

Сравнение систем защиты свободноживущих прокариот, экстремофилов и внутриклеточных паразитов

Ириоглов Р.^{1, 2*}, Алексеевский А.^{1, 2, 3}

¹ НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

² Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ, Москва, Россия

³ ФГУ ФНЦ Научно-исследовательский институт системных исследований РАН, Москва, Россия

* irio-roman@yandex.ru

Ключевые слова: внутриклеточные паразиты; системы защиты; бактериофаги; бактерии

Мотивация и цель: Бактерии и фаги находятся в постоянном противостоянии: первые развивают и совершенствуют системы защиты, вторые – разрабатывают методы их обхода. Изучение бактериофагов и систем защиты бактерий расширило понимание природы вирусной инфекции, стало основой для установления молекулярных механизмов наследственности, а также дало и продолжает давать генной инженерии новые эффективные инструменты и методики. Целью нашей работы было сравнить состав защитных систем у преимущественно свободноживущих бактерий и внутриклеточных паразитов, а также проверить защитные системы прокариот, обитающих в экстремальных средах.

Материалы: Список видов прокариот и число исследованных геномов штаммов каждого вида представлены в табл. 1.

Таблица 1. Список видов прокариот и число исследованных геномов штаммов каждого вида

Вид	Число штаммов	Вид	Число штаммов
<i>Brucella sp.</i>	150	<i>Chlamydia trachomatis</i>	30
<i>Xanthomonas fragariae</i>	30	<i>Chlamydia psittaci</i>	30
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	30	<i>Shigella flexneri</i>	30
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	30	<i>Shigella sonnei</i>	30
<i>Microcystis aeruginosa</i>	8	<i>Mycobacterium leprae</i>	5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8	<i>Deinococcus radiodurans</i>	14
<i>Clostridium botulinum</i>	30	<i>Thermus thermophiles</i>	10
<i>Clostridium perfringens</i>	30	<i>Desulforudis audaxviator</i>	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	<i>Halobacterium salinarum</i>	6
<i>Rickettsia japonica</i>	30		

Методы и алгоритмы: Для поиска основных компонентов систем защиты в геномах прокариот мы использовали НММ профили, доступные в виде онлайн-сервиса PADLOC [1, 2]. PADLOC способен обнаруживать системы, основанные

на модификации ДНК, abortивные и токсин-антитоксिन-овые системы, системы CRISPR-Cas и прокариотических белков Argonaut, а также большинство недавно открытых систем с неописанным/предполагаемым механизмом действия.

Результаты: С помощью сервиса PADLOC мы исследовали противофаговые системы бактерий рода *Brucella*. Нам удалось найти всего две защитные системы: систему рестрикции-модификации типа I и dГТФазную систему, встречаются у 100 % штаммов, что оказалось меньше ожидаемого результата, с учетом огромного разнообразия систем защиты и их частой локализации в форме «защитных островов» – участков, способных к горизонтальному переносу.

Таблица 2. Краткая характеристика систем защиты, найденных сервисом PADLOC у бактерий с разными способами существования

Бактерии	Способ существования	Системы защиты на геном			
		Min	Max	Сред.	Самые представленные
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Свободноживущий	4	13	10	RM тип II, Zorya тип III, Gabija
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Свободноживущий	6	15	9	RM тип I, dGTPase, CRISPR-Cas
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Свободноживущий	26	39	31	RM тип II, PD-T4-6
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Есть контакт с внешней средой	7	10	8	RM тип I, Zorya тип III
<i>Micobacterium tuberculosis</i>	Есть контакт с внешней средой	10	14	12	PD-T4-6, dGTPase
<i>Clostridium botulinum</i>	Есть контакт с внешней средой	3	11	9	RM тип I, PD-T4-6, CRISPR-Cas
<i>Clostridium perfringens</i>	Есть контакт с внешней средой	3	12	8	PD-T4-6, Zorya, viperin
<i>Staphylococcus aureus</i>	Паразит	1	7	5	RM тип II, Mokosh тип II
<i>Brucella sp.</i>	Паразит	2	2	2	RM тип I, dGTPase
<i>Shigella flexneri</i>	Паразит	2	6	3	RM тип I, Mokosh тип II
<i>Shigella sonnei</i>	Паразит	4	6	4	RM тип II, Mokosh тип II
<i>Rickettsia japonica</i>	Облигатный паразит	2	2	2	SoFic, dGTPase (встречаются у 100 %)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Облигатный паразит	0	0	0	–
<i>Chlamydia psittaci</i>	Облигатный паразит	0	0	0	–
<i>Micobacterium leprae</i>	Облигатный паразит	3	4	4	PD-T4-6, dGTPase (встречаются у 100 %)
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Радиорезистентный	6	10	9	RM тип IV, PD-T4-3, PD-T4-6, dGTPase (встречаются у 100 %)
<i>Thermus thermophiles</i>	Термофил	4	8	5	SoFic, PD-T4-6, dGTPase (встречаются у 100 %)
<i>Desulforudis audaxviator</i>	Криофил	9	13	10	CRISPR-Cas, Wadjet тип 2, Hma (встречаются у 100 %)
<i>Halobacterium salinarum</i>	Галофил	1	5	3	SoFic, AbiE

Мы выдвинули гипотезу, что бактерии рода *Brucella* и прочие внутриклеточные паразиты обладают меньшим количеством систем защиты, чем свободноживущие виды, так как среда обитания данных паразитов свободна от бактериофагов. Для проверки гипотезы мы идентифицировали защитные системы в геномах 4 видов прокариот – облигатных внутриклеточных паразитов. Добавлены следующие категории прокариот: паразиты – 4 вида внутриклеточных паразитов, имеющие период в жизненном цикле, когда находятся вне среды с фагами; имеющие постоянный контакт с внешней средой – 4 вида и свободно живущие – 3 вида.

Для сравнения мы решили также проверить защитные системы прокариот, обитающих в других экстремальных средах: *Deinococcus radiodurans* (радиорезистентная бактерия), *Thermus thermophilus* (гипертермофил), *Desulforudis audaxviator* (криофил), *Halobacterium salinarum* (галофил). Результаты нахождения защитных систем в геномах представлены в табл. 2.

У облигатных внутриклеточных паразитов защитные системы либо не были обнаружены, либо находилось в среднем от 2 до 4 систем на геном. Обнаруженные у них системы SoFic, dGTPase и PD-T4-6 состоят из одного белка и могут выполнять сторонние функции, что объясняет наличие этих систем у облигатных паразитов даже после характерной для них редукции генома. У паразитов в среднем от 2 до 5 защитных систем на геном. Наиболее часто встречающиеся классические системы рестрикции-модификации типов II и III, Mokosh тип II и dGTPase. Такое малое разнообразие защитных систем паразитов требует дальнейшего изучения. У большинства родов свободноживущих бактерий среднее число защитных систем составляло от 8 до 11 на геном. У бактерий-экстремофилов, кроме *Halobacterium*, не наблюдается значительного падения числа систем, но снижено их разнообразие.

Выводы: Полученные нами данные свидетельствуют в пользу выдвинутой нами гипотезы, а также в пользу влияния экстремального места обитания на набор противофаговых защитных систем бактерий. Мы планируем изучить отдельные типы систем защиты, а также рассмотреть распределение систем защиты бактерий внутри вида с различными местами обитания штаммов.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФИ № 21-14-00135.

Comparison of defense systems of free-living prokaryotes, extremophiles and intracellular parasites

Irioglov R.^{1, 2*}, Alekseevskiy A.^{1, 2, 3}

¹ Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov MSU, Moscow, Russia

² Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov MSU, Moscow, Russia

³ Research Institute for System Analysis, RAS, Moscow, Russia

* irio-roman@yandex.ru

Key words: intracellular parasites; defense systems; bacteriophages; bacteria

Motivation and Aim: Bacteria and phages are in constant confrontation: the former develop and improve protection systems, the latter develop methods to circumvent them. The study of bacteriophages and bacterial defense systems expanded the understanding of the nature of viral infection, became the basis for establishing the molecular mechanisms of heredity, and also gave and continues to give genetic engineering new

effective tools and techniques. The aim of our work was to compare the composition of protective systems in predominantly free-living bacteria and intracellular parasites, as well as to test the defense systems of prokaryotes living in extreme environments. *Materials:* See Table 1.

Table 1. Prokaryotic species and strains genomes used

Species	Strains No.	Species	Strains No.
<i>Brucella sp.</i>	150	<i>Chlamydia trachomatis</i>	30
<i>Xanthomonas fragariae</i>	30	<i>Chlamydia psittaci</i>	30
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	30	<i>Shigella flexneri</i>	30
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	30	<i>Shigella sonnei</i>	30
<i>Microcystis aeruginosa</i>	8	<i>Mycobacterium leprae</i>	5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8	<i>Deinococcus radiodurans</i>	14
<i>Clostridium botulinum</i>	30	<i>Thermus thermophiles</i>	10
<i>Clostridium perfringens</i>	30	<i>Desulforudis audaxviator</i>	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	<i>Halobacterium salinarum</i>	6
<i>Rickettsia japonica</i>	30		

Methods and Algorithms: To search for the main components of defense systems in the genomes of prokaryotes, we used HMM profiles available as an online service PADLOC [1, 2]. PADLOC detects defense systems based on DNA modifications, abortive (Abi) and toxin-antitoxin (TA) systems, CRISPR-Cas, prokaryotic Argonaut, and many recently identified within defense islands systems with unknown mechanism of action. *Results:* Using the PADLOC service, we investigated the antiphage systems of bacteria of the genus *Brucella*. We managed to find only 2 defense systems, namely type I restriction modification system and dGTPase system. Both found in 100 % of strains studied. It turned out to be less than we expected to find, taking into account the huge variety of defense systems and their tendency to localize in the form of “protection islands” – areas capable of horizontal transfer. We hypothesized that bacteria of the genus *Brucella* and other intracellular parasites have fewer defense systems than free-living species, since the habitat of these parasites is free of bacteriophages.

To test this hypothesis, we identified defense systems in the genomes of 4 species of prokaryotic obligate intracellular parasites, 4 species of parasites, i.e. intracellular parasites encounter the environment at some stages of their life cycle, 4 species having tight contact with the external environment and 3 free living species. In addition, we studied defense systems of prokaryotes living in other extreme environments: *Deinococcus radiodurans* (radioresistant bacterium), *Thermus thermophiles* (hyperthermophile), *Desulforudis audaxviator* (cryophile), *Halobacterium salinarum* (halophile).

The results of finding defense systems in genomes are presented in Table 2. In obligate intracellular parasites, defense systems were either not detected, or there were not more than four of them per genome. The SoFic, dGTPase and PD-T4-6 systems

found in them consist of a single protein and can perform third-party functions, which explains the presence of these systems in obligate parasites even after their characteristic genome reduction. Parasites have an average of 2 to 5 defense systems per genome. The most common are classic restriction-modification systems type 2 and 3, Mokosh type II and dGTPase (it has other functions besides protective ones). Such a small variety of parasite defense systems deserves further study.

Table 2. The defense systems found by the PADLOC service in bacteria with different ways of existence

Bacteria	Modes of existence	Defense systems per genome			
		Min	Max	Aver	The most common systems
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Free-living	4	13	10	RM type II, Zorya type III, Gabija
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Free-living	6	15	9	RM type I, dGTPase, CRISPR-Cas
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Free-living	26	39	31	RM type II, PD-T4-6
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Contact with the external environment	7	10	8	RM type I, Zorya type III
<i>Micobacterium tuberculosis</i>	Contact with the external environment	10	14	12	PD-T4-6, dGTPase
<i>Clostridium botulinum</i>	Contact with the external environment	3	11	9	RM type I, PD-T4-6, CRISPR-Cas
<i>Clostridium perfringens</i>	Contact with the external environment	3	12	8	PD-T4-6, Zorya, viperin
<i>Staphylococcus aureus</i>	Parasite	1	7	5	RM type II, Mokosh type II
<i>Brucella sp.</i>	Parasite	2	2	2	RM type I, dGTPase (found in 100%)
<i>Shigella flexneri</i>	Parasite	2	6	3	RM type I, Mokosh type II
<i>Shigella sonnei</i>	Parasite	4	6	4	RM type II, Mokosh type II
<i>Rickettsia japonica</i>	Obligate parasite	2	2	2	SoFic, dGTPase found in 100%)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Obligate parasite	0	0	0	—
<i>Chlamydia psittaci</i>	Obligate parasite	0	0	0	—
<i>Micobacterium leprae</i>	Obligate parasite	3	4	4	PD-T4-6, dGTPase (found in 100%)
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Radioresistant	6	10	9	RM type IV, PD-T4-3, PD-T4-6, dGTPase (found in 100%)
<i>Thermus thermophiles</i>	Thermophile	4	8	5	SoFic, PD-T4-6, dGTPase (found in 100%)
<i>Desulforudis audaxviator</i>	Cryophile	9	13	10	CRISPR-Cas, Wadjet type 2, Hma (found in 100%)
<i>Halobacterium salinarum</i>	Halophile	1	5	3	SoFic, AbiE

In most genera of free-living bacteria, the average number of defense systems ranged from 8 to 11. In extremophile bacteria, except for *Halobacterium*, there is no significant decrease in the number of systems, but their diversity is reduced.

Conclusion: The data obtained by us indicate in favor of the hypothesis as well as in favor of the influence of extreme habitat on the set of antiphage defense systems of bacteria. We plan to study a separate type of defense systems, as well as the distribution of bacterial defense systems within a species with different habitats of strains.

Funding: The study is supported by the RSF No. 21-14-00135.

Список литературы/References

1. Payne L.J., Meaden S., Mestre M.R., Palmer C., Toro N., Fineran P.C., Jackson S.A. PADLOC: a web server for the identification of antiviral defence systems in microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(W1):W541-W550. doi 10.1093/nar/gkac400
2. Payne L.J., Todeschini T.C., Wu Y., Perry B.J., Ronson C.W., Fineran P.C., Nobrega F.L., Jackson S.A. Identification and classification of antiviral defence systems in bacteria and archaea with PADLOC reveals new system types. *Nucleic Acids Res.* 2021;49:10868-10878. doi 10.1093/nar/gkab883