок конъюгативного переноса Р-типа	

Окончание табл. 2

Спейсер	Бактериофаг (плазмида) протоспейсер	Номер доступа GenBank	Белок, кодируемый геном про- тоспейсера фага	Структура белка, кодируемо- го геном прото- спейсера фага
CRISPR 2				
11	<i>Pseudomonas phage phi2</i>	KT887558	ДНК- связывающий белок	
13	<i>Pseudomonas phage phi2</i>	KT887558	ДНК- связывающий белок	
CRISPR 3				
10	<i>Pseudomonas phage vB_Pae_BR58b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_BR327a</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_BR313b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_BR243b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_BR205a</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_BR161b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_BR52b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF213b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF183b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF177b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF136a</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF121a</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF118b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF81b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF77b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF74a</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF65b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF57b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF23b</i> <i>Pseudomonas phage vB_Pae_CF28a</i> <i>Pseudomonas phage Spike</i> <i>Pseudomonas phage</i> <i>B_PaeS_PA01_Ab30</i>	MK511038 MK511036 MK511035 MK511034 MK511033 MK511032 MK511031 MK511030 MK511029 MK511028 MK511027 MK511026 MK511025 MK511024 MK511023 MK511022 MK511021 MK511020 MK511017 MK511018 MK144667 LN610590	ДНК- связыва- ющий белок	

Во второй и третьей CRISPR-кассетах установлена полная идентичность спейсеров протоспейсерам фагов, специфичных для бактерий семейства *Pseudomonadaceae*, выделяемых чаще всего из лёгких больных с бронхоэктазами, а также из внутрибольничной среды и принимающих стоки водоёмов. Так, во второй CRISPR-кассете спейсеры 11 и 13 соответствовали последовательности протоспейсеров в составе одного гена *Pseudomonas phage phi2* (KT887558), но разным его участкам. Можно предположить, что бактерия выработала механизм защиты двумя разными спейсерами от этого широко распространённого бактериофага. Выполненное при помощи онлайн-сервисов

сравнение аминокислотной последовательности белка, кодируемого данным геном, показало наибольшее его совпадение с ДНК-связывающим белком.

Белок предотвращает образование дуплекса одноцепочечных фрагментов ДНК и позволяет компонентам репликационной вилки осуществлять репликацию ДНК. Соответственно, при нарушении его синтеза будет нарушена репликация вируса.

Отмечено также соответствие участка одного спейсера протоспейсерам нескольких фагов бактерий одного семейства. Так, в третьей CRISPR-кассете участку спейсера 10 выявлено соответствие протоспейсерам 22 фагов бактерий семейства *Pseudomonadaceae* (см. табл. 2). Белок, кодируемый данными генами фагов, показал наибольшее совпадение с ДНК-связывающим белком, что может свидетельствовать о «целесообразном» приобретении бактерией новых спейсеров из участков ДНК, консервативных для фагов бактерий одного семейства. В результате бактерия получает возможность защититься от нескольких фагов посредством одного спейсера.

При поиске и анализе плазмид установлено, что второй спейсер CRISPR-кассеты 1 полностью соответствует протоспейсеру плазмиды рJHX613 *P. aeruginosa* E6130952, относящейся к панрезистентному штамму, впервые выделенному из мокроты пациента с дыхательной недостаточностью, а также плазмиде рKPN-704 *Klebsiella pneumoniae* KPNIH39, выделенной от больного пневмонией. В CRISPR-кассете 3 девятый спейсер аналогичен протоспейсеру плазмиды рEC743_4 *E. coli* 743, выделенной от больного кишечной инфекцией, десятый спейсер соответствовал плазмиде ВН9 штамма *P. aeruginosa* рВН6, обладающего устойчивостью к карбапенему. При дальнейшем анализе выявлено, что протоспейсеры плазмид входили в структуру генов, отвечающих за синтез белка конъюгативного переноса у *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* и за синтез белка, содержащего домен нуклеазы релаксазы у *E. coli*. Эти системы белков обеспечивают высвобождение и передачу ДНК в клетки-реципиенты, способствуя расширению разнообразия генома бактерий. Можно предположить, что изменение синтеза данных белков приведёт к нарушению процессов конъюгации, т. е. передачи чужеродной ДНК. Соответствие спейсеров протоспейсерам плазмид может свидетельствовать об обмене генетической информацией с помощью плазмид между представителями разных семейств бактерий и о формировании защитных механизмов (спейсеров) в ответ на внедрение чужеродного генетического материала.

Заключение

Использованная биоинформационная технология позволила провести подробный анализ структур CRISPR/Cas-системы штамма *P. aeruginosa* DSM 50071, определить её тип, дать полную характеристику спейсерных структур CRISPR-кассет. Скрининг фагов и плазмид через спейсерные последовательности CRISPR-кассет дал возможность получить информацию о предполагаемой устойчивости CRISPR/Cas-систем исследуемого штамма к обнаруженным фагам и плазмидам, а также о генетических взаимодействиях

между представителями как одного вида, так и разных видов бактерий. Предложенный алгоритм биоинформационных исследований микроорганизмов в дальнейшем послужит основой для создания подходов таргетной терапии инфекционных заболеваний.

Список литературы

Детекция и анализ структур CRISPR-Cas-систем в геноме плазмиды рУС-1 из штамма *Bacillus thuringiensis* YC-10 / Н. А. Арефьева, Ю. П. Джиоев, А. Ю. Борисенко, Л. А. Степаненко, Н. П. Перетолчина, Ю. С. Букин, В. И. Чемерилова, О. Ф. Вятчина, О. А. Секерина, Ю. А. Маркова, Г. В. Юринова, В. П. Саловарова, А. А. Приставка, В. А. Кузьминова, А. С. Мартынова, В. И. Злобин // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2018. Т. 26. С. 3–17. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.26.3>

Использование биоинформационных программных методов для поиска CRISPR/Cas систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus* / А. Ю. Борисенко, Ю. П. Джиоев, А. И. Парамонов, Ю. С. Букин, Л. А. Степаненко, О. В. Колбасеева, В. И. Злобин // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2015. Т. 133, № 2. С. 71–74.

Pseudomonas aeruginosa в спектре микробных культур, изолируемых от пациентов различных стационаров / М. В. Кузнецова, Т. И. Карпунина, Н. В. Николаева, И. М. Чепурная, Н. С. Авдеева, С. В. Проворова // Альманах клинической медицины. 2012. № 27. С. 50–55.

Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии / А. В. Смирнов, А. М. Юнусова, В. А. Лукьянчикова, Н. Р. Батгулин // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20, № 4. С. 493–510. <https://doi.org/10.18699/VJ16.175>

CRISPR/Cas-системы: характеристика и возможности использования для редактирования геномов бактерий / И. А. Блатов, А. С. Щурова, Д. Ю. Гушин, С. Д. Зверева, А. В. Попова // Бактериология. 2020. Т. 5, № 2. С. 38–48. <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2020-2-38-48>

Харченко Л. А. Синегнойная палочка: Современные реальности антибактериальной терапии // Медицина неотложных состояний. 2015. № 1(64). С.164–168.

Advances in CRISPR/Cas-based Gene Therapy in Human Genetic Diseases / S. S. Wu, Q. C. Li, C. Q. Yin, W. Xue, C. Q. Song // Theranostics. 2020. Vol. 10, N 10. P. 4374–4382. <https://doi.org/10.7150/thno.43360>

Bacterial resistance to CRISPR-Cas antimicrobials / R. V. Uribe, C. Rathmer, L. J. Jahn, M. M. H. Ellabaan, S. S. Li, M. O. A. Sommer // Sci. Rep. 2021. Vol. 11, N 1. P. 17267. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96735-4>

CRISPI: a CRISPR interactive database / C. Rousseau, M. Gonnet, M. Le Romancer, J. Nicolas // Bioinformatics. 2009. Vol. 25(24). P. 3317–3318. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp586>

CRISPR-Cas у *Streptococcus pyogenes* / A. L. Rhun, A. Escalera-Maurer, M. Bratovič, E. Charpentier // RNA Biology, 2019. Vol. 16, N 4. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1582974>

CRISPRTarget: bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets / A. Biswas, J. N. Gagnon, S. J. Brouns, P. C. Fineran, C. M. Brown // RNA Biol. 2013. Vol. 10, N 5. P. 817–827. <https://doi.org/10.4161/rna.24046>

Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections / Y. Wu, D. Battalapalli, M. J. Hakeem, V. Selamneni, P. Zhang, M. S. Draz, Z. Ruan // J. Nanobiotech. 2021. Vol. 19, N 401. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01132-8>

First Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 (DSM 50071T), Determined Using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology / K. Nakano, Ya. Terabayashi, A. Shiroma, M. Shimoji, H. Tamotsu, N. Ashimine, Sh. Ohki, M. Shinzato, K. Teruya, K. Satou, T. Hirano // Genome Announc. 2015. Vol. 3, N 4. e00932-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00932-15>

Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective / D. Zhang, A. Hussain, H. Manghwar, K. Xie, Sh. Xie, Sh. Zhao, R. M. Larkin, P. Qing, Sh. Jin, F. Ding // Plant Biotechnol. J. 2020. Vol. 18, N 8. P. 1651–166. <https://doi.org/10.1111/pbi.13383>

Hille F., Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2016. Vol.5, N 371. P. 1707. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0496>

IMP-43 and IMP-44 Metallo- β -Lactamases with Increased Carbapenemase Activities in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* / T. Tada, T. Miyoshi-Akiyama, K. Shimada, M. Shimojima, T. Kirikae // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013. Vol. 57, N 9. P. 4427–4432. <https://doi.org/10.1128/AAC.00716-13>

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

Multidrug and Extensive Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Portuguese Central Hospital: 10-Year Survey / S. G. Pereira, M. Marques, J. Pereira, O. Cardoso // *Microb. Drug Resist.* 2015. Vol. 21, N 2. P. 194–200. <http://doi.org/10.1089/mdr.2014.0137>

References

Arefeva N.A., Dzhioev Yu.P., Borisenko A.Yu., Stepanenko L.A., Peretolchina N.P., Bukin Yu.S., Chemerilova V.I., Vjatchina O.F., Sekerina O.A., Markova Ju.A., Yurinova G.V., Salovarova V.P., Pristavka A.A., Kuz'minova V.A., Martynova A.C., Zlobin V.I. Detektsiya i analiz struktur CRISPR-Cas-sistem v genome plazmidy pYC-1 iz shtamma *Bacillus thuringiensis* YC-10 [Detection and analysis of the structures of CRISPR-Cas systems in the genome of the pYC-1 plasmid from the *Bacillus thuringiensis* YC-10 strain]. *Bull. Irkutsk St. Univ. Ser. Biol. Ecol.*, 2018, vol. 26, pp. 3-17. (in Russian). <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.26.3>

Borisenko A.Ju., Dzhioev Yu.P., Paramonov A.I., Bukin Yu.S., Stepanenko L.A., Kolbaseeva O.V., Zlobin V.I. Ispolzovanie bioinformatsionnykh programmnykh metodov dlya poiska CRISPR/Cas sistem v genomakh shtammov [Using bioinformatic software methods to search for CRISPR/Cas systems in the genomes of *Staphylococcus aureus* strains]. *Sibirskij medicinskij zhurnal (Irkutsk)*, 2015, vol. 133, no. 2, pp. 71-74. (in Russian)

Kuznecova M.V., Karpunina T.I., Nikolaeva N.V., Chepurnaja I.M., Avdeeva N.S., Provorova S.V. *Pseudomonas aeruginosa* v spektre mikrobnih kul'tur, izoliruemyh ot pacientov razlichnyh stacionarov. [Pseudomonas aeruginosa in the spectrum of microbial cultures isolated from patients of various hospitals]. *Alm. Clin. Med.*, 2012, no. 27, pp. 50-55. (in Russian)

Smirnov A.V., Yunusova A.M., Luk'janchikova V.A., Battulin N.R. Sistema CRISPR/Cas9 – universalnyi instrument genomnoi inzhenerii [The CRISPR/Cas9 system is a universal tool for genomic engineering]. *Vavilov J. Gen. Breed.*, 2016, vol. 20, no. 4, pp. 493-510. (in Russian). <https://doi.org/10.18699/VJ16.175>

Blatov I.A., Shchurova A.S., Gushchin D.Ju., Zvereva S.D., Popova A.V. CRISPR/Cas-sistemy: kharakteristika i vozmozhnosti ispolzovaniya dlya redaktirovaniya genomov bakterii [CRISPR/Cas Systems: Characteristics and Possibilities of Use for Bacterial Genome Editing]. *Bakteriol.*, 2020, vol. 5, no. 2, pp. 38-48. (in Russian). <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2020-2-38-48>

Harchenko L.A. Sinegnoinaya palochka: Sovremennye real'nosti antibakterialnoi terapii [*Pseudomonas aeruginosa*: Modern realities of antibiotic therapy]. *Meditsina neotlozhnykh sostoyaniyu* [Emergency Medicine], 2015, no. 1(64), pp. 164-168. (in Russian)

Wu S.S., Li Q.C., Yin C.Q., Xue W., Song C.Q. Advances in CRISPR/Cas-based Gene Therapy in Human Genetic Diseases. *Theranostics*, 2020, vol. 10, no. 10, pp. 4374-4382. <https://doi.org/10.7150/thno.43360>

Uribe R.V., Rathmer C., Jahn L.J., Ellabaan M.M.H., Li S.S., Sommer M.O.A. Bacterial resistance to CRISPR-Cas antimicrobials. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, no. 1. 17267. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96735-4>

Rousseau C., Gonnet M., Le Romancer M., Nicolas J. CRISPI: a CRISPR interactive database. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25(24), pp. 3317-3318. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp586>

Rhun A.L., Escalera-Maurer A., Bratovič M., Charpentier E. CRISPR-Cas y *Streptococcus pyogenes*. *RNA Biology*, 2019, vol. 16, no. 4. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1582974>

Biswas A., Gagnon J.N., Brouns S.J., Fineran P.C., Brown C.M. CRISPRTarget: bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets. *RNA Biol.*, 2013, vol. 10, no. 5, pp. 817-827. <https://doi.org/10.4161/rna.24046>

Wu Y., Battalapalli D., Hakeem M.J., Selamneni V., Zhang P., Draz M.S., Ruan Z. Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections. *J. Nanobiotech.*, 2021, vol. 19, no. 401. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01132-8>

Nakano K., Terabayashi Ya., Shiroma A., Shimoji M., Tamotsu H., Ashimine N., Ohki Sh., Shinzato M., Teruya K., Satou K., Hirano T. First Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 (DSM 50071T), Determined Using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology. *Genome Announc.*, 2015, vol. 3, no. 4. e00932-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00932-15>

Zhang D., Hussain A., Manghwar H., Xie K., Xie Sh., Zhao Sh., Larkin R. M., Qing P., Jin Sh., Ding F. Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective. *Plant Biotechnol. J.*, 2020, vol. 18, no. 8, pp. 1651-1666. <https://doi.org/10.1111/pbi.13383>

Hille F., Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2016, vol. 5, no. 371, pp. 1707. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0496>

Tada T., Miyoshi-Akiyama T., Shimada K., Shimojima M., Kirikae T. IMP-43 and IMP-44 Metallo- β -Lactamases with Increased Carbapenemase Activities in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, vol. 57, no. 9, pp. 4427-4432. <https://doi.org/10.1128/AAC.00716-13>

Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res.*, 2013, vol. 41, no. 8, pp. 4360-4377. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt157>

Pereira S. G., Marques M., Pereira J., Cardoso O. Multidrug and Extensive Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Portuguese Central Hospital: 10-Year. *Microb. Drug Resist.*, 2015, vol. 21, no. 2, pp. 194-200. <http://doi.org/10.1089/mdr.2014.0137>

Сведения об авторах

Information about the authors

Бединская Виктория Владимировна
аспирант

Иркутский государственный медицинский университет
Россия, 664003, г. Иркутск,
ул. Красного Восстания, 1
e-mail: vika-2801@mail.ru

Bedinskaya Viktoria Vladimirovna
Postgraduate

Irkutsk State Medical University
1, Krasnogo Vosstaniya st., Irkutsk, 664003,
Russian Federation
e-mail: vika-2801@mail.ru

Степаненко Лилия Александровна

кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник
Иркутский государственный медицинский университет
Россия, 664003, г. Иркутск,
ул. Красного Восстания, 1
e-mail: steplia@mail.ru

Stepanenko Lilia Aleksandrovna

Candidate of Sciences (Medicine),
Senior Research Scientist
Irkutsk State Medical University
1, Krasnogo Vosstaniya st., Irkutsk, 664003,
Russian Federation
e-mail: steplia@mail.ru

Симонова Елена Васильевна

доктор биологических наук,
заведующий кафедрой
Иркутский государственный медицинский университет
Россия, 664003, г. Иркутск,
ул. Красного Восстания, 1
e-mail: evsimonova@yandex.ru

Simonova Yelena Vasilyevna

Doctor of Sciences (Biology), Head
of Department
Irkutsk State Medical University
1, Krasnogo Vosstaniya st., Irkutsk, 664003,
Russian Federation
e-mail: evsimonova@yandex.ru

Атлас Александр Гилельевич

заведующий лабораторией
Иркутская городская клиническая
больница № 1
Россия, 664046, г. Иркутск,
ул. Байкальская, 118
e-mail: irgkb1@irkoms.ru

Atlas Aleksandr Gilelyevich

Head of Laboratory
Irkutsk City Clinical Hospital N 1
118, Baikalskaya st., Irkutsk, 664046,
Russian Federation
e-mail: irgkb1@irkoms.ru

Ракова Елена Борисовна

кандидат биологических наук, доцент
Иркутский государственный медицинский
университет
Россия, 664003, г. Иркутск,
ул. Красного Восстания, 1
e-mail: e.rakova@ismu.baikal.ru

Rakova Yelena Borisovna

Candidate of Sciences (Biology),
Associate Professor
Irkutsk State Medical University
1, Krasnogo Vosstaniya st., Irkutsk, 664003,
Russian Federation
e-mail: e.rakova@ismu.baikal.ru

Злобин Владимир Игоревич

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН, заведующий кафедрой
Иркутский государственный медицинский
университет
Россия, 664003, г. Иркутск,
ул. Красного Восстания, 1
e-mail: vizlobin@mail.ru

Zlobin Vladimir Igorevich

Doctor of Sciences (Medicine), Professor,
Academician of RAS, Head of Department
Irkutsk State Medical University
1, Krasnogo Vosstaniya st., Irkutsk, 664003,
Russian Federation
e-mail: vizlobin@mail.ru

Статья поступила в редакцию **20.02.2022**; одобрена после рецензирования **04.04.2022**; принята к публикации **16.05.2022**
Submitted **February, 20, 2022**; approved after reviewing **April, 04, 2022**; accepted for publication **May, 16, 2022**