

CRISPR-системы иммунитета штаммов *Yersinia pestis*

Герман Каневский,
Елена Очередько,
Ирена Артамонова

Abstract

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs) is a prokaryotic antiphage immune system. The core of the CRISPR system is a cassette consisting of identical direct repeats separated by spacers – short fragments of foreign DNA from the phages or plasmids which were evading the cell recently. A new spacer is added to the cassette upon the attack of the cell by a new phage or plasmid. Therefore, the spacers of the CRISPR system represent the recent history of agents infecting the bacteria. Here, we studied evolution of CRISPR system in the completely sequenced strains of *Y. Pestis*. We found that the phylogenetic tree constructed based on the CRISPR system alone using maximum parsimony principle was significantly different from the known evolutionary history of strains themselves. While this can be indicative of the independent evolution of the CRISPR system, we suspect that this discrepancy stems from the incompatibility of the maximum parsimony principle with the evolutionary complexity of our system.

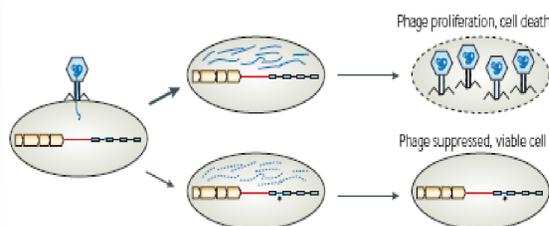
Введение

CRISPR - короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами

Структура CRISPR-локуса:

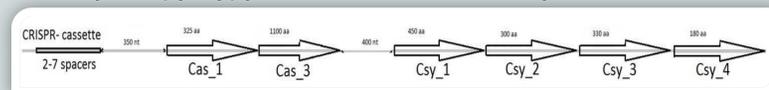


Спейсеры – фрагменты ДНК фагов, когда-либо атаковавших прокариотический организм. В случае повторной атаки данным фагом мРНК спейсеры «узнают» чужеродную ДНК, соединяясь с ней по принципу комплементарности, вызывая её деградацию. При попадании фага в клетку, содержащую CRISPR-систему, происходит добавление в кассету нового спейсера, последовательность которого идентична протоспейсеру - короткой последовательности генома атакующего вируса. После такого события бактерия приобретает устойчивость к данному фагу.



Результаты

CRISPR-системы в известных штаммах *Yersinia pestis* имеют одинаковую структуру. Схема основного локуса:



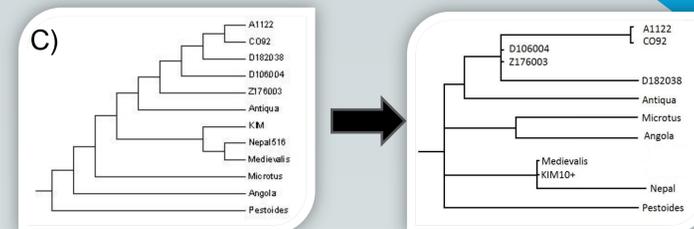
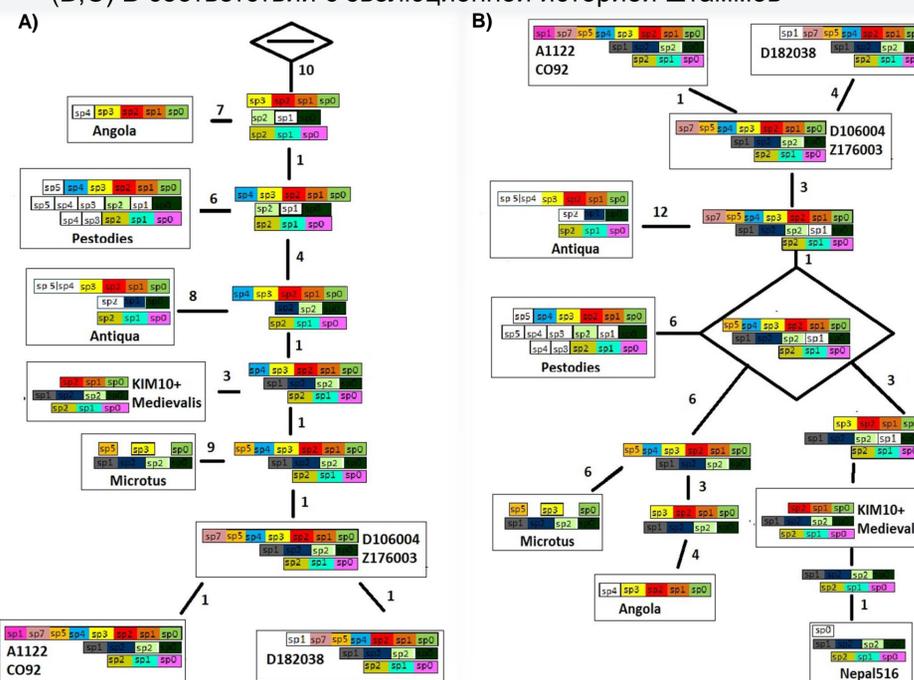
- Кроме основного локуса в большинстве штаммов существует два дополнительных локуса, содержащих по одной CRISPR-кассете
- В *Y.pestis Angola* отсутствуют оба дополнительных локуса, а *cas3* является псевдогеном (в последовательности есть стоп-кодон)
- В *Y.pestis biovar Microtus str. 91001* отсутствует один из дополнительных локусов
- В последовательности генома *Y.pestis D182038* произошел сдвиг рамки считывания на расстоянии 480 нуклеотидов от стоп-кодона (предположительно, в результате ошибки секвенирования)

Разнообразии спейсеров CRISPR-кассет:

	Основной локус								Дополнительный локус 1			Дополнительный локус 2		
A1122	sp1	sp2	sp3	sp4	sp5	sp6	sp7	sp8	sp5	sp3	sp2	sp3	sp2	sp1
CO92	sp7	sp6	sp5	sp4	sp3	sp2	sp1	sp0	sp0	sp1	sp3	sp0	sp1	sp2
D106004	sp7	sp6	sp5	sp4	sp3	sp2	sp1	sp0	sp4	sp2	sp1	sp4	sp2	sp3
Z176003	sp7	sp6	sp5	sp4	sp3	sp2	sp1	sp0	sp1	sp3	sp2	sp1	sp2	sp3
Pestoides F	sp5	sp4	sp3	sp2	sp1	sp0	sp0	sp0	sp5	sp4	sp3	sp4	sp3	sp0
D182038	sp1	sp2	sp3	sp4	sp5	sp6	sp7	sp8	sp1	sp3	sp2	sp3	sp2	sp1
Antiqua	sp5	sp4	sp3	sp2	sp1	sp0	sp0	sp0	sp2	sp3	sp1	sp2	sp1	sp2
Angola	sp4	sp3	sp2	sp1	sp0	sp0	sp0	sp0	NO	NO	NO	NO	NO	NO
KIM10+	sp2	sp1	sp0	sp2	sp1	sp2	sp1	sp0						
Microtus	sp2	sp1	sp0	sp0	sp0	sp0	sp0	sp0	sp3	sp1	sp0	NO	NO	NO
Medievalis	sp2	sp1	sp0	sp0	sp0	sp0	sp0	sp0	sp4	sp2	sp1	sp3	sp2	sp1
Nepal516	sp0	sp0	sp0	sp0	sp0	sp0	sp0	sp0	sp0	sp2	sp1	sp2	sp1	sp0

Эволюция CRISPR-кассет может быть описана различными филогенетическими деревьями:

(A) На основе принципа максимальной парсимонии
(B,C) В соответствии с эволюционной историей штаммов



Эволюционная история, построенная по методу наибольшей парсимонии, не совпадает с историей штаммов *Y.pestis*.

Сравнение CRISPR-систем *Y.pestis* и других видов рода *Yersinia*:

- У штаммов *Y.enterocolitica* CRISPR-систем не обнаружено
- Штаммы *Y.pseudotuberculosis* разделяют структуру CRISPR-локусов *Y.pestis*, но отличаются наличием значительно большего количества спейсеров в кассетах (до 46) и значительно меньшим числом одинаковых спейсеров между штаммами.

Выводы

- Основной геномный локус CRISPR-системы имеет одинаковую структуру во всех известных штаммах *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*
- В большинстве штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* есть ещё по две CRISPR-кассеты с тем же повтором в разных, удаленных от основного локуса, частях генома.
- Эволюционная история, построенная по принципу максимальной парсимонии, не соответствует историческому развитию штаммов *Y.pestis*. Это расхождение может быть следствием независимой эволюции CRISPR-системы в описываемых штаммах, однако более правдоподобны артефакты метода максимальной парсимонии при анализе множественных эволюционных изменений.

Данные и методы

- Базы данных: CRISPRdb, геномный раздел GenBank.
- ORF Finder: поиск и анализ открытых рамок считывания;
- BLASTP: поиск гомологичных белков;
- Nucleic Acid Dot Plots: сравнение нуклеотидных последовательностей;
- Clustal: построение выравниваний белков;
- Phylodendron: построение филогенетических деревьев.