

**Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук»**

На правах рукописи

Алла Константиновна Голомидова

**СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
АДСОРБЦИОННОГО АППАРАТА T5-ПОДОБНЫХ
БАКТЕРИОФАГОВ DT57C И DT571/2**

Специальность 03.02.03 – микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
д.б.н. Летаров А.В.**

Москва 2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ОРС - открытая рамка считывания;
- ППС – поверхностные полисахариды;
- ЛПС – липополисахариды;
- ПДРФ - полиморфизм длин рестриционных фрагментов;
- ПААГ – полиакриламидный гель;
- О-АГ – О-антиген;
- О-ПС – О-полисахарид;
- БОЕ – бляшкообразующая единица;
- КОЕ – колониеобразующая единица;
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- УРЕС – уропатогенные штаммы *E. coli*;
- ЭПС – экзополисахариды;
- RVР – рецептор-связывающий белок;
- LTF- латеральные хвостовые фибриллы;
- ВОЗ – всемирная организация здравоохранения;
- ICTV – международный комитет по таксономии вирусов;
- R-M – система рестрикции-модификации.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	2
ВВЕДЕНИЕ	
Актуальность работы.....	3
Цель и задачи работы.....	7
Научная новизна и значимость работы.....	7
Практическая значимость.....	8
Личное участие автора в получении результатов.....	8
Апробация работы.....	9
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
Глава 1. Общие вопросы биологии бактериофагов	11
1.1 Распространение бактериофагов в природе.....	11
1.2 Историческая справка.....	11
1.3 Разнообразие и значение вирусов прокариот.....	13
1.4 Жизненный циклы бактериофагов.....	16
1.5 Адаптация бактерий к бактериофагам.....	16
Глава 2. Антифаговая защита бактерий	19
2.1 Блокирование фаговой адсорбции.....	19
2.2 Предотвращение инъекции ДНК фагов.....	24
2.3 Деградация фаговых нуклеиновых кислот.....	25
2.4 Abortивная инфекция.....	27
Глава 3. Механизмы преодоления фагами устойчивости бактерий	28
3.1 Доступ к хозяйским рецепторам.....	28
3.2 Преодоление систем рестрикции-модификации (R-M)	38
3.3 Уклонение от CRISPR-Cas систем.....	39
3.4 Преодоление механизмов abortивной инфекции.....	40
Глава 4. T5 подобные бактериофаги	41
4.1 Структура вириона	41
4.2 Механизм адсорбции фага T5.....	53
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
Глава 5. Материалы и методы исследования	58
Отбор образцов.....	58
Выделение бактериофагов и колиформных бактерий.....	58
Фаговые и бактериальные штаммы и их культивирование.....	59
Определение хозяйского спектра бактериофагов.....	60

Экстракция ДНК и анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).....	61
Идентификация бактериофагов.....	61
Секвенирование ДНК.....	62
Электронная микроскопия.....	62
Выделение и анализ ЛПС.....	62
ЯМР анализ О-полисахаридов.....	63
Определение кривых адсорбции бактериофагов.....	63
Олигонуклеотидные праймеры и плазмидные конструкции.....	64
Направленный мутагенез фагов посредством рекомбинации с плазидами	65
Отбор устойчивых к бактериофагам бактериальных клонов.....	66
Получение нативной формы белка, ген <i>ltfB</i>	66
Глава 6. Результаты и обсуждение.....	68
6.1 Выделение и характеристика колифагов DT57C и DT57-1/2.....	68
6.2 Полные геномные последовательности бактериофагов DT57C и DT571/2.....	72
6.2.1 Организация генов адсорбционного аппарата бактериофагов DT57C и DT571/2.....	74
6.3 Генетический и функциональный анализ адсорбционного аппарата.....	75
6.3.1 Определение конечного рецептора для исследуемых бактериофагов.....	75
6.3.2 Организация генов латеральных хвостовых фибрилл (LTF).....	78
6.3.3 Роль гена <i>ltfA</i> в детерминации хозяйской специфичности бактериофагов DT57C и DT571/2.....	84
6.3.4 <i>LtfA</i> мутанты.....	86
6.3.5 Функция белка <i>LtfB</i>	87
6.4 Анализ ЛПС штамма <i>E. coli</i> HS3-104, 4S и HS1/2.....	89
6.5 Высокий уровень генетической изменчивости локуса <i>ltf</i>	91
6.6 Модель стратегии адсорбции T5-подобных бактериофагов.....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103
ПРИЛОЖЕНИЕ	115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Бактериофаги используют в качестве антибактериальных агентов уже более 100 лет. Фаговая терапия, практически забытая западной медициной после открытия антибиотиков, вновь приобретает актуальность как одно из возможных решений проблемы, связанной с распространением лекарственной резистентности патогенных бактерий. В мае 2015 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) признала резистентность к антибиотикам причиной кризиса современной медицины. В связи со сложившейся критической ситуацией более подробное исследование бактериофагов даёт возможность разработать альтернативные методы лечения бактериальных инфекций.

Наибольшее медицинское значение на сегодня имеют грамотрицательные бактерии, в числе которых важную роль играют виды сем. *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella* и др.). Эти бактерии являются составной частью микрофлоры кишечника человека и животных или способны его колонизировать, что увеличивает вероятность миграторных инфекций за счёт переноса возбудителя в другие органы, например, при изменении барьерных функций. Так, например, *E. coli* является ведущим возбудителем урологических инфекций у пациентов без анатомических аномалий (Al-Badr and Al-Shaikh 2013, Wang *et al.* 2013). Эта бактерия также участвует в развитии воспалительных заболеваний кишечника, включая болезнь Крона (McPhee *et al.* 2014, Smith *et al.* 2013), и многих иных патологий (Allocati *et al.* 2013).

T5-подобные бактериофаги являются перспективными кандидатами в качестве агентов для фаговой терапии инфекций, вызываемых бактериями сем. *Enterobacteriaceae*. Их частицы устойчивы к различным условиям окружающей среды, не имеют генов вирулентности, являются литическими, а также обладают широким хозяйским спектром (Sváb *et al.* 2018). Бактериофаг T5 один из первых фагов энтеробактерий, который был подробно описан ещё в 1940-х годах (Demerec and Fano 1945). С тех пор

экспериментально было охарактеризовано лишь несколько фагов относящихся к роду *T5virus*, при этом в базе GenBank депонированы геномы более, чем 50 штаммов таких фагов.

В недавних исследованиях было предложено несколько T5-подобных бактериофагов в качестве потенциальных кандидатов для использования против различных патогенных видов сем. *Enterobacteriaceae*, включая *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Kim and Ryu 2011, Piya *et al.* 2015, Grover *et al.* 2015, Paradiso *et al.* 2016, Dalmasso *et al.* 2016), штаммы *E. coli* O157: H7 (Niu *et al.* 2012, Hong *et al.* 2014), с перспективными результатами применения T5-подобного бактериофага CEV2 в комплексе с T4-подобным фагом CEV1 *in vivo*, полученными на овцах (Raya *et al.* 2011). В 2018 году было описано три T5-подобных бактериофага, способных инфицировать несколько серотипов *Salmonella*, а также снижать эффективность образования и процессы метаболизма биопленок *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Chen *et al.* 2018). Было показано, что T5-подобные фаги эффективны против *Klebsiella pneumoniae* и *Providencia rettgeri*, которые являются важными оппортунистическими патогенными бактериями, а также часто вызывают ятрогенные инфекции (Xing *et al.* 2017, Oliveira, Pinto, *et al.* 2017).

Детально изученная организация адсорбционного аппарата T5-подобных бактериофагов и стратегии распознавания ими клеток хозяев позволят использовать эти вирусы как основу для системы управления хозяйской специфичностью вируса, которая бы позволила быстро адаптировать фага практически к штаммам *E. coli*, продуцирующим самые различные варианты О-антигенов. Такие рекомбинантные бактериофаги можно использовать для лечения инфекций, вызванных патогенными штаммами *E. coli*.

Понимание принципов и характера взаимодействий, определяющих эффективность неспецифической защиты клеток бактерий от фагов, а также знание стратегий, которые фаги используют для преодоления этой

защиты, позволит разработать требования к составу эффективных терапевтических коктейлей бактериофагов, а также выработать подходы к усилению действия фаговых препаратов.

Цель и задачи работы

Целью данной работы являлось:

Изучить организацию адсорбционного аппарата новых T5-подобных бактериофагов и определить стратегию распознавания ими клеток хозяев.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Охарактеризовать изоляты T5-подобных колифагов общего происхождения.
2. Идентифицировать генетические детерминанты, определяющие различия спектров хозяев у выделенных изолятов фагов.
3. Определить клеточные рецепторы исследуемых бактериофагов.
4. Изучить структурную и функциональную организацию адсорбционных аппаратов фагов DT57C и DT571/2 и сравнить её с типовым видом бактериофага T5 рода *T5virus*.

Научная новизна и значимость работы

В работе подробно изучен ряд T5-подобных бактериофагов и их взаимодействия со штаммами хозяев *E. coli* HS1/2 (O87), HS3-104 (O81), 4S (O22). Эти системы были изолированы из естественного микробного сообщества желудочно-кишечного тракта лошади. У фагов DT57C и DT571/2 был обнаружен новый тип латеральных хвостовых фибрилл (LTF). В отличие от LTF фага T5 и других ранее описанных вирусов этой группы, у фагов DT57C и DT571/2 LTF имеют разветвлённое строение. В составе этих фибрилл белок LtfA обеспечивает присоединение белка LtfB к вириону. Оба эти белка при этом имеют свои рецептор-узнающие домены. Показано, что эти белки распознают полисахаридные лиганды (O-антигены клеток), обеспечивая возможность

проникновения осевой фибриллы к конечному рецептору (в случае фагов DT57C и DT571/2 – белку-транспортёру внешней мембраны BtuB *E. coli*).

Биоинформатический поиск показал, что сходная организация LTF имеется и у многих других T5-подобных фагов, однако ранее не была описана в литературе. В ходе исследования были определены новые, ранее не охарактеризованные структуры O-антигенов.

Основываясь на полученных в диссертационной работе данных возможно предположить, что искусственная модификация спектров хозяев одного или нескольких фагов могла бы позволить таргетировать их к различным уропатогенным штаммам *E. coli* (UPEC), при этом фаг может быть всесторонне исследован (и модифицирован) для обеспечения его безопасности и улучшения параметров фармакокинетики.

Практическая значимость

Практическая значимость работы обусловлена тем, что T5-подобные бактериофаги являются перспективными агентами антибактериальной фаговой терапии против инфекций, вызываемых бактериями сем. *Enterobacteriaceae*, в том числе штаммами устойчивыми к антибактериальным химиопрепаратам. Обнаруженная разветвлённая организация LTF упрощает создание систем искусственного управления хозяйской специфичностью для фокусирования этих фагов к разнообразным штаммам патогенной *E. coli*.

Личное участие автора в получении результатов

Совместно с руководителем д.б.н. А.В. Летаровым соискатель определил цели и задачи исследования, разработал схемы экспериментов и подготовил экспериментальные данные к публикации. Автор получил и подготовил образцы фагов, бактерий и липополисахаридов для структурных и функциональных исследований, получил экспрессионные рекомбинантные конструкции. Автором были проведены все функциональные и молекулярные исследования, изложенные в диссертации.

Экспрессионная рекомбинантная конструкция pS649A и рекомбинантный мутантный белок ItfB были получены к.б.н. Прохоровым Н.С. Криоэлектронная микроскопия вирусных частиц DT57C дикого типа и мутантов DT571/2 была проведена Dr. Guerrero-Ferreira R.C. (EPFL, Лозанна, Швейцария). Электронная микроскопия фаговых препаратов, изученных в работе 2006 г. была выполнена в лаборатории структуры и морфогенеза Института вирусологии им. Д. И. Ивановского РАН под руководством д.б.н. Маныкина А.А. ЯМР-анализ образцов бактериальных липополисахаридов был проведён в лаборатории химии углеводов ИОХ РАН под руководством проф. Ю.А. Книреля. Расположение физических концов вирионной ДНК было определено В. Н. Ксендзенко (ИБФМ РАН, Пущино).

Апробация работы

Результаты, полученные при выполнении диссертации, были представлены на семинарах и конференциях ИНМИ РАН и ФИЦ Биотехнологии РАН: на ежегодной Молодёжной международной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, Россия 2006, 2007, 2011); на международной научной конференции «Микроорганизмы и биосфера» (Москва, Россия 2007); на конференциях по биологии бактериофагов “Evergreen Phage Meeting” (Олимпия, США 2007, 2009, 2015); на конференциях Европейской Организации Молекулярной Биологии “Viruses of Microbes” (Париж, Франция 2010; Брюссель, Бельгия 2012; Цюрих, Швейцария 2014; Вроцлав, Польша 2018); на 25-й конференции “Phage and Virus Assembly” (Диаблерец, Швейцария 2015), на конференции “100th Celebration of Bacteriophage Research” (Париж, Франция 2017); на симпозиуме “Symposium on Phages in interaction” (Левен, Бельгия 2015); на 1-ой, 2-ой, 3-ей и 4-ой конференциях “Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности” (Ульяновск, Россия 2012; Санкт-

Петербург, Россия 2014; Москва, Россия 2016; Нижний Новгород, Россия 2018).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 7 статей в периодических изданиях, включённых в перечень ВАК, а также 12 тезисов/докладов в сборниках конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста и содержит разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, выводы и список литературы, включающий 211 источников. Работа проиллюстрирована 32 рисунками и 7 таблицами.

Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена в лаборатории вирусов микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ биотехнологии РАН). Автор благодарит заведующего лабораторией химии углеводов ИОХ РАН д.б.н. Книреля Ю.А. и сотрудников данной лаборатории за ЯМР-анализ образцов бактериальных липополисахаридов. Автор выражает благодарность Dr. R.C. Guerrero-Ferreira – сотруднику Федеральной Политехнической школы в Лозанне (Швейцария), за помощь в проведении криоэлектронной микроскопии бактериофагов. Автор благодарит руководителя группы геномной инженерии Института белка РАН Ксёндзенко В.Н. за помощь в определении положения физических концов геномов фагов DT57C и DT571/2. Автор выражает признательность к.б.н. Прохорову Н.С. – сотруднику Медицинского отделения Техасского университета в Галвестоне (США) за помощь в получении экспрессионных рекомбинантных

конструкций для подтверждения автокаталитического процессинга белков LtfA и LtfB. Автор выражает глубокую признательность руководителю работы д.б.н. Летарову А.В., а также соавторам в публикациях – к.б.н. Куликову Е.Е., к.б.н. Тарасян К.К., к.б.н. Иванову П.А., к.б.н. Исаевой А.С. за консультацию и помощь в работе.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Общие вопросы биологии бактериофагов

1.1 Распространение бактериофагов в природе

Бактериофаги представляют собой наиболее многочисленную и широко распространённую в природе группу вирусов (Ackermann 2003, Hendrix 2002). Приблизительный размер глобальной популяции фагов составляет более 10^{31} фаговых частиц (Sellvam *et al.* 2018, Li *et al.* 2010, Brussow and Hendrix 2002, Ackermann 1998). В природных экосистемах фаги встречаются практически во всех тех местах, где есть чувствительные к ним бактерии. Достаточно высокая стабильность вирионов во внешней среде и способность быстро реплицироваться в соответствующем хозяине, позволяет так называемым вирулентным бактериофагам, размножающимся только в литическом цикле, сохраняться в природных местообитаниях в динамичном балансе, даже если доля подходящих для инфекции клеток относительно невелика. Когда подходящий хозяин отсутствует, в определённых условиях многие фаги могут сохранять способность к инфицированию на протяжении длительного времени, иногда вплоть до нескольких десятилетий (Guttman and Raya 2004). Однако типичное время полужизни фаговых частиц в природе значительно короче, например, в водных экосистемах оно составляет около 1-х суток (Weinbauer 2004).

1.2 Историческая справка

Первое косвенное свидетельство существования бактериофагов получил английский учёный Эрнест Ханкин, который в 1896 году написал о целебных свойствах вод Ганга и Джамна в Индии. Ханкин выяснил, что вода обладала антибактериальными свойствами по отношению к возбудителю холеры, сохранявшимся после фильтрации, но пропадающими после кипячения. К тому моменту вирусы, микроскопические патогены, обладающие способностью проникать через

бактериальные фильтры, были уже известны, однако учёный не высказал никаких предположений относительно вирусной природы открытого им эффекта. Наряду с этим известно, что российский микробиолог Н. Ф. Гамалея в 1898 году, впервые наблюдал явление лизиса сибиреязвенной палочки под влиянием перевиваемого агента, но он также не описал этот агент в качестве вируса бактерий и не продолжил его исследования. Поэтому открывателями бактериофагов принято считать англичанина Фредерика Туорта и канадско-французского учёного Феликса д'Эрреля.

В 1915 году английский ветеринарный микробиолог Ф. Туорт описал явление «стекловидной трансформации» стафилококка, которое было названо «феномен Туорта». В своей работе он наблюдал разрушение стафилококка перевиваемым фильтрующимся агентом. Таким образом он впервые открыл вирус бактерий (Twort 1915).

Для развития исследований в области бактериофагии особое значение имели работы французского и канадского учёного Феликса д'Эрреля. В 1917 г. он сообщил, что из фекальных масс больных дизентерией ему удалось выделить особый литический фактор (вирус), способный проходить через бактериальные фильтры, размножаться на дизентерийных бактериях и вызывать при этом их лизис. Для обозначения этого вируса д'Эррель впервые предложил название бактериофаг (D'herelle 1917).

Им же впервые было показано присутствие бактериофагов в составе микрофлоры человека и животных (D'herelle 1921). Таким образом, факт участия бактериофагов в функционировании нормального микробиоценоза тела животных и человека известен на протяжении почти 100 лет, однако данные о взаимном влиянии популяций фагов и их хозяев, а также о роли фагов в функционировании сообщества все ещё очень скудны и разрознены. Понимание особенностей эколого-физиологических взаимоотношений в тройственной системе «бактерии - фаги – макроорганизм» должно служить теоретической основой для управления этой системой (Letarov *et al.* 2010).

Исследования бактериофагов в 1930-1950х годах привели к

формированию современной концепции вируса (Summers 2012). Фаговые исследования также дали начало молекулярной генетике и молекулярной биологии. Преимущественно на модели бактериофагов были впервые описаны молекулярные основы биологических процессов, особенно на ранних этапах развития молекулярной генетики и молекулярной микробиологии (Calendar 2012). В настоящее время исследования по молекулярной биологии вирусов бактерий носят более специальный характер, будучи в основном направлены на изучение фагов как самостоятельного биологического явления, нежели на их использование в качестве модели для расшифровки универсальных биологических процессов.

1.3 Разнообразие и значение вирусов прокариот

Бактериофаги или фаги это вирусы, которые инфицируют бактерий. Для обозначения вирусов архей термин «бактериофаги» не применяется. Фаги активно исследуют также как векторы для горизонтального переноса генов, движущий фактор эволюции бактерий и формирования природных микробных сообществ, а также в качестве новых терапевтических агентов (Clokic *et al.* 2011, Jennes *et al.* 2017, Morozova *et al.* 2018). Подробное изучение биологии фагов и их взаимоотношения с их хозяевами является “ключом” для понимания микробных систем и их использования.

На данный момент по классификации международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) выделяют 11 семейств вирусов эубактерий (Рис.1). Количество семейств вирусов архей постоянно увеличивается по мере исследования новых объектов. В настоящее время их насчитывается 16 (Krupovic *et al.* 2016). Вирионы вирусов и/или их структурные элементы могут иметь бинарную, спиралевидную, икосаэдрическую, реже додекаэдрическую симметрию или плеоморфную морфологию. Большинство фагов содержат двуспиральную молекулу геномной ДНК, но существует несколько семейств фагов с однопонитевой ДНК, а также

однонитевой и двунитевой РНК (Рис.1). Некоторые типы фагов содержат в оболочке липиды. Хвостатые фаги составляют около 96% всех описанных бактериофагов (Ackermann 2007) и классифицируются в отдельный порядок *Caudovirales* и три больших семейства связанных между собой общим происхождением:

1. Podoviridae, имеющие короткий несократимый хвостовой отросток (хвост);
2. Siphoviridae, снабжённые длинным несократимым хвостом;
3. Myoviridae, обладающие сократимым хвостом.

Более подробную информацию о классификации вирусов прокариот и биологии отдельных их групп можно найти в работах (Ackermann 2007, Krupovic et al. 2016), а также в книгах (King *et al.* 2012, Sayers 2006). Необходимо отметить, что в настоящий момент происходит масштабная ревизия таксономии вирусов бактерий. Поэтому существующая на данный момент и использованная в работе классификация в значительной мере утратит актуальность в ближайшее время (Andrew Kropinski, личное сообщение). Так в 2018 году ICTV в рамках этой ревизии введено новое семейство хвостатых бактериофагов *Ackermannvirinae*, включающее ряд фагов, ранее входивших в состав семейства *Myoviridae* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

Существует более 6300 вирусных изолятов инфицирующих прокариотических хозяев, и только 117 инфицируют архей (Dellas *et al.* 2014). 29 классифицированных видов вирусов архей представляют 16 вирусных семейств, которые инфицируют 16 родов архей. В отличие от этого, 6000 известных бактериальных вирусных изолятов представляют только 10 вирусных семейств, классифицированных по морфологии и заражают более 200 родов бактерий. Подавляющее большинство вирусов архей было выделено на представителях фил *Euryarchaeota* (77 изолятов) и *Crenarchaeota* (40 изолятов) (Dellas et al. 2014).

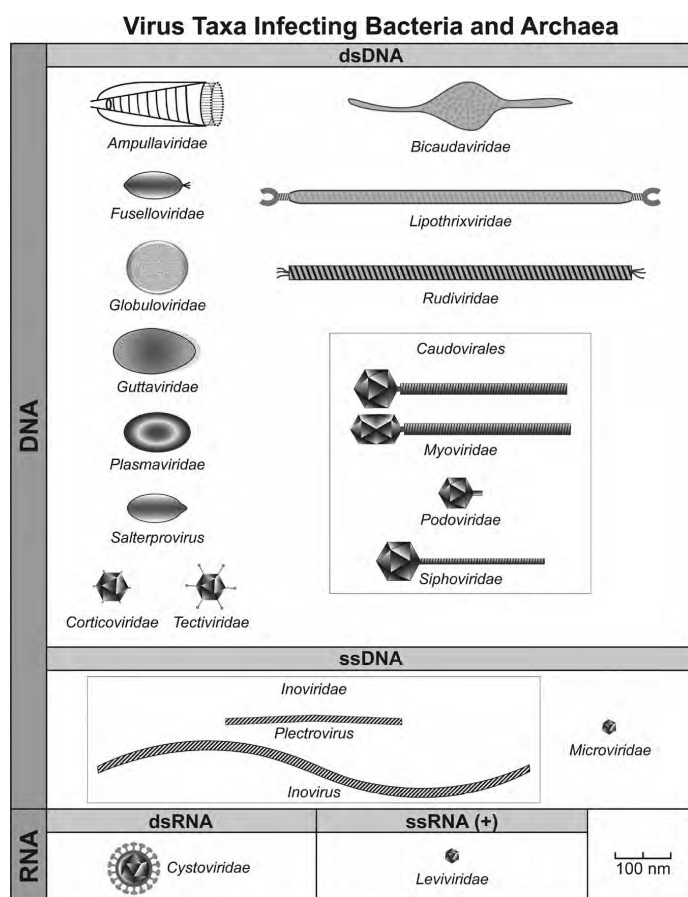


Рис. 1. Семейства вирусов, инфицирующих бактерии и архей (цит. по книге King et al. 2012)

В водных экосистемах фаги обеспечивают 10-80% общей суточной смертности бактерий и представляют собой существенный фактор, контролирующей численность популяций (Weinbauer 2004). Вследствие этого, фаговая инфекция оказывает влияние на структуру, активность, временную динамику и биологическое разнообразие бактерий. Кроме того, фаги вносят существенный вклад в создание генетического разнообразия бактерий, обеспечивая латеральный перенос генов за счёт специфической и неспецифической трансдукции, вызывая перестройки бактериального генома (Canchaya *et al.* 2003, Watson *et al.* 2018), а также действуя в качестве селективного агента, перераспределяющего ресурсы от наиболее представленных популяций к наименее представленным (Weinbauer 2004).

1.4 Жизненный циклы бактериофагов

Можно выделить несколько этапов жизненного цикла прокариотических вирусов, которые характерны также и для большинства вирусов эукариот: адсорбция, высвобождение нуклеиновой кислоты из белковой оболочки, экспрессия и репликация нуклеиновой кислоты, сборка вириона, выход потомства вируса из инфицированной клетки (Duckworth Goyal S.M., Gerba C.P. and Bitton G. 1987). Адсорбция фагов происходит в два этапа. Первый этап адсорбции это определение поверхностных клеточных структур, этот этап является обратимым и фаг имеет шанс диссоциировать от клетки без потери инфекционности. Во время второго этапа, происходит прочное связывание между структурой фага (например, осевой хвостовой фибриллой) и рецептором, которое запускает процесс необратимой перестройки вириона и высвобождение нуклеиновой кислоты. После адсорбции механизмы вирусной частицы обеспечивают проникновение сквозь оболочки бактериальной клетки (к примеру, с помощью специфических фаговых ферментов локализованных в хвосте или капсиде) и нуклеиновая кислота транспортируется в клетку, тогда как капсид остаётся на внешней поверхности клетки (только в случае семейства *Cystoviridae* происходит проникновение в клетку внутреннего нуклеокапсида вириона). После проникновения в клетку генетический материал вируса или встраивается в хозяйский геном, или остаётся в цитоплазме (Weinbauer 2004).

Существует несколько типов жизненных циклов бактериофагов: литический, лизогенный, псевдолизогенный и хронические инфекции (Рис.2) (Ackermann and Dubow 1987, Weinbauer 2004). В литическом (вирулентный) цикле фаг переключает клеточный метаболизм в направлении продукции новых фагов, которые освобождаются вследствие лизиса клетки. В лизогенном цикле, геном умеренного фага как правило интегрируется в геном хозяйской клетки и существует в нем неограниченное время в стадии покоя (профаг) и реплицируется вместе с

хозяином. В некоторых клетках спонтанно или под воздействием внешних факторов может происходить индукция профага, при которой он вырезается из хромосомы и переходит к литическому развитию, заканчивающемуся синтезом вирусных частиц и лизисом клетки.

При хронической инфекции потомство фагов постоянно выходит из заражённой хозяйской клетки посредством почкования или экстрезии без лизиса. Клетка при этом сохраняет жизнеспособность в течение более или менее длительного времени.

Наименее изученный жизненный цикл вирусов – псевдолизогенный. Феномен псевдолизогении был описан (Ackermann and Dubow 1987) как явление, где есть постоянное производство фагов в присутствии избытка хозяйских клеток. То есть, фаговый лизис не приводит к смерти культуры, а скорее находится в состоянии, в котором высокая численность фага сосуществует с экспоненциальной фазой роста хозяйских клеток.

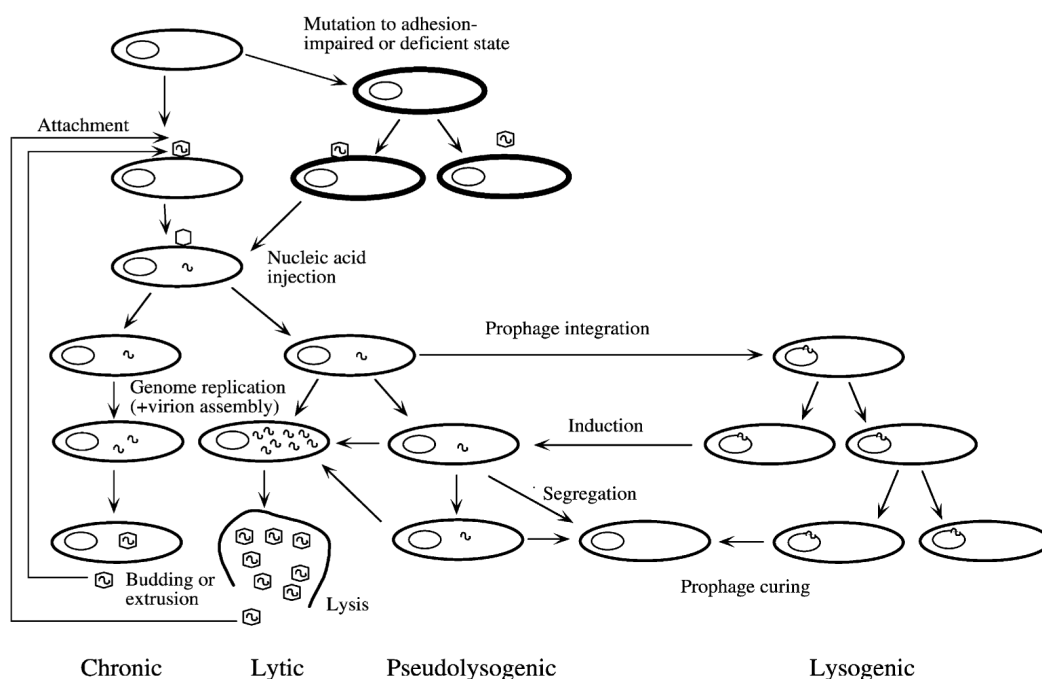


Рис. 2. Типы жизненных циклов вирусов (цит. по Weinbauer 2004).

1.5. Адаптация бактерий к бактериофагам

Хозяйская специфичность большинства бактериофагов обычно достаточно узка; инфекционность каждого отдельного вируса проявляется обычно по отношению к некоторому репертуару штаммов в пределах одного или нескольких очень близких видов бактерий. В некоторых случаях, однако, фаги могут инфицировать бактерий нескольких различных видов или даже родов. Ф. д'Эррель (1921) (D'herelle 1921) впервые предположил, что выделение фагов *Yersinia pestis* из фекалий крыс через 3 месяца после завершения эпидемии чумы может объясняться ростом этих вирусов на бактериях других видов.

Бактериофаг P1, который был выделен в 1951 году Luigi Bertani, инфицирует *E. coli* и другие энтеробактерии (*Shigella spp.*, *Salmonella spp.*) (Yang *et al.* 2017). Так же бактериофаг Mu способен инфицировать широкий спектр грамм-отрицательных бактерий (*E. coli C*, *Citrobacter freundii*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Salmonella arizonae*) (Patrick Higgins 2018) за счёт фазовых вариаций синтеза альтернативных адгезинов в результате инверсии так называемого G-сегмента в его геноме.

Таким образом, мультивидовая или мультиродовая специфичность некоторых фагов может иметь определённое экологическое значение в симбиотической микрофлоре животных. Тем не менее, во многих случаях даже близкие штаммы одного вида могут существенно отличаться по чувствительности к бактериофагам. Это означает, что воздействие фаговой инфекции на различные популяции отдельных видов или штаммов, населяющих одну и ту же экосистему тела животного, может различаться очень существенно. Культуральные методы являются в настоящее время единственным подходом, позволяющим изучать экологические взаимоотношения фагов и их хозяев с разрешением на уровне отдельных штаммов (Letarov *et al.* 2010).

Глава 2. Антифаговая защита бактерий

Бактериофаги широко распространены практически во всех природных и открытых техногенных микробных системах. В настоящее время не вызывает сомнений, что они оказывают значительное влияние на экологию бактерий (Abedon 2014, Chibani-Chennoufi *et al.* 2004), внося существенный вклад в общую смертность прокариот (от 10 до 80% для различных водных экосистем) (Sime-Ngando 2014, Weinbauer 2004). Селективное давление фагов стимулировало появление в процессе эволюции разнообразных естественных защитных систем бактерий, которые направлены на различные этапы жизненного цикла фага, в частности блокирование адсорбции, предотвращение проникновения ДНК, нарушение внутриклеточного развития фага в том числе разрушение поступившей в клетку ДНК и abortивные инфекции.

2.1 Блокирование фаговой адсорбции

Адсорбция фагов на хозяйские рецепторы является первым шагом инфекции, и зачастую определяющим способностью фага инфицировать данный штамм хозяев событием. Бактериофаги сталкиваются с удивительным разнообразием поверхностных молекул в составе хозяйских мембран и клеточных стенок (Rakhuba *et al.* 2010). Кроме того, в процессе эволюции бактерии выработали ряд барьеров для предотвращения адсорбции фага (Рис. 3). Эти блокирующие адсорбцию механизмы можно разделить, по меньшей мере, на четыре категории (Dy *et al.* 2014, Labrie *et al.* 2010):

1. блокирование фаговых рецепторов, путём их изменения за счёт мутаций или фазовых вариаций, либо специфического маскирования рецептора соответствующими белками;
2. маскирование клеточных рецепторов поверхностными полисахаридами, например, О-антигеном.

3. продукция внеклеточного матрикса, затрудняющего доступ фагов к поверхности клетки;
4. производство конкурентных ингибиторов.

Блокирование фаговых рецепторов

Для того чтобы ограничить распространение фагов, бактерии могут изменять свои клеточные поверхностные рецепторы и их конформации.

Например, *Staphylococcus aureus* продуцирует фактор вирулентности белок А, который располагается на поверхности клеточной стенки. Этот белок связывает Fc фрагмент IgG (Foster 2005). Nordstrom и Forsgren (1974) (Forsgren and Nordstrom 1974) провели ряд экспериментов, чтобы определить оказывает ли воздействие белок А на взаимодействие бактериофагов с *Staphylococcus aureus*. Адсорбцию бактериофага сравнивали на штаммах *S. aureus* богатых белком А и мутантных штаммах с небольшим количеством этого белка. Было показано, что чем больше штамм на своей поверхности содержит белка А, тем хуже адсорбируются фаги. Тем не менее, ингибирование стафилококковых фагов не наблюдалось при смешивании их с очищенным растворенным белком А. Белок А в качестве поверхностного компонента бактериальной клетки снижает уровень адсорбции, предположительно, маскируя клеточный рецептор фага (Рис. 3 а).

T5-подобные фаги продуцируют фактор исключения суперинфекции - липопротеин L_{pr}, который контролируется ранним промотором и синтезируется в начале инфекции. Белок L_{pr} включается во внешнюю мембрану в виде липопротеина и блокирует рецептор (FhuA или BtuB у различных T5-подобных фагов), исключая адсорбцию новых фаговых частиц (Braun, Killmann, and Benz 1994, Braun, Killmann, and Herrmann 1994). Этот белок также защищает вновь синтезированные вирионы фага T5 от инактивации путём связывания свободных рецепторов, которые высвобождаются из лизированных клеток (Labrie and Moineau 2007). Однако, хозяйские клетки так же могут использовать липопротеины для

ингибирования адсорбции. Такой механизм блокирования рецептора путем маскировки или изменения конформации белка OmpA был показан для F+ штаммов *E. coli*. Белок OmpA является одним из основных белков наружной мембраны *E. coli*. Для некоторых фагов данный белок выступает в качестве рецептора, а также необходим в клетках реципиентах для эффективной F конъюгации (Riede and Eschbach 1986). Липопротеин наружной мембраны TraT закодирован в F плазмиде, и ответственен за поверхностное исключение образования конъюгационных пар. В работе Riede и Eschbach (1986) (Riede and Eschbach 1986) показано, что TraT белок ингибирует специфическое связывание некоторых фагов с OmpA, в то время как на связывание фага T2, который использует белок OmpF как рецептор, присутствие F плазмиды не влияет.

Возбудитель коклюша *Bordetella pertussis* использует фазовые вариации для изменения своей клеточной поверхности, что необходимо для колонизации макроорганизма и выживаемости бактерий во внешней среде (Labrie et al. 2010). Продукция многих адгезинов и токсинов *B. pertussis* находится под контролем двухкомпонентной регуляторной системой BvgAS. Фаза Bvg+, которая необходима для колонизации дыхательных путей, характеризуется высокой активностью BvgAS и экспрессией факторов вирулентности и колонизации, которые включают адгезины, токсины и систему секреции типа III. В Bvg- фазе BvgAS является неактивной, вследствие чего факторы вирулентности и колонизации не экспрессируются (Mattoo and Cherry 2005). Рецептором фага BPP-1 является пертактин (Prn) наружной мембранный белок, принадлежащих к семейству ауотранспортных белков типа V, который экспрессируется только в фазе Bvg+, таким образом, эффективность заражения фагом клеток Bvg+ в миллион раз больше, чем при заражении Bvg- (Doulatov et al. 2004, Liu et al. 2002). Интересно отметить, что хотя этот рецептор отсутствует в клетках Bvg-, фаг BPP-1 по-прежнему способен заражать их, однако, с меньшей эффективностью, что свидетельствует о том, что этот фаг в процессе эволюции разработал

стратегию, которая позволит ему инфицировать клетки при отсутствии его основного рецептора (Labrie et al. 2010).

Патогенные микроорганизмы используют мобильные генетические элементы, в частности DGRs, для генерации разнообразия белков, изменяя их антигенные характеристики для уклонения от иммунитета хозяина, а также для защиты от бактериофагов. DGRs это машины для диверсификации последовательности ДНК и кодирующих их белков, встречающиеся в различных геномах бактерий и фагов, которые ускоряют эволюцию лиганд-рецепторного взаимодействия (Guo et al. 2014).

Бактериальные антигенные вариации чаще всего включают в себя один ген с высоким уровнем экспрессии, кодирующий высоко представленный поверхностный белок и десяток других (с более низким уровнем экспрессии или не экспрессируемый совсем), которые являются гомологами, но отличаются друг от друга. Замена всего или части экспрессируемого гена по средствам переноса ДНК приводит к антигенной вариации на поверхности бактериальной клетки.

Поскольку многие рецепторы не являются жизненно важными структурами для бактерий, мутанты, возникающие в популяции, могут выжить, избегая связывания с фагами. Примерами таких мутаций могут служить: точечные мутации; перестройки, инсерции в генах поверхностных белков или ферментов синтеза небелковых наружных структур клетки (Du et al. 2014).

Продукция внеклеточного матрикса

Бактерии производят внеклеточные полимеры, которые работают как физические барьеры, помогая выжить в различных экологических нишах, в тоже время, препятствуя прикреплению фагов (Рис. 3 b, c) (Du et al. 2014, Labrie et al. 2010). Экзополисахариды (ЭПС) такие как альгинат и гиалуроновая кислота формируют бактериальные капсулы. Плазмиды, кодирующие пути синтеза EPSs могут быть приобретены, путём горизонтального переноса и таким образом передавать фенотип, блокирующий адсорбцию (Forde and Fitzgerald 2003). Некоторые фаги

распознают эти внеклеточные полимеры, и несут в составе вирионов ферментативно-активные белки, которые могут их деградировать (Рис. 3 б). Гликоконъюгаты клеточной поверхности штаммов *E. coli* и сероваров *Salmonella spp.* чрезвычайно разнообразны. Как минимум два серотип-специфических поверхностных полисахарида производятся изолятами *E. coli*: липополисахариды (О-антиген) и капсулярный полисахарид (К-антиген). Фаги коэволюционируют вместе с этим разнообразием полисахаридов, а некоторые являются специфичными к этим антигенам. Капсульно-негативные мутанты не чувствительны к К-антиген специфическим фагам (Labrie et al. 2010). Аналогичное наблюдение было сделано для *Salmonella* фага P22, который в качестве клеточного рецептора использует липополисахариды (O12) (Рис. 3с) (Israel et al. 1967).

Фаги *Haemophilus influenzae* фаги также сталкиваются с запрограммированными фазовыми вариациями поверхности хозяйской клетки. Модификация в гене *lic2A*, кодирующий белок, который участвует в синтезе ЛПС отвечает за фазовые вариации О-АГ, предотвращающие адсорбцию *Haemophilus* фага HP1c1 (Zaleski et al. 2005).

Производство конкурентных ингибиторов

Молекулы естественным образом присутствующие в бактериальной среде могут специфически связываться с активными центрами фаговых рецепторов, что делает их недоступными для бактериофагов (Рис. 3а). Например, у *E. coli* белок FhuA представляет собой переносчик железа, а также является конечным рецептором для колифагов (T1, T5, F80, N15, НК02). Антимикробная молекула Microcin J25 (бактериальный токсин Colicin M и антибиотик albomycin) (Endriss and Braun 2004) также используют FhuA как рецептор и могут конкурировать с фагами за рецепторы, предотвращая их связывание. Microcin J25 продуцируется в условиях истощения питательных веществ и играет роль в микробной конкуренции путем ингибирования роста филогенетически родственных

штаммов и позволяет бактериям избежать фаговой инфекции (Destoumieux-Garzon *et al.* 2005).

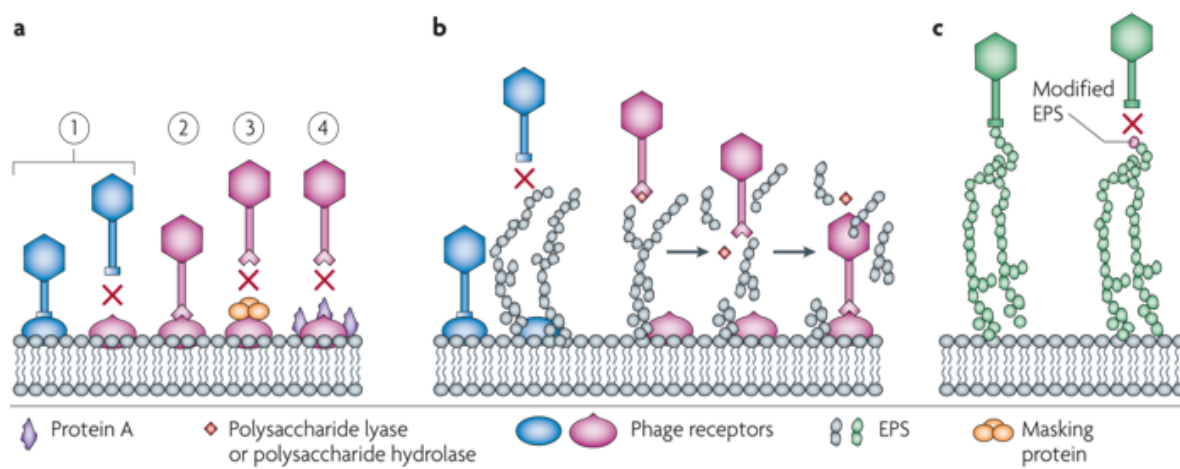


Рис.3. Различные стратегии используемые бактериями для блокирования адсорбции бактериофагов. а. Уход от фаговой инфекции на этапе адсорбции. Адсорбция фага на поверхности бактериальных клеток происходит через распознавание фагового рецептора на поверхности. Бактерии могут стать устойчивыми к фагам, модифицируя эти рецепторы клеточной поверхности (шаг 1); фаги могут адаптироваться к распознаванию этих новых рецепторов (шаг 2). Бактерии могут также продуцировать белки, маскирующие рецептор фага (шаг 3). *Staphylococcus aureus* производит белок А, который снижает уровень адсорбции фага (шаг 4). б. Фаговую адсорбцию также можно блокировать путём производства экзополисахарида (ЭПС), но фаги преодолевают слой ЭПС путём экспрессии полисахаридной лиазы или полисахаридной гидролазы для расщепления ЭПС. с. Также эволюция фагов направлена на специфическое распознавание полисахаридов, таких как О-антигены и К-антигены (цит. по Labrie *et al.* 2010).

2.2 Предотвращение инъекции ДНК фагов

Системы, предотвращающие суперинфекцию (Sie) это белки, которые блокируют проникновение фаговой ДНК в хозяйскую клетку, таким образом, наделяя иммунитетом клетки против конкретных фагов. Гены, кодирующие данные белки часто встречаются в профагах, это наводит на мысль, что во многих случаях системы Sie имеют важное значение для взаимодействия фаг-фаг, а не фаг-хозяин (Labrie *et al.* 2010).

Sie системы исследованы как у грамотрицательных бактерий, примерами могут служить *imm* (Lu *et al.* 1993), *sp* (Moak and Molineux 2000), *Sim* (Maillou and Dreiseikelmann 1990) и *SieA* (Hofer *et al.* 1995), так и у

грамположительных большинство из которых было идентифицировано у *Lactococcus Lactis*, наиболее хорошо охарактеризована система Sie₂₀₀₉ (Mahony *et al.* 2008).

2.3 Деградация фаговых нуклеиновых кислот

Системы рестрикции-модификации (R-M) распространены среди бактерий всех экологических ниш и таксономических групп (Wilson and Hoffman 1990). Активность этих систем обеспечивают несколько гетерогенных белков, которые были классифицированы на 4 группы (Тип I – тип IV). Основной функцией системы R-M как полагают, защищать клетку от вторжения чужеродной ДНК, включая вирусную. Когда неметилированная фаговая ДНК попадает в клетку, обладающую системой R-M, она будет распознана рестрикционным ферментом и деградирована, или, с меньшей вероятностью, метилирована соответствующей метилазой. В последнем случае потомство выжившего фага будет полностью метилировано и устойчиво к действию данной системы R-M. Судьба фаговой ДНК определяется в основном скоростью обработки этих двух ферментов (рестриктаза, метилаза). Рестриктазы обычно являются более активными, чем метилаза, поэтому фаговая ДНК проникнув в клетку, расщепляется, при этом хозяйская ДНК всегда защищена в результате действия метилазы (Labrie *et al.* 2010).

Бактериальный Agronaute

Эукариотический белок Agronaute (Ago), как известно, связывает и сопровождает малые РНК (siRNA) к комплементарным транскриптам, чтобы подавить экспрессию генов - этот процесс называется РНК-интерференция (RNAi). RNAi имеет множество функций, в том числе противовирусную защиту и регуляцию генов (Du *et al.* 2014). Гомологи Agronaute в большом количестве встречаются в геномах бактерий и архей (Anantharaman *et al.* 2002). Роль прокариотических Ago вариантов остаётся неясной, хотя биоинформатический анализ предположил их участие в

защите хозяина (Swarts *et al.* 2014). В работе Swarts *et al.*, 2014 (Swarts *et al.* 2014) было показано, что Ago бактерии *Thermus thermophilus* (TtAgo) выступает в качестве защиты от внедрения и распространения чужеродной ДНК. В то время как у эукариотов белок Ago всегда содержит домен PAZ (связывающий олигонуклеотиды), у прокариотов Ago (pAgo) гомологи делятся на две основные группы, в которых домен PAZ или присутствует, или отсутствует. Почти все pAgo, в которых домена PAZ нет, по всей видимости, инактивируются и соответствующие гены, связывают с различными прогнозируемыми нуклеазами в предполагаемых оперонах. При этом почти все домены PAZ содержащиеся в pAgo предположительно обладают нуклеазной активностью. Было экспериментально показано, что некоторые белки этой группы присутствующие у некоторых бактерий (например, *Aquifex aeolicus*) обладают нуклеазной активностью и, как правило, не ассоциированы с генами других нуклеаз. С учётом этих наблюдений, очевидно, что эти белки участвуют в защите от фагов и/или плазмид, также авторы предполагают, что pAgo является ключевым компонентом нового класса защитных систем (Makarova *et al.* 2009).

CRISPR-Cas системы

Первый анализ геномных последовательностей бактерий и архей, нацеленный на изучение специфических элементов (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats), был проведен (Mojica *et al.* 2000). После чего, началось планомерное изучение особых участков (локусов) бактериального генома, которые представляют собой расположенные группами короткие палиндромные повторы. Эти локусы найдены у 90% архей и 40% бактерий (Sorek *et al.* 2008). Локусы CRISPR состоят из нескольких несоприкасающихся палиндромных повторов, между которыми имеются промежутки — спейсеры. Спейсер представляет собой короткий участок вирусной или плазмидной ДНК. Размер CRISPR-повтора исчисляется 21–48 нуклеотидными парами, а спейсеров — от 26 до 72 нуклеотидных пар (Makarova *et al.* 2006). В бактериальном геноме, может

быть, не один, а несколько локусов CRISPR. В непосредственной близости от CRISPR расположены гены специальных белков, называемых Cas (CRISPR associated). Обычно Cas — это нуклеазы, полимеразы, нуклеотид-связывающие белки; всего эта группа объединяет около 40 семейств белков. В работе Barrangou et al. (Barrangou *et al.* 2007) было экспериментально показано, что бактерия *Streptococcus thermophilus* в ходе борьбы с вирусами-бактериофагами изменяет последовательность CRISPR, достраивая к концу старой последовательности ещё одну или несколько единиц «повтор/спейсер». Добавленные спейсеры были аналогичны участкам вирусного генома. При этом бактерии приобретали устойчивость к данному вирусу. Если изменить последовательность нуклеотидов добавленного спейсера или вообще вырезать спейсер, то приобретенная устойчивость к фагу теряется (Deveau *et al.* 2008). В сущности, система CRISPR-Cas и фаговый ответ в полной мере иллюстрируют динамику коэволюции между обеими группами микроорганизмов и на данном момент признано, что CRISPR-Cas системы играют существенную роль в структуре микробных сообществ (Andersson and Banfield 2008).

2.4 Абортивная инфекция

К средствам противовирусной защиты бактерий относятся и системы абортирования фаговой инфекции (Abi). Системы абортивной инфекции – это системы, основанные на альтруистическом суициде инфицированной клетки, которые могут детектировать фаговую инфекцию по тем или иным триггерным молекулам и вызвать гибель инфицированной клетки до того, как будет синтезировано жизнеспособное потомство вируса (т.е. в течение эклипс-периода жизненного цикла). Как правило, мишенью этих систем Abi являются важные стадии фагового размножения, такие как репликация, транскрипция трансляция (Labrie et al. 2010). Исследование систем Abi начались более 55 лет назад, однако даже сейчас их механизмы действия все ещё не полностью изучены, отчасти это связано с тем, что они являются

очень сложными и частично из-за отсутствия достаточных данных в области биологии фагов. Известно несколько таких систем, наиболее изученной является двухкомпонентная система Rex (состоящая из белков RexA и RexB), которая функционирует в штаммах *E. coli* и направлена против различных колифагов (например, T4) (Molineux 1991). У *E. coli* существует еще одна Abi система Lit, которая активизируется при инфекции фага T4 (Bingham *et al.* 2000, Kaufmann 2000). Интересно, что как минимум 23 различных системы Abi было описано у *Lactococcus lactis* (Chopin *et al.* 2005).

Глава 3. Механизмы преодоления фагами устойчивости бактерий

Для того чтобы размножаться в средах с большим количеством фагов, бактерии имеют внушительный арсенал защитных механизмов (см. раздел антифаговая защита), а в ответ, фаги в процессе эволюции вырабатывают контр-стратегии, чтобы преодолеть эти противовирусные системы защиты. Результатом этого процесса является многообразие стратегий взаимной адаптации, используемых бактериями и фагами, в силу того, что им приходится сосуществовать в различных природных экосистемах.

3.1 Доступ к хозяйским рецепторам

Как уже говорилось ранее для эффективной фаговой инфекции важным является доступность рецепторов и их пространственное распределение на поверхности клетки (Rothenberg *et al.* 2011). Однако, бактерии могут противостоять инфекции путём модуляции доступности рецепторов или путём блокирования фагового рецептора (Foster 2005, Kim and Ryu 2012). Для преодоления таких барьеров, фаги могут восстанавливать или приобретать заново способность связываться со своими мишенями, поддерживая тем самым изменение и/или расширение их хозяйского спектра (Samson *et al.* 2013).

Адаптация к новым рецепторам В результате микроэволюционных процессов RBP (рецептор-связывающий белки) хвостатых фагов могут изменяться, приобретая тропизм к новым рецепторам (Рис. 4а). Исследования фага λ (из семейства *Siphoviridae*) и его хозяина *E. coli* B показали, что этот фаг может в результате накопления мутаций изменить рецептор. Meyer et al. (Meyer et al. 2016, Meyer et al. 2012, Petrie et al. 2018) исследовали строго литический мутант фага λ c126. Известно, что инфекция *E. coli* происходит за счёт взаимодействия белка центральной фибриллы J, расположенного на конце хвоста фага с белком LamB на поверхности мембраны хозяина. Снижение экспрессии белка LamB приводит к отбору мутации в пределах гена *J* фага c126, которая даёт возможность связываться с новым рецептором OmpF на поверхности своего хозяина. Таким образом, когда снижается экспрессия LamB, фаг сохраняет свой первоначальный тропизм, а также получает доступ к новым рецепторам (Chatterjee and Rothenberg 2012, Meyer et al. 2016, Meyer et al. 2012, Samson et al. 2013). В дальнейшем адаптация за счёт дополнительных мутаций увеличивает эффективность распознавания OmpF.

Кроме этого, было показано, что когда происходит экспрессия мутантной формы хозяйского рецептора, фаги могут эволюционировать, чтобы распознать изменённую структуру рецептора (Samson et al. 2013). Например, фаг ϕ X174 (семейство *Microviridae*), использует капсидный белок F для связывания с ЛПС структурами на поверхности *E. coli* (Michel et al. 2010). В 1974 году Suzuki et al. (Suzuki et al. 1974) показали, что адсорбция фага ограничена бактериями, которые обладают специфическими рецепторами, при этом репликацию ДНК ϕ X174 могут обеспечивать почти любые штаммы *E. coli* и даже отдалённо родственные бактерии, такие как *Pseudomonas aeruginosa*. В работе Pepin et al. (Pepin and Wichman 2008) была исследована эволюция вирусов ϕ X174, пассируемых на клетках *E. coli*, которые отличались только структурой рецептора (ЛПС). При секвенировании нескольких бактериофагов из популяций конечных

пассажей в геномах были обнаружены несколько нуклеотидных замен в генах, экспрессирующих следующие белки: С (ДНК-связывающий белок), D (внешний поддерживающий (каркасный) белок), E (белок лизиса), F (основной капсидный белок), H (белок направляющий ДНК для инъекции) и K (белок, влияющий на выход фага). Большинство мутаций было обнаружено в фаговом белке F, однако наличие мутаций в белках H и K также обеспечивали фагов способность инфицировать клетки, экспрессирующие изменённый хозяйский рецептор. Это свидетельствует о том, что важным фактором является не только изменение белков участвующих в адсорбции, но и в других этапах жизненного цикла бактериофагов.

Baba et al. (2006) (Baba *et al.* 2006) в своей работе исследовали способность фага T7 (семейство *Podoviridae*) инфицировать штаммы *E. coli* с мутациями в генах, участвующих в биосинтезе ЛПС, а также идентифицировали места связывания бактериофага. Фибриллы фага T7 распознают первый остаток глюкозы в кор-олигосахариде ЛПС вместе с предпоследней глюкозой или последней гептозой цепи O-ПС, или два этих последних остатка звена O-ПС без участия кор-ОС. Мутанты фагов, которые в процессе эволюции приобрели способность связываться с изменёнными ЛПС, также были успешно выделены путём последовательных пассажей на штаммах *E. coli* синтезирующих различные ЛПС структуры. Все отобранные мутанты T7 имели изменения в генах белков хвостовой трубки. Некоторые из полученных мутантов приобрели способность размножаться и на диком штамме и на мутантах, не зависимо от структур ЛПС (Qimron *et al.* 2006). Антагонистическая коэволюция между *Pseudomonas fluorescens* SBW65 и фага φ2 (семейство *Podoviridae*) привела к селекции устойчивых бактерий и образованию мутантных фагов. Было выделено 8 фаговых фенотипов с различной инфекционной способностью (в дополнение к дикому типу) каждого из которых нёс уникальный набор мутаций. С помощью секвенирования было показано, что каждый фенотип отличается от других

генотипически. Расширение хозяйского спектра фага коррелировало с увеличением генетической дивергенции генов адсорбционного аппарата. Большинство изменений произошло в гене, который кодирует хвостовую фибриллу фага, которая, предположительно, играет решающую роль для обратимой адсорбции фагов на поверхности бактериальной клетки (Scanlan *et al.* 2011). Так же данные исследования показали, что гены фага, кодирующие белки, которые участвуют в распознавании хозяйской клетки, являются одними из самых быстро эволюционирующих генов фага, вследствие влияния отбора в процессе коэволюции фаг-хозяин (Paterson *et al.* 2010, Samson *et al.* 2013).

Активное преодоление маскирования рецепторов

В тех случаях, когда клеточный рецептор маскируется поверхностными структурами клетки, такими как капсула или экзополисахарид (ЭПС), либо матриксом биоплёнки, фаги могут получить доступ к рецептору путём гидролиза этих полимеров (Рис. 4b) (Samson *et al.* 2013).

Ферменты, разрушающие полисахариды (полисахаридные деполимеразы (PD) могут быть классифицированы в две группы: гидролазы и лиазы. Эти ферменты являются очень гетерогенной группой в отношении субстратной специфичности, молекулярной массы или чувствительности к физическим и химическим факторам. Лиазы – класс ферментов, катализирующих реакции, в результате которых происходит разрыв связи C—C, C—O, C—N или др., сопровождающийся образованием двойных связей, а также обратные реакции - присоединения по двойным связям. Разрыв связи в этих реакциях не сопряжён с гидролизом или с окислительно-восстановительными превращениями.

В работе de Oliveira *et al.* (Oliveira, Costa, *et al.* 2017) было показано, что вирулентные бактериофаги (сем. *Podoviridae*) *Acinetobacter*, обладают белками с деполимеразной активностью, представляющие собой пектат-лиазные домены, способные распознавать различные типы бактериальных капсул. Взаимодействие с капсулой является ключевым шагом на этапе

адсорбции для исследуемых фагов, поскольку клетки, лишённые капсулы не инфицируются фагами.

Гидролазы разрывают гликозил-кислородную связь в гликозидной связи путём присоединения воды (Labrie et al. 2010). Некоторые фаги *Bacillus ssp* производят ферменты, которые разлагают поли-γ-глутаминовую кислоту капсулы клеток хозяина (Sutherland et al. 2004). Эти вирусные ферменты найдены либо ассоциированными с рецептор-связывающим комплексом вириона, либо выделяются в виде свободных растворенных молекул из лизированных бактериальных клеток (Maszewska 2015, Sutherland 1995). Эти ферменты очень высоко специфичны и редко действуют другие, даже близкородственные полисахаридные молекулы. Было изолировано большое число фагов, кодирующих ферменты, способные разрушать ЭПС различных грамотрицательных бактерий. К их числу относятся фаги, инфицирующие бактерий, которые формируют биоплёнки (Sutherland et al. 2004). Исследование, проведённое со штаммом *Enterobacter agglomerans* показало, что бактериофаги, обладающие полисахаридными деполимеразами для этих штаммов широко распространены в исследованных образцах из окружающей среде. В частности, особенно были представлены фаги, обладающие деполимеразной специфичностью к ЭПС штаммов 53b и Ent *E. agglomerans*. Полисахарид - деполимераза фага SF153b была очень активна в широком диапазоне условий окружающей среды. Это является жизненно важным, так как фаг получает доступ к рецепторам на клеточной поверхности и инфицирует бактерию при таком широком диапазоне условий окружающей среды (Sutherland 1999). Фаг P22 инфицирующий *Salmonella*, который в качестве клеточного рецептора использует липополисахариды (O12) (Рис. 4с) обладает эндогликозидазной активностью, что позволяет ему преодолеть 100 нм О-АГ слой (Israel et al. 1967).

Гиалуронан (также известный как гиалуроновая кислота) состоит из чередующихся N-ацетилглюкозамина и остатков глюкуроновой кислоты и

является составной частью капсулы патогенных стрептококков. Этот вирулентный фактор способствует бактериальным клеткам избежать воздействия факторов иммунной системы (антитела, комплемент, фагоциты). Известно, что гены, кодирующие гиалуронидазы (ферменты, деградирующие гиалуронан) часто встречаются в профагах, которые встроены в геномы патогенных бактерий. Однако, гиалуронидазы бактериофагов разрушают не только бактериальную гиалуроновою кислоту, но и принадлежащую клеткам макроорганизма, способствуя распространению бактерий через соединительные ткани (Labrie et al. 2010). У фага H4489A есть гиалуронат-лиаза (НА лиаза), связанная с его хвостовыми фибриллами, которая деградирует капсулу *Streptococcus pyogenes*, способствуя, таким образом, адсорбции фага на поверхности клеточной стенки (Baker et al. 2002). У фагов *Klebsiella* гликаназы также ассоциированы с хвостовыми фибриллами, и осуществляют деполимеризацию бактериальной капсулы для облегчения адсорбции (Du et al. 2014).

Еще одним известным примером фага, способного деградировать бактериальную капсулу, является колифаг K1F, который экспрессирует эндосиалидазу, которая распознает и деградирует капсулу K1 *E. coli* (Scholl and Merril 2005). Бактериофаги, специфичные к *E. coli* K1, экспрессируют хвостовой шип, который разрушает слой полисиаловой кислоты *E. coli* K1, что необходимо для инфекции. Этот фермент специфичен для полисиаловой кислоты и относится к семейству эндосиалидаз. Это семейство необычно, потому что все другие ранее известные сиалидазы не относятся к этому семейству и являются экзо- или транс-сиалидазами (Morley et al. 2009).

В работе Leiman et al. (Leiman et al. 2007) с помощью криоэлектронной микроскопии были определены структуры фагов K1E и K1-5 и на основании которых был установлен механизм, с помощью которого эти фаги достигают конечного рецептора. Используя специфическую гликозидазу, оба фага проникают через массивную капсулу нейроинвазивного патогена

E. coli K1. В дополнение к K1-специфической гликозидазе, каждая частица фага K1-5 несёт второй фермент, который позволяет ему инфицировать также и *E. coli* K5, капсула которого отличается по химической структуре от капсулы *E. coli* K1. Эти капсульные деполимеразы организованы в мультипротеиновый комплекс, прикрепленный через адаптерный белок со стороны портовой вершины вирусного капсида. Структура комплекса предполагает механизм процессивной деградации, который происходит при прохождении фага через полисахаридную капсулу. Прохождение бактериофага осуществляется через капсулу толщиной 4000 Å в результате чего создаётся довольно прямой, узкий туннель, ведущий к поверхности клетки, что указывает на деградацию капсулы и миграцию фага, данные события являются совместными и процессивными. (Рис. 4d).

Алгинаты – внеклеточные полисахариды, которые главным образом производятся *Pseudomonas ssp.*, *Azotobacter ssp.* и некоторыми морскими водорослями, также представляют заметное препятствие для фаговой инфекции. Фаг PT-6 кодирует растворимую алгинат-лиазу, которая высвобождается после разрушения клеток и усиливает фаговую инфекцию штаммов *Pseudomonas aeruginosa* CF, способных образовывать биоплёнки в лёгких больных муковисцидозом (Glonti *et al.* 2010, Hanlon *et al.* 2001). Бактериофаг 2, инфицирующий штамм *Pseudomonas aeruginosa* VI, обладает деполимеразной гидролитической активностью в отношении слизистого гликопротеинового слоя и ЛПС, однако фермент в отличие от фага PT-6 связан с адсорбционным аппаратом фага 2 (Castillo and Bartell 1974, 1976).

Распознавание переменных хозяйских рецепторов

Вероятность инфекции фагами хозяйских клеток уменьшается, когда хозяйские рецепторы экспрессируются только при определённых экологических условиях или в ответ на определённый сигнал, такой как quorum sensing. Если экспрессия рецептора на поверхности клетки происходит стохастически (например, зависит от фазовых вариаций или фазы роста), фаги могут увеличить вероятность инфицирования своего

хозяина путём кодирования РСБ с переменной специфичностью (Рис. 4с) (Samson et al. 2013).

Deversity-generating retroelements (DGRs) участвуют в целенаправленном видоизменении RBP некоторых бактериофагов. DGR был впервые идентифицирован в умеренном фаге BPP-1. Этот элемент обуславливает его способность к генерации повышенной изменчивости в гене *mtd*, который определяет тропизм к рецепторам на поверхности хозяина *Bordetella ssp.* Переключение на другой рецептор является процессом опосредованным обратной транскриптазой, которая часто вносит нуклеотидные замены в определённых местах в пределах гена мишени DGR кодирующем фрагмент RBP. С помощью не вполне понятного механизма рекомбинации кДНК, продуцируемая DGR иногда встраивается в рабочий локус RBP, что приводит к изменению аминокислотных остатков, вовлечённых в формирование рецептор-узнающего центра. DGR фага BPP-1 может теоретически производить более 10^{14} различных нуклеотидных последовательностей на С-конце гена *mtd* (Liu et al. 2002). DGRs также были идентифицированы у других фагов и профагов (Medhekar and Miller 2007).

Лизин, ассоциированный с хвостом (Tal) у фагов *Lactococcus lactis* Tuc2009 и TP901-1 (семейство *Siphoviridae*), имеет M23 пептидазный домен, локализованный на конце хвоста и этот домен гидролизует пептидогликаны по средствам d-Ala-dAsp эндопептидазной активности. Эта активность необходима, чтобы позволить фагу проникнуть через высокосшитый муреин клеточной стенки *Lactococcus lactis*, находящихся в стационарной фазе. Однако, эти пептидазы ассоциированные с хвостом могут, так или иначе, подвергаться протеолитическому процессингу по глицин-богатым GG(S/N)SGGG последовательностям в середине белка, что приводит к удалению С-концевого домена и потере эндопептидазной активности. В результате этого уменьшается способность фага инфицировать клетки в стационарной фазе, но при этом усиливается адсорбция на экспоненциально

растущих клетках. Таким образом, протеолитическое расщепление РВР можно считать стратегией подстраховки, поскольку в результате получается смешанная популяция вирионов, которые адаптированы для инфицирования клеток-хозяев в различных физиологических состояниях (Stockdale *et al.* 2013).

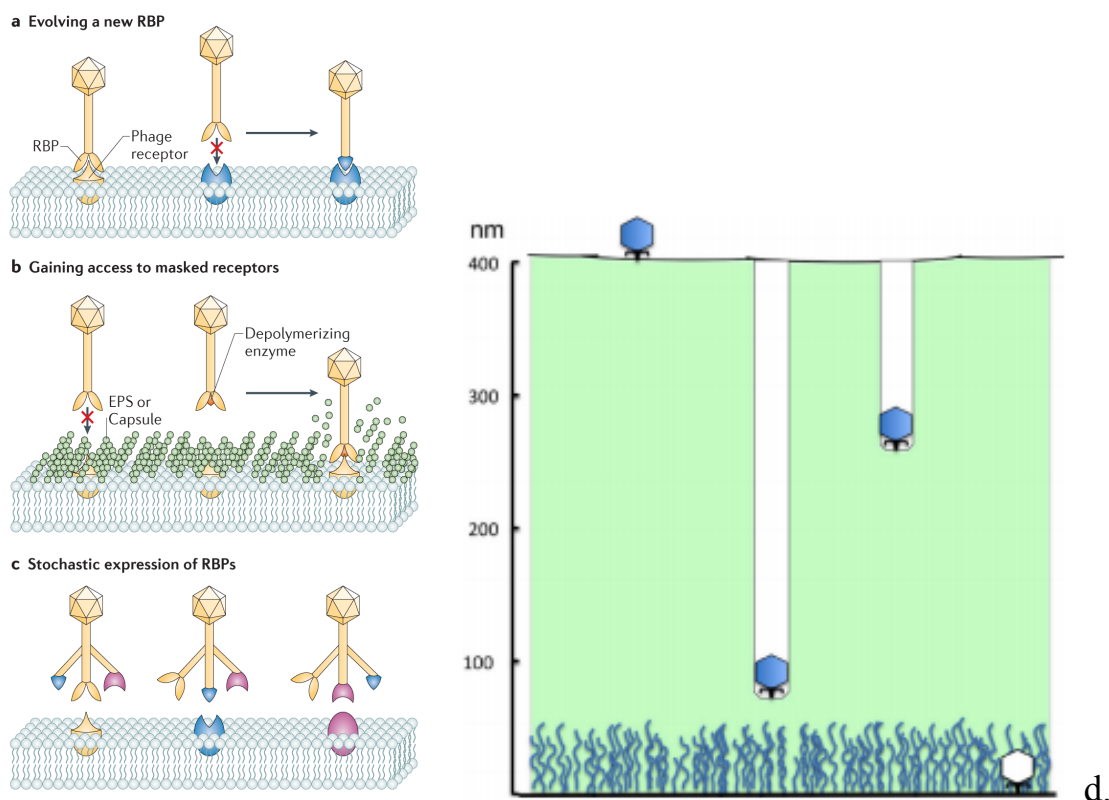


Рис. 4. Возможные стратегии бактериофагов для доступа к рецепторам хозяина. а. Фаги могут адаптироваться к изменениям рецепторов. Рецептор-связывающие белки фага (RBP) распознают специфические рецепторы на поверхности клетки-хозяина, но если родственный рецептор модифицирован мутацией или заменён другой молекулой, то фаг неспособен адсорбироваться хозяине. Чтобы связаться с этим модифицированным рецептором хозяин и инфицировать клетку, фаг может эволюционировать, путём приобретения мутаций в генах, кодирующих RBP или хвостовые фибриллы. Например, мутации в гене, кодирующем белок J колифага λ , позволяют этому RBP распознавать новый рецептор OmpF в дополнение к родственному рецептору LamB. б. Экспрессия поверхностных молекул (например, капсула или экзополисахарид (ЭПС) может ограничить или предотвратить доступ фага к конечному рецептору. Если фагу не хватает ферментов, необходимых для деградации капсулы или биоплёнки, он не сможет получить доступ к рецептору. Однако, если фаг обладает деполимеразой, он может деградировать эти вещества, чтобы освободить доступ к рецептору. с. Некоторые бактерии могут изменять уровень экспрессии рецепторов, либо путём фазовых вариаций, либо посредством физиологической регуляции (например, в зависимости от фазы роста). В ответ фаги могут изменять свои RBP таким образом, чтобы они могли взаимодействовать с тем поверхностным компонентом, который в данный момент представлен на хозяйской клетке. Это может быть достигнуто путём направленного мутагенеза гена, кодирующего основную детерминанту тропизма (Mtd) с помощью DGR, как у фага для *Bordetella pertussis* BPP-1, путём протеолитического процессинга хвостовой фибриллы как это происходит у бактериофагов *Lactococcus lactis* TP901-1 и Tuc2009 или путём дупликации His Box элементов за счёт неравного кроссинговера (Samson et al. 2013). d. Проникновение K-специфичных колифагов к поверхности клетки за счёт процессивного гидролиза K-полисахарида энзиматически активными хвостовыми шипами (цит. по Letarov and Kulikov 2017).

Хорошо изученный колифаг Т4 (семейство *Myoviridae*) кодирует белок хвостовой фибриллы gp37, кончик которого определяет хозяйский спектр (Cerritelli *et al.* 1996). Этот фаг в основном инфицирует *E. coli* и близкородственные штаммы *Shigella spp.*, однако были изолированы мутанты фага Т4, которые могут инфицировать филогенетически далекого хозяина *Yersinia pseudotuberculosis*. Некоторые из этих мутантов содержат либо аминокислотные замены в белке Gp37 дистальных хвостовых фибриллах, либо происходит неравный обмен между сериями последовательных мотивов (His boxes) в том же регионе. Дупликация или мутационные изменения этого сегмента, по-видимому, достаточно для адсорбции фага на рецептор *Yersinia pseudotuberculosis* (Tetart *et al.* 1998, Tetart *et al.* 1996).

Изменения хозяйского спектра также могут вызывать рекомбинации в генах белков хвостовых фибрилл, такой механизм был продемонстрирован в работе Lin *et al.* (Lin *et al.* 2012) на примере гибридных фагов Т3 и Т7. В качестве альтернативы, более широкий спектр может возникнуть в результате одновременной экспрессии нескольких различных RBP. Например, геном колифага phi92 (семейство *Myoviridae*) кодирует четыре различных фибриллярных белка, входящие в состав вириона и позволяющие ему инфицировать широкий спектр штаммов *E. coli* и *Shigella spp.* (Samson *et al.* 2013, Schwarzer *et al.* 2012).

3.2 Преодоление систем рестрикции-модификации (R-M)

Бактериальные геномы кодируют огромное разнообразие R-M систем. Соответственно, фаги используют целый ряд антирестрикционных стратегий, которые можно подразделить на пассивные и активные механизмы.

Пассивные механизмы

Когда геномная двухцепочечная фаговая ДНК проникает в хозяйскую клетку, содержащую систему R-M, она будет защищена, в том случае, если метилаза быстро действует и модифицирует ДНК до того, как рестриктаза

ее распознает. Таким образом, модифицированный геном фага может реплицироваться в штамме с R-M системой, а так же может размножаться в других клетках, которые экспрессируют ту же самую R-M систему (Kruger *et al.* 1988, Lacks and Greenberg 1975, Samson *et al.* 2013, Tock and Dryden 2005).

Активные механизмы

У колифага P1 (семейство *Myoviridae*) есть белки DarA и DarB, которые проникают в хозяйскую клетку совместно с геномом фага. Оба белка связываются с ДНК фага, тем самым, маскируя сайты распознавания R-M системы I типа, предотвращая деградацию ДНК (Atanasiu *et al.* 2002, Lida 1987). Существуют и другие активные механизмы защиты (Drozd *et al.* 2012, Hill *et al.* 1991, Studier and Movva 1976, Zabeau *et al.* 1980).

3.3 Уклонение от CRISPR-Cas систем

Другой антифаговый механизм, который защищает хозяина путем расщепления чужеродной ДНК CRISPR-Cas иммунной системой. Эта система состоит из CRISPR локусов и Cas генов (Garneau *et al.* 2010). Прямые повторы в CRISPR локусе разделены на короткие отрезки, не повторяющейся ДНК, называемых спейсеры. Нуклеотидная последовательность спейсера должна быть подобна области генома фага (протоспейсер) для того, чтобы сформировать направляемую короткими РНК сайт-специфическую нуклеазу, которая блокирует репликацию фага, деградируя его ДНК (Deveau *et al.* 2008).

Уклонение с помощью мутаций

Фаги могут избежать воздействия CRISPR-Cas систем путем однонуклетотидных замен в области протоспейсера или в консервативных мотивах, прилегающих к протоспейсеру (PAM) (Deveau *et al.* 2008).

Преодоление по средствам анти- CRISPR генам

Исследования Bondy-Denomy *et al.* (Bondy-Denomy *et al.* 2013) показали, наличие пяти различных анти-CRISPR генов у умеренных фагов

Pseudomonas aeruginosa. Сравнение геномов этих профагов показало, что анти-CRISPR гены расположены вблизи от генов кодирующих белки капсида. Мутационный анализ показал, что анти-CRISPR активность связана с небольшим фаговым белком. Этот белок может быть упакован в капсид, и доставляться в клетку вместе с геномом вируса, или же он может синтезироваться сразу после попадания генома в клетку, для быстрой нейтрализации иммунной системы хозяина.

Фаги, кодирующие собственную CRISPR-Cas систему

Недавно были обнаружены фаги холерного вибриона серогруппы O1, кодирующие собственную функциональную CRISPR-Cas систему (Seed *et al.* 2013). В течение вирусного инфекционного цикла, вирусные crRNAs и Cas белки синтезируются и образуют комплексы, мешающие работе CRISPR-Cas системы хозяина. Эта система позволяет фагу закончить литический цикл. Таким образом, фаги могут похищать бактериальные CRISPR-Cas системы, чтобы способствовать собственному размножению (Villion and Moineau 2013).

3.4 Преодоление механизмов abortивной инфекции

Преодоление системы Abi

Система Abi Lit кодирует дефектного профага ϕ 14 *E. coli* и приводит к общему ингибированию трансляции во время инфекции фага T4. Белок Gol связывается с рибосомальным фактором элонгации Tu (EF-Tu), который активизирует протеазу системы Lit. Эта протеаза расщепляет EF-Tu и блокирует синтез клеточного белка, что приводит к гибели клеток и abortивной фаговой инфекции (Bingham *et al.* 2000). Производные фага T4, которые имеют мутации в гене *gol*, не активируют Lit и, следовательно, способны к репликации в Lit положительных штаммах (Samson *et al.* 2013).

Преодоление двухкомпонентной системы Rex

Так же существует механизм преодоления двухкомпонентной системы Rex, которая была найдена в λ -лизогенных штаммах *E. coli*, предотвращает

заражение другими колифагами. T4rII фаги могут инфицировать Rex положительные штаммы, если фаг содержит мутировавший ген *motA*. Этот ген кодирует транскрипционный ко-активатор, который перенаправляет хозяйскую РНК-полимеразу от промоторов рано эспрессирующихся генов к генам экспрессируемых в середине инфекции. В Rex положительных штаммах инфицированных фагами с мутированным геном *motA*, деполяризация мембраны затруднена, что позволяет завершить цикл фаговой инфекции (Hinton 2010, Snyder 1995).

Глава 4. T5 - подобные бактериофаги

T5 - подобные бактериофаги, объединяемые Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) в род *T5virus*, относятся к семейству *Siphoviridae*. Эти вирулентные фаги, инфицируют грамотрицательные бактерии сем. *Enterobacteriaceae*. На данный момент в базе данных GenBank опубликовано около 60 полных геномных последовательностей T5-подобных фагов. Из них только T5 и BF23 были изучены в деталях (Sayers 2006). Недавно группой Domonkos описаны еще 12 T5-подобных бактериофагов (Sváb et al. 2018). Далее представлены некоторые представители рода *T5virus*: *E. coli* T5 (Zweig and Cummings 1973, Zweig et al. 1972), BF23 (Nagasu et al. 1988), 29a, BG3, PB, CEV2 (Viazis et al. 2011), bv_EcoS_AKF33 (Niu et al. 2012), H8 (Rabsch et al. 2007), *Salmonella* фаги EPS7 (Hong et al. 2008) и SPC35 (Kim and Ryu 2011), *Vibrio* фаг pVp-1 (Kim et al. 2012) и *Pectobacterium* фаг My1 (Lee et al. 2012).

4.1 Структура вириона

Структура капсида

Частица бактериофага T5 имеет изометричный икосаэдрический капсид (T=13) диаметром около 90 нм, который содержит линейную двуцепочечную молекулу геномной ДНК, размером приблизительно 121,3 kbp (Abedon 2008). Вирион снабжен длинным гибким несократимым хвостом длиной около 250 нм (Boulanger et al. 2008). Effantin et al. (Effantin

et al. 2006) была получена реконструкция частицы T5 фага с помощью криоэлектронной микроскопии (Рис.5а). На данный момент известно, что к структурным белкам капсида фага T5 относятся: major head protein pb8 (32,8 kDa); декорирующий белок pb10 (17,3 kDa); головочная протеаза pb11 (15,8 kDa), порталный белок pb7 (43,8 kDa) и p144 (Huet *et al.* 2010, Zivanovic *et al.* 2014) (Табл.1).

Табл. 1. Структурные белки капсида бактериофага T5

Gene	ORF	Название белка	Mr (kDa)	Функция белка
	T5p144	p144	19,3	Head completion
<i>D20</i>	T5p145	pb8	32,8	Major head protein
	T5p146	pb11	15,8	Head protease
<i>N5</i>	T5p147	pb10	17,3	Decoration
	T5p148	pb7	43,8	Portal

Стенка капсида состоит из основного белка головки (белок оболочки) pb8, который образует 11 пентамеров в вершинах икосаэдра (за исключением порталной) и 120 гексамеров на поверхности граней. Головка декорирована белком pb10 (17,3 kDa), мономеры которого связываются в центре гексамеров. 12-ю вершину занимает додекамер порталного протеина pb7 (Huet *et al.* 2010).

В процессе морфогенеза капсида фага T5 сначала собирается проголовка I (prohead I). Эта структура формируется из субъединиц белка предшественника главного белка головки pb8, которые имеют на N-конце 159 остатков поддерживающего (scaffolding) домена, также называемого дельта-доменом, который обеспечивает сборку капсида правильного размера. После сборки проголовки происходит процессинг основного белка капсида головочной протеазой pb11 (15,8 kDa), при котором дельта-домен удаляется. Зрелый белок pb8 имеет массу 32 kDa. В результате процессинга формируется проголовка II (prohead II). Упаковка ДНК в проголовку II

инициирует расширение капсида, которое происходит за счет конформационных изменений субъединиц стенки капсида и способа их взаимодействия с соседними молекулами. Расширение сопровождается увеличением диаметра капсида примерно в 1.4 раза и, соответственно, объема в 2 раза, что позволяет поместить в капсид весь геном (Zivanovic et al. 2014). Созревший капсид декорируется 17.3-kDa белком pb10, который связывается в виде мономера с центрами гексомеров (Рис. 5b) (Effantin et al. 2006). Одиночный головной белок завершающий сборку головки (p144 19,3 kDa) закрывает капсид фага T5, связывание его с капсидом происходит после упаковки ДНК (Zivanovic et al. 2014).

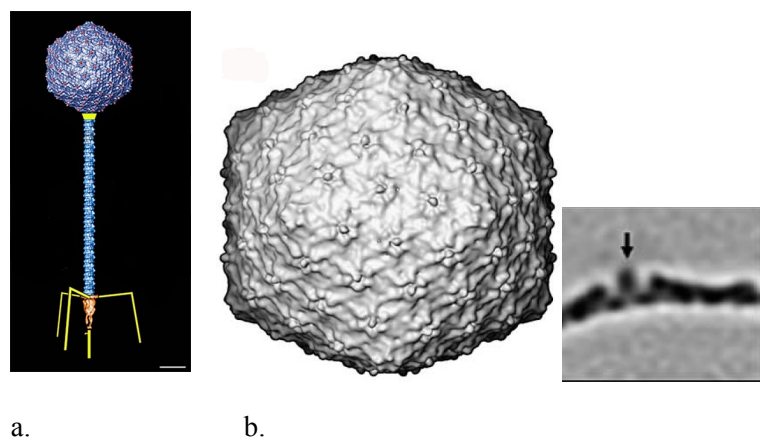


Рис. 5. Визуализация поверхности капсида (синий) бактериофага T5 с выступающим мономерным белком pb10 (красный), реконструкция хвоста и tip (верхушка), а также элементов соединения и хвостовых фибрилл (a); b. локализация декорирующего белка pb10 (цит. по Effantin et al. 2006).

Белки упаковки ДНК фага T5

АТФ-зависимая упаковка двухцепочечной молекулы ДНК бактериофага внутрь вирусного капсида осуществляется терминазой (ORFs T5p151 и T5p152) через канал порталного белка (pb7). Терминаза связывается с конкатемерами ДНК и вносит иницирующий разрыв. В случае фага T5 (и родственных ему вирусов) этот разрыв вносится сайт-специфически, что приводит к точно определенному положению левого (условно) конца генома (Boulanger et al. 2008). После этого происходит

связывание с проголовкой и АТФ зависимый транспорт ДНК в капсид. По заполнении капсида (который в процессе упаковки подвергается расширению) вносится терминирующий разрыв что формирует зрелую вирусную ДНК (Ponchon *et al.* 2006). У фагов группы T5 терминирующий разрыв также вносится в строго определенном месте, поэтому положение условного правого конца генома тоже является строго определенным.

Терминаза фага представляет собой гетеромультимерный комплекс, состоящий из двух субъединиц. Малая регуляторная субъединица (TerS) (ORF T5p152) связывает вирусную ДНК, а большая каталитическая субъединица (TerL) (ORF T5p151) несет в себе две энзиматических активности: разрезание ДНК и АТФазную активность необходимую для упаковки ДНК (Morita *et al.* 1995, Zivanovic *et al.* 2014). Такая организация терминазы, является типичной для хвостовых фагов и герпес вирусов (Przech *et al.* 2003).

Геном T5 фага представляет собой линейную двунитевую ДНК (121,750 bp), которая содержит большие концевые повторы (~10,000 bp), составляющие около 9% от общей длины вирусной ДНК. Такая организация возникает вследствие того, что емкость капсида фага T5 несколько превышает длину уникальной последовательности генома. По-видимому, такая стратегия упаковки, при которой образуется значительная концевая избыточность без формирования кольцевых перестановок, приводит к тому, что около половины вирусной ДНК, синтезируемой в инфицированной клетке теряется, однако точных экспериментальных данных об этом нет. Необычной особенностью вирионной ДНК T5 фага являются одонитевые сайт-специфические разрывы (nicks), которые могут быть устранены ДНК лигазой (Everett 1981). Происхождение и роль этих разрывов до сих пор неизвестны, хотя найдены 4 эндонуклеазы, способные образовывать подобные разрывы (Wang 2006).

Структура хвоста бактериофага T5

T5 подобные бактериофаги имеют длинный несократимый хвост с одной осевой (центральной) хвостовой фибриллой и тремя боковыми хвостовыми фибриллами, также известными как L-shaped tail fibers (LTF) (Effantin et al. 2006). В обзоре Y. Zivanovic с соавторами (Zivanovic et al. 2014) была описана локализация и функции 11 хвостовых белков (Табл. 2; Рис. 5).

Tail Termination protein (TrP) (T5p142; 18.4 kDa) расположен на проксимальном конце хвоста, а именно, связывается с порталной вершиной капсида (Рис.5). Несмотря на то, что длина хвоста определяется Tail Measure Protein (TMP – pb2), наличие TrP на вершине хвоста предотвращает возобновление полимеризации белка трубки хвоста и формирует интерфейс для присоединения хвоста к головке. Фаг, несущий нонсенс-мутацию в гене TrP не способен к сборке жизнеспособной фаговой частицы (Zivanovic et al. 2014). Так как всем фагам с длинным хвостом необходимо избежать неконтролируемой полимеризации хвостовой трубки и соединить хвостовую трубку с капсидом, гомологи белка TrP обнаруживаются у всех таких вирусов (Davidson et al. 2012).

Tail completion protein (TCP) (T5p143; 27.8kDa) предположительно располагается рядом с TrP. Сходство T5p143 с другими фаговыми хвостовыми белками не было найдено. Однако, ген расположен между капсидным модулем и геном белка трубки хвоста pb6 (tail tube protein; TTP), поэтому возможно, что по структуре T5p143 гомологичен высоко консервативному семейству TCPs, прототипом которого является белок фага λ gpZ. Генетические и биохимические данные показали, что белок gpZ и близко родственные ему белки миофагов P2 и Mu важны для эффективного заражения клетки (Zivanovic et al. 2014). При отсутствии gpZ фаговых частицы λ могут быть сформированы, но у них не наблюдается проникновения ДНК в начало канала хвоста после объединения хвоста и головки и эффективность заражения клеток сильно снижена по сравнению с диким типом (Thomas et al. 1978). Упомянутое проникновение конца

фаговой геномной ДНК в начало канала хвоста наблюдается в зрелых частицах трех разных сифовирусов (SPP1 of *B. subtilis*, T5 of *E. coli* и A118 of *Listeria monocytogenes*), поэтому можно предположить, что последним шагом в морфогенезе большинства фагов с длинным хвостом, является образование канала в месте соединения голова-хвост, что позволяет геному занять его окончательную позицию внутри хвоста. Таким образом, геном находится в состоянии готовности для инъекции сразу после взаимодействия с хозяйской клеткой. Возможно, ТСР способствует этому процессу (Davidson et al. 2012).

Белки хвостовой трубки

Трубка хвоста фага Т5 состоит из сложенных в стопку тримерных колец белка ТТР. Таким образом у Т5 хвост имеет необычную симметрию третьего порядка, в то время как у большинства других *Siphoviridae* симметрия 6-го порядка (Zivanovic et al. 2014). Установление рентгеновской структуры белка ТТР (Fraga et al. 2017) обнаружило, что в этом белке имеется дубликация домена, образующего стенку трубки, что приводит к тому, что тримерные кольца ТТЗ являются на самом деле псевдо-гексамерными. Последовательность pb6 (464 остатка) включает в себя также С-концевой IgG подобный домен типа Big2, экспонированный в окружающую среду (Fraga et al. 2017). Подобный домен присутствует в ТТР gpV фага λ , как и у фага Т5, этот домен не участвует в полимеризации субъединиц ТТР и в формировании хвостовой трубки.

Т5p140 белок (молекулярная масса 34,5 kDa) минорный хвостовой компонент, присутствующий у всех Т5 - подобных фагов. Предполагают, что Т5p140 белок является маркером оперона хвостовой трубки Т5 - подобных бактериофагов.

The Tape Measure Protein (TMP) белок рулетка pb2 (121 kDa) pb2 получил такое название, в связи с тем, что он контролирует длину фагового хвоста. Pb2 составляет 1,5 % от общей массы всех структурных белков Т5 фага. Этот белок представлен 5-6 копиями на частицу (Mccorquodale and

Warner 1988). В структуре pb2 было предсказано 3 домена. Регион I организован в суперспираль и является основной составляющей Tail Measure Protein (TMP). Регион II содержит два потенциальных α -спиральных трансмембранных сегмента. Регион III содержит металлопептидазный мотив. TMP является компонентом комплекса на котором инициируется полимеризация ТТР (Boulanger et al. 2008).

Boulanger et al (Boulanger et al. 2008) предполагает, что связывание фага T5 с рецептором хозяина (FhuA) приводит к большим конформационным изменениям белка pb2. Регион I белка pb2 служит сенсором (датчиком) для инициации открытия места соединения голова-хвост. С-концевой регион обеспечивает проникновение через оболочку клетки - хозяина, вызывая локальную деградацию пептидогликана и формируя для ДНК пору, вероятно, путем слияния внешней и внутренней мембран бактерии.

Компоненты базальной структуры хвоста (Tail tip components; TTC)

Третий оперон хвоста кодирует белки pb9, pb3, pb4 и недавно идентифицированный белок T5p132 (15 kDa), а также LTF белок pb1. Эти белки относятся к комплексу кончика хвоста, который инициирует сборку хвоста (Davidson et al. 2012).

Белок pb1 образует три LTF (L-shaped fibers), которые связываются с O-антигенными доменами липополисахаридов (LPS) *E. coli* (Heller and Braun 1982). Эти фибриллы прикрепляются к тонкому воротничку верхнего конца конической базальной структуры на границе между ТТР (pb6) и дистальным хвостовым белком (pb9) (Flayhan et al. 2014). При негативном окрашивании фаговых частиц, капсиды накапливают тяжёлые атомы, которые сильно окрашивают их, делая неясными детали их хвостов (Рис. 6). Поэтому в работе Garcia-Doval et al. (Garcia-Doval et al. 2013) проводили электронную микроскопию только хвостов (Рис. 7а). На хвостах было видно два типа волокон: одну прямую хвостовую фибриллу (на рисунке 7а отмечены стрелочками) и три LTF (на рисунке 7а отмечены звёздочками). Каждая LTF состоит из тонкой проксимальной части (около 30×3 нм), связанной с более

толстой периферической (около 47×5 нм) (на рисунке 7а обведена в прямоугольник). Проксимальная часть имеет довольно гладкую поверхность в отличие от дистальной, которая имеет форму бус из чего можно сделать предположение о наличии нескольких различных структурных доменов (Рис. 7b). В 2013 году Garcia-Doval et al. 2013 (Garcia-Doval et al. 2013) была получена трехмерная модель LTF фага T5, которая состоит из 8 доменов (D1-D8 Рис. 7b). При этом белковая последовательность первых 205 остатков (D1) содержат главным образом аминокислоты с небольшим радикалом (Ala, Ser и Thr) и кислые/основные (Gln, Glu и Lys) аминокислоты.

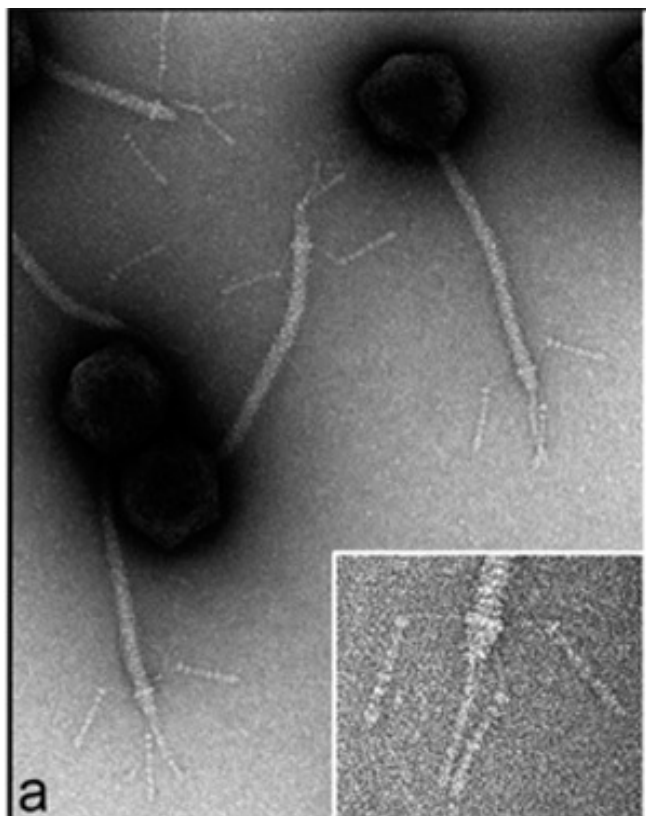


Рис. 6. Электронная микроскопия с негативным окрашиванием фаговых частиц T5 (цит. по Zivanovic et al. 2014).

Предположительно этот участок может образовывать трехспиральную структуру *coiled coil* и быть ответственным за формирование проксимального тонкого участка LTF. В этом случае остатки 206-1263 будут формировать дистальную часть LTF (Garcia-Doval et al. 2013). Модель дистального участка, полученная при электронной микроскопии,

ясно показывает структуру бус, содержащую 7 доменов, из которых D2, D3, D6 и D8 являются самыми широкими. Всего ген 143 (Pb1) кодирует полипептид из 1396 а.к., из которых 132 или 133 С-концевые аминокислоты (остатки 1264-1396) функционируют как внутримолекулярный шаперон и отщепляется в результате автопротеолитической реакции при созревании белка (Schulz *et al.* 2010).

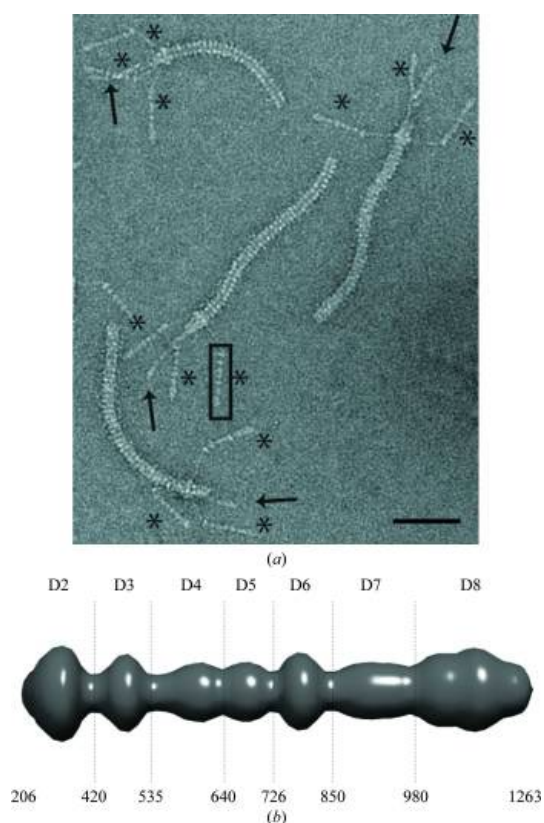


Рис. 7. Электронная микроскопия хвостов бактериофага T5. (a) Фотография сделанная с помощью электронной микроскопии с негативным окрашиванием. Стрелками указаны центральные осевые фибриллы (CFP; в состав которых входит белок pb5), звездочками обозначены боковые хвостовые фибриллы (LTF; состоящие из белка pb1); (b) Трёхмерная модель домена дистальной части LTF. Указаны номера доменов и их предлагаемые пограничные остатки; D1 соответствует проксимального области (не указана) (цит. по Garcia-Doval *et al.* 2013).

Baseplate hub protein (BHP) (pb3) занимает центральную область ТТС (Veesler *et al.* 2010) и расположен между дистальным хвостовым белком (DTP; pb9) и центральной хвостовой фибриллой (CFP; pb4) (Рис.8). Есть предположение, что pb3 формирует ворота на конце трубки хвоста, которые открываются, чтобы произошло впрыскивание ДНК в ответ на взаимодействие фага T5 с его клеточным рецептором (Zivanovic *et al.* 2014).

Дистальный хвостовой белок DTP (*Dit*) (*pb9*) состоящий из двух доменов, один из которых формирует открытое гексамерное кольцо, расположенное на конце хвостовой трубки. Предполагается, что второй галектин-подобный домен обладает способностью связываться с сахарами у бактериофага *Bacillus subtilis* SPP1 и служит платформой для прикрепления RBPс у других сифовирусов (Flayhan et al. 2014).

С помощью иммулокализации было показано, что *pb9* находится в верхней части конической структуры кончика хвоста, чуть ниже точки прикрепления LTF (Рис. 8). *Dit* белки являются центром сборки адсорбционного аппарата бактериофагов, обладающих длинными хвостами (Flayhan et al. 2014).

Центральная осевая фибрилла (CFP) (*pb4*) – это белок, с которого начинается сборка хвоста (Davidson et al. 2012). На конце белка *pb4* расположен мономерный белок рецептор-узнающий белок *pb5* (Рис. 8).

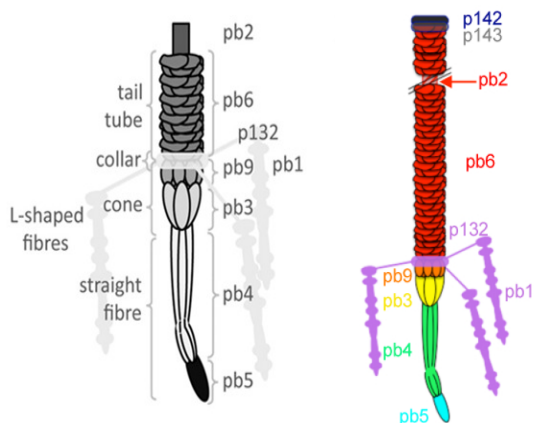


Рис. 8. Схематическое изображение хвоста бактериофага T5 (цит. по Flayhan et al. 2014).

Рецептор связывающий белок (RBP) (*Pb5*)

Pb5 (ген *oad* для фага T5 и *hrs* для BF23) – это главный рецептор связывающий белок (RBP) фага T5, взаимодействующий с его конечным рецептором (для T5 FhuA, а для BF23 VtuB) расположенным на внешней мембране *E. coli*. В работе Zivanovic et al. (Zivanovic et al. 2014) было показано с помощью перекрёстного связывания с IgG меченным коллоидным золотом, что рецептор-связывающий белок *pb5* расположен на конце центральной хвостовой фибриллы (рис. 9 А, В). Очищенный *pb5*

представляет собой мономер, который образует *in vitro* высокостабильный 1/1 стехиометрический комплекс с его рецептором FhuA (Zivanovic et al. 2014). По данным полученным с помощью электронной микроскопии (ЭМ), анализа единичных частиц и малоуглового рассеяния нейтронов очищенный мономер pb5 в боковой проекции представляет собой вытянутую молекулу длиной 7 нм и шириной 5 нм (рис. 9 F). Эти размеры и форма идеально вписываются в объем конечной части осевой фибриллы, данные результаты говорят в пользу того, что фаг T5 на конце хвоста имеет единственную копию pb5. Полученные результаты убедительно свидетельствуют о том, что комплекс pb5-FhuA образованный *in vitro* соответствует физиологическому связыванию фага T5 с его конечным рецептором. Положение pb5 полностью согласуется с его функцией RBP и противоречит предыдущей локализации pb5 у основания конуса концевой части хвоста (Vöhm *et al.* 2001) (Рис. 10).

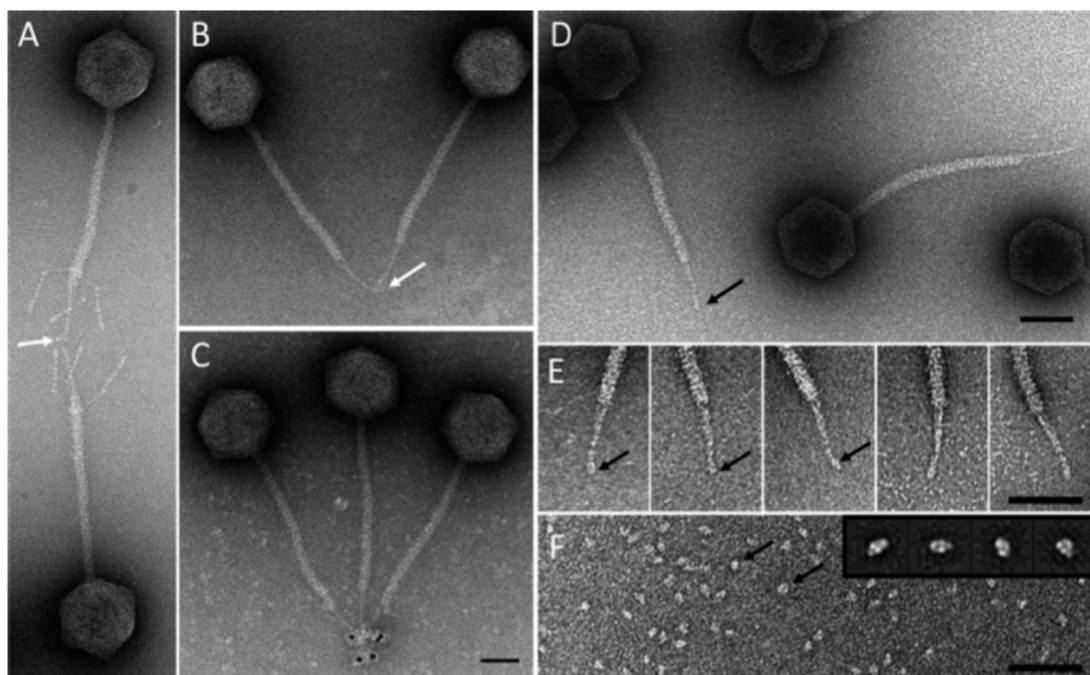


Рис. 9. Локализация pb5 в концевой части хвоста. Иммулокализация pb5 при перекрёстном связывании с IgG (белые стрелки) для фагов T5st0 (A) и T5hd1 (B) или визуализация конъюгата антител с коллоидным золотом для T5hd1 (C). Панель E демонстрирует концевые части хвостов фото с высоким разрешением для фага T5hd1 (D). Панель F демонстрирует очищенные белки pb5 (черные стрелки). Линейка 50 нм. T5st0 термостабильный делетационный мутант (номер доступа GenBank AY692264) и T5hd1 мутант не имеющий боковых хвостовых фибрилл (цит. по Zivanovic et al. 2014).

Таким образом, вероятнее всего, в базальную структуру хвоста T5-подобных фагов входят лишь 4 белка (pb9/pb3/pb4/pb5).

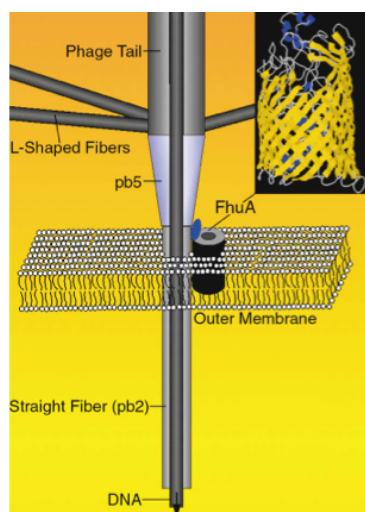


Рис. 10. Неправильные представления о расположении белка pb5 у фагов T5 (цит. по Böhm et al. 2001).

Табл. 2. Структурные белки хвоста бактериофага T5.

Gene	ORF	Название белка	Mr (kDa)	Функция белка
<i>lrf</i>	T5p131	pb1	148,0	L-shaped fibers
	T5p132	p132	15,0	L-fibers/tail tip collar
<i>D17</i>	T5p133	pb4	74,9	Central straight fiber
<i>D16</i>	T5p134	pb3	107,3	Baseplate hub protein
	T5p135	pb9	22,7	Distal tail protein
<i>D18/19</i>	T5p136	pb2	121,9	Tape measure protein
	T5p140	p140	34,5	
<i>N4</i>	T5p141	pb6	50,3	Tail tube protein
	T5p142	p142	18,4	Tail terminator
	T5p143	p143	27,8	Tail completion
<i>oad</i>	T5p153	pb5	67,8	Receptor binding protein

4.2 Механизм адсорбции фага T5

Довольно часто, взаимодействие фага с поверхностью клетки может происходить в две фазы: обратимую и необратимую адсорбцию (Vinga *et al.* 2006). Обратимая адсорбция обеспечивает первичное распознавание клетки. На этой стадии возможна диссоциация фаговой частицы с поверхности клетки, при этом жизнеспособность вирусной частицы сохраняется. В роле первичных клеточных рецепторов обычно выступают наиболее представленные молекулы клеточной поверхности – липополисахариды (ЛПС) внешней мембраны грамотрицательных бактерий, пептидогликан и тейхоевые кислоты грамположительных бактерий, или капсульные полисахариды тех и других (Rakhuba *et al.* 2010, Samson *et al.* 2013).

При инфицировании фагом T5 O-антиген продуцирующих клеток (*E. coli* F) первый контакт происходит между латеральными хвостовыми фибрилами pb1 (Ltf) фага с O-полисахаридом. Данный контакт является обратимым (Plancon *et al.* 2002). Обратимо связанные фаги диссоциировать от поверхности клетки сохраняя свою биологическую активность (Vinga *et al.* 2006). Данное взаимодействие не является обязательным для инфекции, однако оно увеличивает скорость адсорбции (Garcia-Doval *et al.* 2013). Ltf бактериофага T5 взаимодействуют с полиманнозой области O-антигенов O8 (триманноза) или O9 бактериальных липополисахаридов (Рис. 11 структура OAg). Известно, что гептоза, галактоза и глюкоза являются компонентами кор-олигосахарида LPS *E. coli*, в то время как манноза найдена исключительно в цепях O-антигена (Orskov *et al.* 1977). Взаимодействие хвостовой фибриллы с OAg *E. coli* ускоряет адсорбцию T5 и удерживает фага на поверхности хозяина. Так как первичная адсорбция обратима, фаг может двигаться вдоль клеточной поверхности в поисках конечного рецептора. Эффективное связывание происходит в том случае, когда более чем одна из трёх хвостовых фибрилл соединяется с OAg одновременно (Heller and Braun 1982). Многие бактериофаги при росте на

лабораторных штаммах не имеющих ОАГ теряют данные структуры (pb1 (LTF)) в результате фреймшифт-мутаций (Hendrix and Duda 1992).

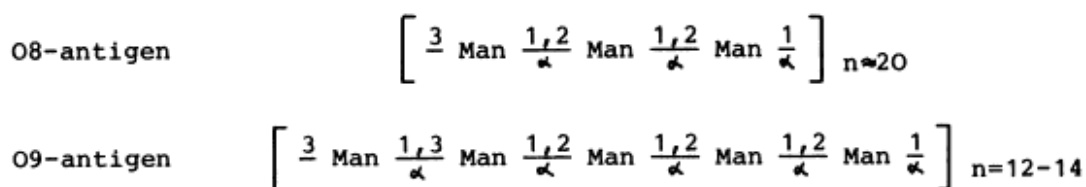


Рис. 11. Структура О-антигенов *E. coli* O8 и O9 ЛПС (цит. по Heller and Braun 1982). Структура O8 ЛПС была получена Reske и Jann (Jann *et al.* 1975), а для O9 – Prehm *et al.* (Prehm *et al.* 1976).

Переход к необратимой адсорбции обычно требует дополнительного связывания фагового белка с тем или иным вторичным рецептором, для чего могут использоваться те же самые или иные RBP, чем послужившие для обратимого связывания. После распознавания вторичного рецептора происходят перестройки структуры вириона, ведущие в конечном итоге к инфицированию клетки. В случае фага T5 на второй стадии вирион присоединяется необратимо с помощью белка pb5 (RBP) (кодирующий ген для T5 – *oad*, а для BF23 - *hrs*) к специфическим поверхностным клеточным рецепторам и больше не может диссоциировать. Бактериофаг T5 использует в качестве рецептора клеточный транспортёр сидерофоров FhuA (Рис.12), тогда как BF23 – BtuB посредством, которого осуществляется транспорт витамина B₁₂ (Braun 1995, Heller 1984). Белок FhuA массой 78,9 кДа (Coulton *et al.* 1986), принадлежит к семейству транспортёров наружной мембраны *Escherichia coli*. Около 10³ копий этого белка на бактерию катализируют высоко аффинный транспорт феррихрома через внешнюю мембрану (Boulangier *et al.* 1996). Этот белок имеет два домена: β-бочка, состоящая из 22 скрученных (переплетённых) антипараллельных β-слоёв, и N-концевой глобулярный домен - «пробка» (Ferguson *et al.* 1998). Пробка состоит из четырёх переплетённых β-слоёв и четырёх коротких α-спиралей, находится внутри β-бочки и блокирует канал (Рис.12).

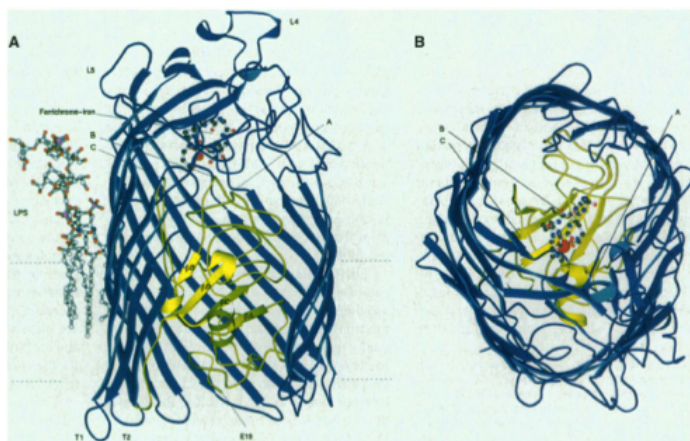


Рис. 12. Комплекс FhuA – феррихром-железо и одна молекула ЛПС нековалентно связанная с его поверхностью внедрённой в мембрану. β -бочка окрашена в синий цвет; остатки от 621 – 723 удалены, чтобы можно было видеть домен пробки, который обозначен жёлтым цветом. Молекулы ЛПС и комплекс феррихрома с железом представлены в виде шаростержневых моделей с атомами железа, которые обозначены как большие красные сферы. Маленькие красные сферы это атомы кислорода, маленькие белые сферы – атомы углерода в молекуле ЛПС, маленькие синие сферы атомы азота, маленькие розовые сферы атомы фосфора, и маленькие черные сферы углерода в молекуле феррихром - железа (цит. по Ferguson et al. 1998).

Внешние петли являются участками для связывания естественного субстрата феррихрома и других лигандов FhuA (фаги, T1, F80, N15, НК02, бактериальные токсины Colicin M и Microcin J25, и антибиотик albomycin) (Endriss and Braun 2004).

Boulanger et al. 1996 было показано, что выход фаговой ДНК может быть вызван *in vitro* во внешнюю среду взаимодействием вируса с очищенным FhuA или в липосомы, содержащие FhuA (Böhm et al. 2001, Labrie and Moineau 2007) (Рис. 13). Кроме того, взаимодействие между очищенным pb5 и FhuA приводит к образованию очень стабильного стехиометрического комплекса, который не разрушается в присутствии 2% SDS, если не нагреть до 70 °C (Plancon et al. 2002). Flayhan et al. (Flayhan et al. 2012) было показано, что RBP взаимодействует не только с петлями “пробки” (Boulanger et al. 1996, Killmann et al. 1995), но и с петлями “бочки”.

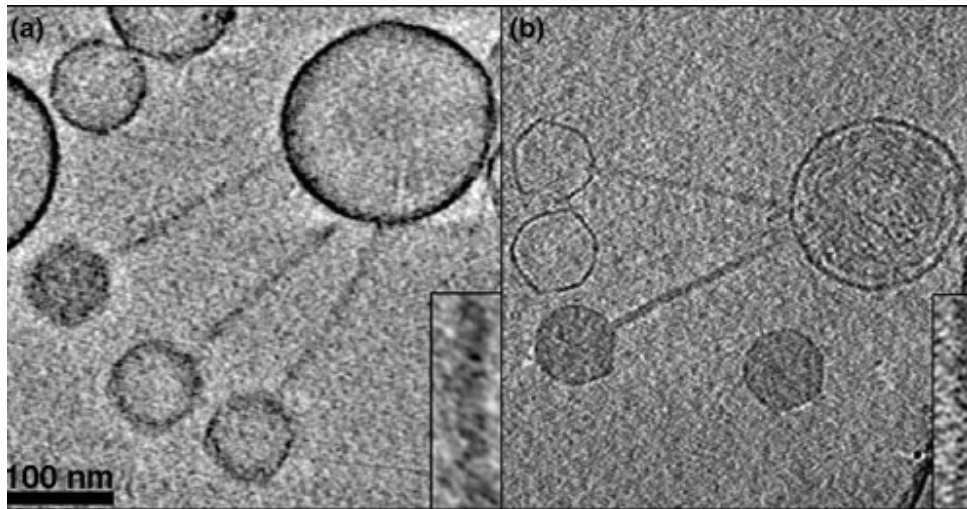


Рис. 13. Трехмерная визуализация модели фаг-протеолипосома с помощью криоэлектронной томографии. T5-фаги прикрепленные к FhuA-содержащим протеолипосомам, таким образом имитируя вирусную инфекцию. Когда фаги T5 были смешаны с FhuA-содержащими протеолипосомами, они связывались, как и ожидалось, с поверхностями везикул дистальными концами их хвостов. Оба изображения показывают три фага T5, связанных с однослойной липидной везикулой диаметром около 250 нм. В каждом случае один из капсидов полон ДНК и выглядит как темно-серый материал, а два других пустые и, следовательно, показывают более низкую плотность электронов. Фаги с пустыми капсидами всегда были связаны с протеолипосомами, содержащими темно-серый материал, что указывает на то, что ДНК фага T5 переносится в FhuA-содержащие липосомы (цит. по Böhm et al. 2001).

Так же было показано, что белок FhuA очень стабилен и при взаимодействии с pb5 конформационные изменения происходят в основном в белке pb5. Однако, до сих пор не известно, какие конформационные изменения фагового хвоста приведёт к транспорту ДНК (Flayhan et al. 2012).

T5-подобные фаги кодируют белок Llp, он синтезируется в начале инфекции тем самым, предотвращая суперинфекцию. Белок Llp включается во внешнюю мембрану в виде липопротеина и блокирует рецептор FhuA (BtuB), исключая адсорбцию новых фаговых частиц (Braun, Killmann, and Benz 1994). Этот белок также защищает вновь синтезированные вирионы фага T5 от инактивации путём связывания свободных рецепторов, которые высвобождаются из лизированных клеток (Labrie and Moineau 2007). Ген *llp* кодирующий липопротеин расположен выше по течению гена *hrs* (*oad*), но транскрибируется в обратном направлении. Сходства нуклеотидной

последовательности областей ДНК фагов BF23 и T5, кодирующих Lp и RBP найдено не было, однако фланкирующие области имеет высокую гомологию (Mondigler *et al.* 2006). Отсутствие гомологии ДНК между областями *hrs/llp*_{BF23} и *oad/llp*_{T5} биологически осмысленно. Это препятствует отделению *llp* генов от соответствующих генов *hrs* и *oad* специфичных для разных рецепторов. По-видимому, эти гены образуют рецептор блокирующий/рецептор связывающий модуль, так как продукты этих генов связываются с тем же белковым рецептором на внешней мембране. Однако, предполагают, что связывание происходит с разных сторон: Lp со стороны переплазматического пространства (Braun, Killmann, and Herrmann 1994), а pb5 с внешней стороны. У фагов T5 и BF23 гомологичная рекомбинация происходит легко (Heller 1984), сходство последовательности ДНК в этой области способствовало бы отделению гена *llp* от своего гена-“партнёра” *hrs* или *oad*. Это равноценно инактивации *llp*. Такая инактивация приведёт к ухудшению приспособленности соответствующего фага и инфицированию хозяйских клеток (Mondigler *et al.* 2006).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 5. Материалы и методы исследования

Отбор образцов

Образцы фекалий собирали в июне 2006 г. от 4 лошадей (одна кобыла и три мерина от 7 до 11 лет) каждые 2 дня в течении 18 дней. Полученные образцы были гомогенизированы, и две усреднённые аликвоты из полученных экстрактов были взяты для подсчёта бактериофагов и энтеробактерий (Golomidova *et al.* 2007).

Выделение бактериофагов и колиформных бактерий

Для выделения и подсчёта бактериофагов 20 г фекалий ресуспендировали в 80 мл фагового буфера (0,2 М NaCl, 0,1 г азида натрия, 1 г Tween 20 и воды до общего объёма 1 литр). Суспензию встряхивали в орбитальном шейкере в течение 1 ч при 120 об/мин при комнатной температуре, разделяли на аликвоты и центрифугировали в течение 2 мин при 12000 об/мин в микроцентрифуге и использовали для посева бактериофагов двуслойным методом (по Грациа) напрямую, либо в соответствующем разведении (Sambrook *et al.* 1989).

Для подсчёта колониеобразующих единиц (КОЕ) фекалии суспензировали в 0,9% растворе NaCl, встряхивали на шейкере в течении 20 мин при комнатной температуре и высевали в различных разведениях на чашки Петри со средой Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) или LTA (Триптоза 20 г, лактоза 5 г, NaCl 5 г, K₂HPO₄ 2,75 г, KH₂PO₄ 2,75 г, содиум лаурил сульфат 0,1 г, агар 15 г и воды до общего объёма 1 литр).

К 5 мл экстрактов фекалий, содержащих бактериофаги добавляли глицерин до концентрации 15% (vol/vol) и сохраняли при -70° С.

Дополнительные 50 г фекалий хранили при -70° С для последующего анализа и для выделения дополнительных наборов индигенных колиформных штаммов (ICS), когда они были необходимы.

Фаговые и бактериальные штаммы и их культивирование

Бактериофаг BF23 любезно предоставил Владимир Ксёнзенко, ИБМП, Пущино, Россия. Бактериофаги DT57C, DT57-1/2 и DT530 были выделены из фекалий лошадей (Golomidova et al. 2007) с использованием в качестве хозяина *E. coli* C600 в 2006 г. Эти фаги были сохранены в нашей лабораторной коллекции.

В качестве контрольных тест-культур использовали следующие штаммы *E. coli* (Fermentas, Lithuania): K-12 C600, DH5 α , NM522 (F'), BL21 (DE3), JM109, а также JM109 (DE3) и Ve/1 (любезно предоставлены В. В. Месянжиновым, ИБХ РАН, Москва, Россия).

Выделенные изоляты *E. coli* 4S, HS1/2 и HS3-104 были выделены из фекалий, полученных из той же группы лошадей, которые служили источником вышеупомянутых фагов.

Штамм *E. coli* 4S продуцирует ЛПС, который аналогичен ЛПС типа O22, но имеет дополнительное глюкозилирование боковой цепи (Knirel et al. 2015). Мутанты штамма *E. coli* 4S, 4SI и 4SR были выбраны ранее как варианты, устойчивые к бактериофагу G7C (Knirel et al. 2015, Kulikov et al. 2012). Идентификация этих штаммов на уровне видов была подтверждена MALDI-TOF профилированием экстрактов целых клеток с использованием прибора Biotyper (Bruker-Daltonics, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Мутантные штаммы, дериваты 4S были получены в нашей лаборатории путем селекции на устойчивость к фагу G7C (Knirel et al. 2015). *E. coli* 4SI продуцирует O-антиген, лишённый O-ацетилирования звеньев из-за внедрения мобильного элемента в ген *wclK*, в то время как 4SR не продуцирует O-антиген из-за нарушения синтетического пути также посредством введения мобильного элемента (Knirel et al. 2015).

E. coli HS1/2 штамм продуцирует ЛПС типа O87, структура которого определена (Zdrovenko et al. 2015). А *E. coli* HS3-104 штамм продуцирует ЛПС типа O81, структура которого определена (Zdrovenko et al. 2018).

Мутанты используемых фагов были получены в ходе этой работы. Их генотипы и хозяйский спектр приведены в таблице 4.

Для культивирования для культивирования всех штаммов *E. coli*, использовали стандартную среду Luria-Bertani (LB) (Триптон 10 г, дрожжевой экстракт 5 г, NaCl 10 г и воды до общего объёма 1 литр). Для чашек использовали агаризованную среду LB (концентрация агара 1,5%), в качестве верхнего слоя при титровании фагов использовали ту же среду с 0,6% агаром.

Для наращивания фагов в жидкой культуре 6 мл бульона LB инокулировали одной колонией со свежей чашки или как альтернативный вариант 1% (по объёму) ночной культуры соответствующего штамма и растили до середины логарифмической фазы (оптическая плотность при 600 нм от 0,5 до 0,6) при 37°C при интенсивном перемешивании. Культуру инокулировали добавлением единичной бляшки и выращивали до тех пор, пока не были видны признаки лизиса (время инкубации варьировалось для разных изолятов фага). Затем добавляли 0,5% объёма хлороформа, энергично встряхивали на вортексе и через 1 ч лизаты центрифугировали при 10000 × g в течение 10 мин для удаления бактериального дебриса.

Определение хозяйского спектра бактериофагов

Чтобы определить способность фагов расти на определённых штаммах хозяина, по 5 мкл серийных разведений от 10^0 до 10^8 концентрированного фагового лизата наносили на чашку Петри с двуслойным агаром, инокулированным соответствующим индикаторным штаммом. Затем чашки инкубировали при 37°C в течение ночи. Результаты были зарегистрированы следующим образом: (-) отсутствие роста фагов; (+) зона ингибирования роста, образующаяся при низком разведении, с единичными бляшками и видимыми пятнами при более высокого разведения, предполагаемая эффективность бляшкообразования оценивалась в пределах 1 порядка по сравнению с контрольной чашкой содержащей газон *E. coli* C600; (I) зона

ингибирования роста видна при более низком разведении, однако она исчезла при более высоких разведениях без образования видимых бляшек.

Экстракция ДНК и анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

Индивидуальные лизаты фага, полученные из одной бляшки в среде LB, обрабатывали ДНКазой (0,01 мг/мл в течение 1 часа при температуре 37°C), осветляли центрифугированием при 9000 об/мин в течение 15 минут, затем осаждали ультрацентрифугированием (90 000g в течение 1 часа) в бакетном роторе. Осадок фаговых частиц тщательно ресуспендировали в буфере SM (50 mM Tris HCl [pH 7,6], 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) и использовали для экстракции фенолом фаговой ДНК, как описано в руководстве (Sambrook et al. 1989). Выделенную фаговую ДНК расщепляли рестрикционными ферментами (Ферментас, Литва) EcoRV, EcoRV-HindIII и DraI в соответствии с рекомендациями производителя и разделяли в 1% или 1,5% Трис-ацетат-ЭДТА агарозном геле, содержащем бромид этидия (Sambrook et al. 1989).

Идентификация бактериофагов

Для определения бактериофагов фрагменты, полученные в результате рестрикции ферментами, образующими тупые концы (EcoRV, HaeIII или DraI) переосаждали этанолом и получали случайные клоны с помощью набора для клонирования ПЦР фрагментов T-система (Promega, США). Процедура клонирования была выполнена, как рекомендовано производителем. Несколько клонов для каждого фага были секвенированы со стандартного праймера M13F (Ферментас, Литва). Полученные последовательности сравнивали с международной базой данных GenBank при помощи программы BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Полученные результаты сопоставляли с данными электронной микроскопии. Для быстрой идентификации T5-подобных фагов использовали ПЦР с праймерами T5-hdD и T5-hdR (Табл. ПЗ, см. Приложение).

Секвенирование ДНК

Все нуклеотидные последовательности были определены на автоматическом секвенаторе (Avant 3150; Applied Biosystems) со стандартными реактивами.

Секвенирование полных геномных последовательностей было выполнено в геномном центре ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, с использованием секвенатора Ion Torrent в соответствии с рекомендациями производителя. Сборку геномов осуществляли с помощью программ Newbler или SPADES. Положение и природа физических концов геномов фагов DT57C и DT571/2 были определены В. Ксендзенко (ИБФМ, Пущино), для близкородственных фагов, имевших идентичные последовательности терминаз, положение концов выставляли по консервативным последовательностям, аналогичным DT57C без экспериментального определения.

Электронная микроскопия

Каплю фагового лизата наносили на медную сетку, покрытую слоем полимера (формвар 0,3%) и аморфного углерода. Сетки окрашивали 1% уранилацетатом и исследованы с помощью электронного микроскопа Jeol 100S (Japan). Криоэлектронная микроскопия была осуществлена Dr. R. Riccio в EPFL, Лозанна, Швейцария.

Выделение и анализ ЛПС

ЛПС выделяли из ночных культур *E. coli* методом горячей фенольной экстракции с предварительной обработкой клеточного лизата ДНКазой I и РНКазой А и затем протеиназой К (Sigma-Aldrich) (Jann *et al.* 1965, Knirel *et al.* 2015). Чистоту и различия профилей образцов ЛПС оценивали электрофорезом в 12% ПААГ в денатурирующих условиях с окраской геля серебром с помощью Pierce Silver Stain Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с рекомендациями производителя. Для последующего ЯМР анализа О-ПС образцы очищенных ЛПС подвергали кислотному гидролизу 2% уксусной кислотой при 100°C в течение 3 ч. Липид А отделяли

центрифугированием при 40000 g, а О-ПС разделяли гель-фильтрацией на смоле Sephadex G-50 Superfine (GE Healthcare), уравновешенной 50 мМ пиридин-ацетатным буфером pH 4.5, наблюдая пики О-ПС с помощью дифференциального рефрактометра.

ЯМР анализ О-полисахаридов

Структуры О-полисахаридов были определены в лаборатории химии углеводов Института органической химии им. Н.Д. Зелинского.

Препараты О-ПС, предназначенные для ЯМР анализа, дважды лиофилизировали из 99.9% D₂O и растворяли в 99.95% D₂O. ЯМР спектры были записаны при 20°C на спектрометре Bruker Avance II 600-MHz (Bruker, Биллерика, Массачусетс). В качестве стандартов использовали натрий-3-триметилсилилпропионат-2,2,3,3-d₄ (δ H 0) и ацетон (δ C 31,45). Двумерная ¹H-¹H корреляционная спектроскопия (COSY), полная корреляционная спектроскопия (TOCSY), ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера (ROESY), ¹H-¹³C гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия (HSQC), HSQC-TOCSY и гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия (HMBC) были проведены и полученные данные проанализированы с помощью программы Bruker TopSpin 2.1. В экспериментах TOCSY и ROESY времена смешивания составляли 100 и 150 мс соответственно (Knirel et al. 2015).

Определение кривых адсорбции бактериофагов

Клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, соответствующего штамма осаждали центрифугированием при 3000g в течение 2 мин при комнатной температуре и ресуспендировали в свежей среде LB до OD₆₀₀. К суспензии клеток добавляли фаг до конечной концентрации около 2*10³ БОЕ в 1 мл и смесь инкубировали при 37° C. В выбранные промежутки времени отбирали аликвоты по 0,5 мл и сразу центрифугировали при 12000 g в течение 1 мин (комнатная температура). Затем 50-250 мкл надосадочной

жидкости, содержащей только свободных фагов, высевали на газон с соответствующим хозяином. Для оценки исходного количества БОЕ, фагов инкубировали в тех же условиях и высевали тот же объем, только без предварительного центрифугирования.

Олигонуклеотидные праймеры и плазмидные конструкции

Праймеры BF23L_{lp}-R и BF23L_{lp}42-F (Табл. ПЗ, см. Приложение) использовали для ПЦР амплификации гена *lpr*. Полученный фрагмент клонировали в вектор pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Ориентацию вставки выбирали таким образом, чтобы ген *lpr* находился под контролем промотора полимеразы T7. Эта конструкция была названа pL_{lp}-7C.

Для введения амбер мутаций в выбранные гены, были разработаны длинные (65-75 н) праймеры для мутагенеза, которые позволили обеспечить гомологичные фланки около 50 н для успешной рекомбинации с фаговым геномом. Их использовали в ПЦР в паре с соответствующим стандартным праймером для получения фрагментов ДНК, которые были клонированы в вектор pGEM-T и использованы для рекомбинации с фагами. Для мутагенеза гена *lrfB* фага DT571/2 использовали праймеры 71/2f1m-F и 71/2f1m-R (измененные остатки выделены жирным шрифтом см. таблицу ПЗ), что приводит к мутации Q450ral и изменению соседнего кодона Pe на синонимичный кодон, чтобы облегчить детекцию рекомбинантов с помощью ПЦР.

Праймер 71/2f1mInd-F в комбинации с 71/2f1m-R использовали для скрининга бляшек полученных после рекомбинации.

Праймеры 71/2f2m-R и 71/2f2m-F использовали для введения мутации S23am в ген *lrfA* фага DT571/2 и праймеры 71/2f2mInd-R и 71/2f1mInd-F служили для скрининга бляшек с помощью ПЦР.

Праймеры T5f2-F и T5f2-R использовали для амплификации дивергентных областей в генах *lrfA* в DT571/2 и DT57C с фланкирующими

консервативными последовательностями. Дивергентные области в гене *lfb* этих фагов амплифицировали с использованием праймеров T5f1-F и T5f1-R. Фрагменты ПЦР клонировали и использовали для рекомбинации с целевыми фагами для изменения их хозяйского спектра.

Праймеры VtuB-F, VtuB-F2 и VtuB-R использовали для амплификации и секвенирования генов *btuB* из бактериальных штаммов.

Последовательности всех используемых в работе праймеров указаны в Таблице ПЗ, см. Приложение.

Направленный мутагенез фагов посредством рекомбинации с плазмидами

Чтобы ввести мутации, кодируемые плазмидой, в фаговые геномы, мы использовали многокопийные векторы на основе pGEM-T, содержавшие мутантную последовательность, фланкированную не менее, чем 200 п.н. гомологичной последовательности с одной стороны и не менее, чем 50 п.н. с другой. Трансформацию плазмиды проводили с помощью электропорации в клетки *E. coli* C600 или *E. coli* JM109. Трансформанты выращивали в среде LB в присутствии 100 мкг/мл ампициллина, и инфицировали соответствующим фагом при множественности инфекции 0,01-1,0. Культуру инкубировали при 37° С при энергичном перемешивании до наступления видимого лизиса. В лизат добавляли каплю хлороформа и высевали на газон *E. coli* C600. Для обнаружения рекомбинантных фагов бляшки переносились зубочистками на чашки с двуслойным агаром, на свежий газон с тестовыми культурами. Для мутантов ожидалась потеря роста на тестовых культурах, в то время как культура *E. coli* C600 использовалась в качестве контроля так как должна была быть чувствительной для всех мутантов сгенерированных в этой работе. Для выделения рекомбинантов для которых можно было предположить, что они получают способность образовывать бляшки на штаммах, ограничивающих рост родительских фагов, лизат, наносили непосредственно на такой штамм.

В случае мутантов по гену *ltfB*, фенотип которых нельзя было предугадать, бляшки вырезали из верхнего агара с использованием стеклянных капилляров диаметром около 0,7 мм и экстрагировали фагов из агара в 300 мкл физиологического раствора в течение 40 мин при комнатной температуре с добавлением хлороформа. Полученные экстракты затем центрифугировали при 12000 g в течение 3 мин и использовали супернатанты для ПЦР скрининга. Выявленные мутантные фаги очищали путём повторной изоляции единичной бляшки и подтверждали секвенированием изменённого локуса.

Отбор устойчивых к бактериофагам бактериальных клонов

Отбор бактериальных мутантов, резистентных к конкретным типам фагов, проводили с использованием обычного двухслойного агара, но вместо культуры индикаторного штамма в верхний агар добавляли лизат, содержащий приблизительно 10^9 БОЕ соответствующего фага на чашку. Бактериальную культуру выращенную на среде LB, содержащую 10^6 - 10^7 КОЕ, осторожно распределяли по поверхности фагового агара стеклянным шпателем, и инкубировали в течение ночи при 37°C. Полученные колонии высевали на свежие чашки с твёрдым LB, а затем очищали путём повторной изоляции одиночной колонии. Для того чтобы подтвердить отсутствие связанного фага с полученными устойчивыми клетками мы осуществляли посев культур поверх газона исходного фагочувствительного штамма.

Получение нативной формы белка, ген *ltfB*

Экспрессионные векторы pT5fB и pS649A были получены Н.С. Прохоровым в нашей лаборатории. Чтобы получить нативную форму белка, ген *ltfB* амплифицировали с помощью праймеров 70.5f1.F5 и 70.5f1.R5 (Табл. ПЗ, см. Приложение), и рекомбинировали с вектором pTSL (Taylor *et al.* 2016), линеаризованным рестриктазами BamHI и EcoRI (Thermo Fisher Scientific). Сборку плазмиды - рекомбинацию - провели с помощью системы NEBuilder (New England Biolabs) согласно рекомендациям производителя.

Таким образом, фибрилла LtfB была клонирована в виде N-концевого гибрида с шапероном/цис-транс-пролил-изомеразой slyD. Присутствие slyD в конструкции в качестве N-концевого лидерного домена позволило существенно увеличить выход корректно свёрнутого белка. Плазмиду для экспрессии ltfB с заменой S649A получили по такой же схеме. Целевая мутация была введена на этапе амплификации вставки с помощью праймеров S649ARM и S649AFM (Табл. ПЗ, см. в Приложении). Белки экспрессировали в штамме BL21(DE3)Star (Thermo Fisher Scientific) в автоиндукционной среде ZYM-5052 (Studier 2005) при 25°C в течение 15 часов при интенсивном перемешивании.

Глава 6. Результаты и обсуждение

6.1 Выделение и характеристика колифагов DT57C и DT57-1/2

В ходе экологического эксперимента проведённого в 2006 году (Golomidova et al. 2007) из двух образцов фекалий отобранных от двух разных лошадей (Страж, Зигберг), находящихся на одной конюшне было выделено 10 изолятов бактериофагов, специфичных к штамму *E. coli* C600. Среди этих изолятов оказались пять фагов, близкородственных колифагу T5.

Идентификация фагов была основана на секвенировании случайных клонов геномной ДНК последовательности, которые совпадали с геномом фага T5 на уровне более 95% идентичных нуклеотидов. Однако, рестрикционный анализ (EcoRV) показал, что эти вирусы представляют близкие, но все же отличающиеся генетические линии (Рис.14).

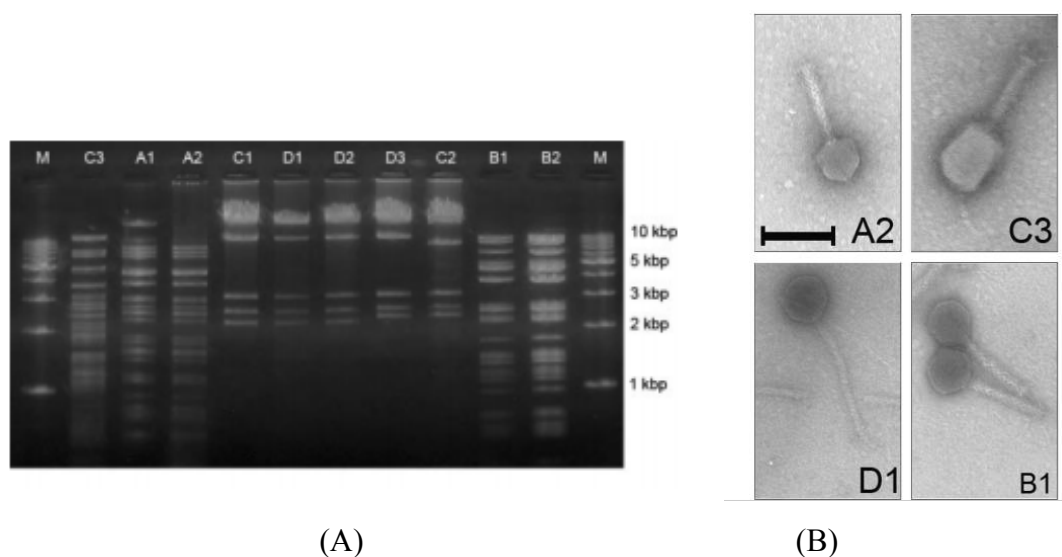


Рис. 14. Рестрикционный анализ ДНК фагов с помощью рестриктазы EcoRV. М – 1 kb маркер (Сибэнзим) (А); (В) Морфология 3 типов фагов (С3 – JS98-подобный (*Myoviridae*); А1-2, В1-2 – Felix01-подобные (*Myoviridae*); С1-2, D1-3 – T5-подобные (*Siphoviridae*). Масштабная линейка 100 нм.

Позже, при более детальном исследовании хозяйского спектра данных фагов, выяснилось, что фаг T5-C7 содержит, примесь близкородственного фага. Оба эти фага были выделены из одной бляшки и оставались ассоциированными, несмотря на очистку трёхкратным проведением через отдельную бляшку. Разделить эти фаги удалось с помощью посева на штамм 4S, на котором лизат T5-C7 высевался в высоких титрах, и на штамм

HS1/2, на котором он рос в титре 10^2 - 10^3 . В результате на штамме 4S был выделен фаг DT57C, а на штамме HS1/2 фаг DT57-1/2. Рестрикционный анализ (HaeIII и HindIII) этих фагов показал, что они являются различными изолятами одного фагового генотипа (Рис. 15).

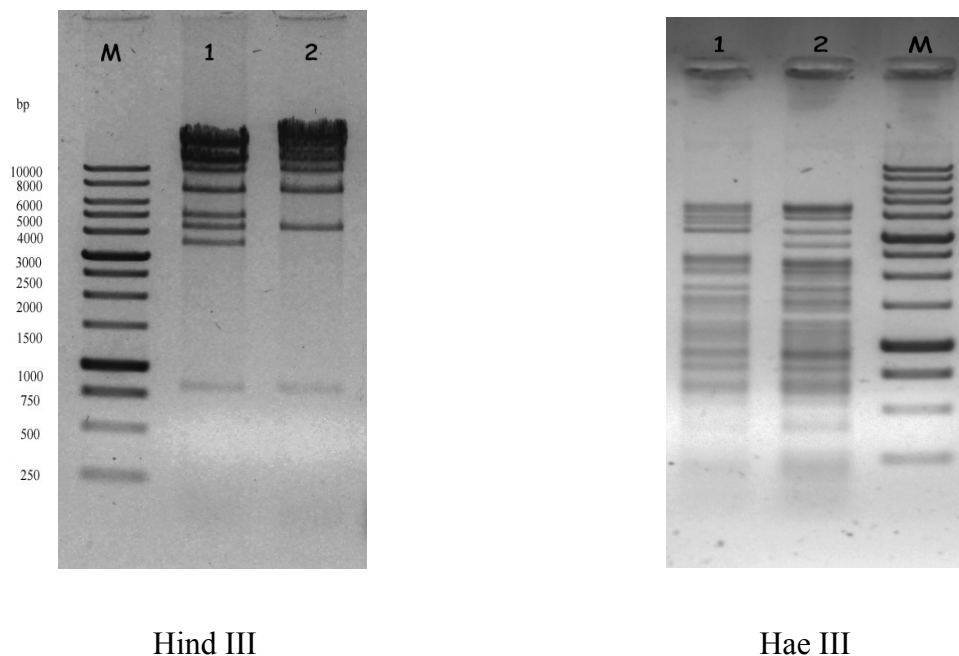
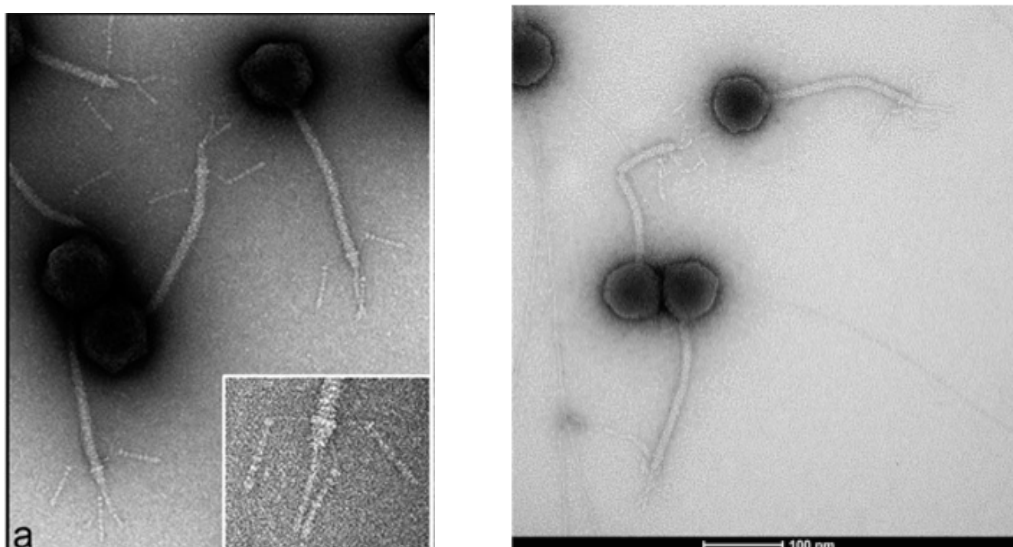


Рис. 15. Рестрикционный анализ - ДНК фагов (для анализа использовались ферменты Hind III и Hae III). Дорожка 1 - DT571/2, дорожка 2 - DT57C; М - 1 kb маркер (Сибэнзим).

Электронная микроскопия показала, что они морфологически идентичны и относятся к семейству *Siphoviridae*. Фаги имели изометрическими головки (~80 нм в диаметре, $n = 5$) и длинными несократимыми хвостами (~190 нм длиной, $n = 5$) (Рис. 16), что также подтверждает близкое родство с колифагом T5.



(A)

(B)

Рис. 16. Электронная микроскопия с негативным окрашиванием фаговых частиц T5 (A) (цит. по Zivanovic et al. 2014) и (B) DT571/2 (цит. по Golomidova et al. 2015).

Спектры хозяев бактериофагов DT57C и DT571/2 очень похожи (Табл. 3). Оба фага образуют бляшки на лабораторных штаммах *E. coli*, не имеющих на поверхности О-антигена (С-600, BL21, JM109, Ве, Z85), однако они демонстрируют различия в специфичности по отношению к природным штаммам *E. coli*, выделенным из образцов фекалий лошадей, собранных от тех же самых животных, от которых были выделены данные бактериофаги. Так, DT57C образует бляшки на *E. coli* 4S (серотип подобный O22) (Knirel et al. 2015), но не на штамме HS1/2 (серотип O87) (Zdorovenko et al. 2015). В отличие от DT57C, фаг DT571/2 растёт на штамме HS1/2, но не на штамме 4s. И тот, и другой фаг могут расти на изоляте *E. coli* HS3/104, который продуцирует О-антиген типа O81 (Zdorovenko et al. 2018) (Табл. 3).

Табл. 3. Оценка хозяйского спектра фагов DT57C и DT571/2.

	4S	5S	4/2	HS 3-104	C-600	BL21	Z85	HS1/2	9SM	NM522
DT57C	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
DT571/2	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-

Так же оба фага способны расти на производных *E. coli* 4S – штаммах 4SI и 4SR, которые были отобраны по устойчивости к бактериофагу G7C, и которые являются дефицитными по O-ацитилированию O-антигена или биосинтезу O-антигена, соответственно.

Мы решили исследовать механизм, ответственный за способность этих фагов различать штаммы 4S и HS1/2. Для того, чтобы с уверенностью утверждать, что устойчивость штамма 4S к фагу DT57C и штамма и HS1/2 к фагу DT571/2, имеет в своей основе неспособность этих вирусов адсорбироваться на соответствующих клетках и не является результатом ингибирования внутриклеточного размножения фага, был проведён адсорбционный эксперимент для каждого из двух фагов на штаммах *E. coli* C-600, 4S, 4SI, 4SR, HS1/2 и HS1/304 (Рис. П4, см. в Приложении). И DT57C и DT571/2 эффективно адсорбируются на клетках штаммов C-600, 4sI, 4sR и HS1/304. При этом DT57C адсорбируется на *E. coli* 4S, но остался не связанным при инкубации со штаммом HS1/2, в то время как DT571/2 вёл себя противоположно: он эффективно адсорбировался на HS1/2, но не на клетки штамма 4S (Табл. 4). Эти результаты свидетельствуют о том, что хозяйский спектр исследуемых фагов на штаммах-хозяевах определяется специфичностью их адсорбции.

Табл. 4. Эффективность роста бактериофагов и их мутантов на различных хозяйских штаммах *E. coli*.

Бактериофаги	Штаммы <i>E. coli</i>							
	4S	4SR	4StfA ^R	4SI	4SI:pwclK	HS1/2	C-600	HS 3/104
BF23	-	+	-	+	-	-	+	-
DT571/2	-	+	-	+	-	+	+	+
DT5712 <i>ltfA opal</i>	-	+	-	+	-	-	+	-
DT5712 <i>am ltfB</i>	-	+	-	+	-	10 ^{-1b}	+	10 ^{-5a}
DT571/2-ABF	-	+	-	+	-	-	+	+
DT57C	+	+	-	+	+	-	+	+
DT57C(4S-)	I	+	-	+	I	-	+	I
DT530	+	+	-	+	+	-	+	+
DT530(1)	-	+	-	+	-	-	+	I

“+“ эффективное образование бляшек; “-“ нет роста фагов; “I” нет отдельных бляшек, но появляется зона ингибирования роста культуры клеток в месте нанесения капли концентрированного лизата фага; а - эффективность роста 10⁻⁵ (формируются нормальной морфологии бляшки (ревертанты)); b – в свежем лизате наблюдалась эффективность образования бляшек около 10⁻¹, бляшки очень маленькие и мутные (цит. по Golomidova *et al.* 2016).

6.2 Полные геномные последовательности бактериофагов DT57C и DT571/2

Для выяснения генетических основ различий в специфичности адсорбции наших фагов мы определили полные последовательности их геномов.

Размер полной геномной последовательности фага DT57C составил 108065 п.н., а последовательности генома фага DT571/2 108418 п.н. Уровень сходства полученных последовательностей между собой был более 96% (100% в большей части генов) (Рис.17). В соответствии с критерием ICTV (King *et al.* 2012) эти изоляты могут считаться штаммами одного и того же вида фага. При этом уровень дивергенции между геномами исследуемых фагов и геномом бактериофага T5 значительно выше. Например, совпадение нуклеотидных последовательностей фагов DT57C и T5 составило 71%. Таким образом, эти фаги могут считаться представителями нового вида внутри рода *T5virus*. В общей сложности в геномах было идентифицировано

132 открытые рамки считывания (ОРС), при этом организация геномов была почти идентичной. Оба фага содержат кластеры тРНК с 14 генами тРНК у DT571/2 и 16 генами у DT57С. Расположение физических концов вирионной ДНК было определено В.Н. Ксёндзенко (ИБФМ РАН, Пущино). Копия терминального повтора для фага DT57С находится в положениях 100104..107699 п.н., а для DT571/2 100334..108052 п.н.

Наиболее близким к DT57С и DT571/2 оказался бактериофаг BF23 (В. Ксёндзенко, личное сообщение), однако поскольку его полный геном не опубликован, сравнение проводили с фагом T5. По сравнению с геномом фага T5, фаги DT57С и DT571/2 имеют некоторые различия в расположении неструктурных открытых рамок считывания, однако на эти различия главным образом влияют многочисленные белки с неизвестными функциями и homing нуклеазы (Таблица 3, см. Приложение). Одной из наиболее интересных и уникальных открытых рамок считывания, найденных у DT57С и DT571/2, является DT57С_000008 (DT571/2_000008), кодирующая пептид с несколькими гидрофобными повторами (MVIIIFIVIIILMVIIIFIVIIILMVIIIMVIIISIVIIILMVIIIFIVIIIFIVIIITYEIVSWLMR), при этом такой белок у фага T5 не обнаружен. Этот полипептид не имеет аналогов в GenBank, но такие белки содержащие повторы часто имеют определённую физиологическую активность такую как антибактериальное действие (Ong *et al.* 2014). Практически все предсказанные структурные белки (за исключением рецептор узнающих белков) являются идентичными или высоко гомологичными с соответствующими продуктами генов фага T5.

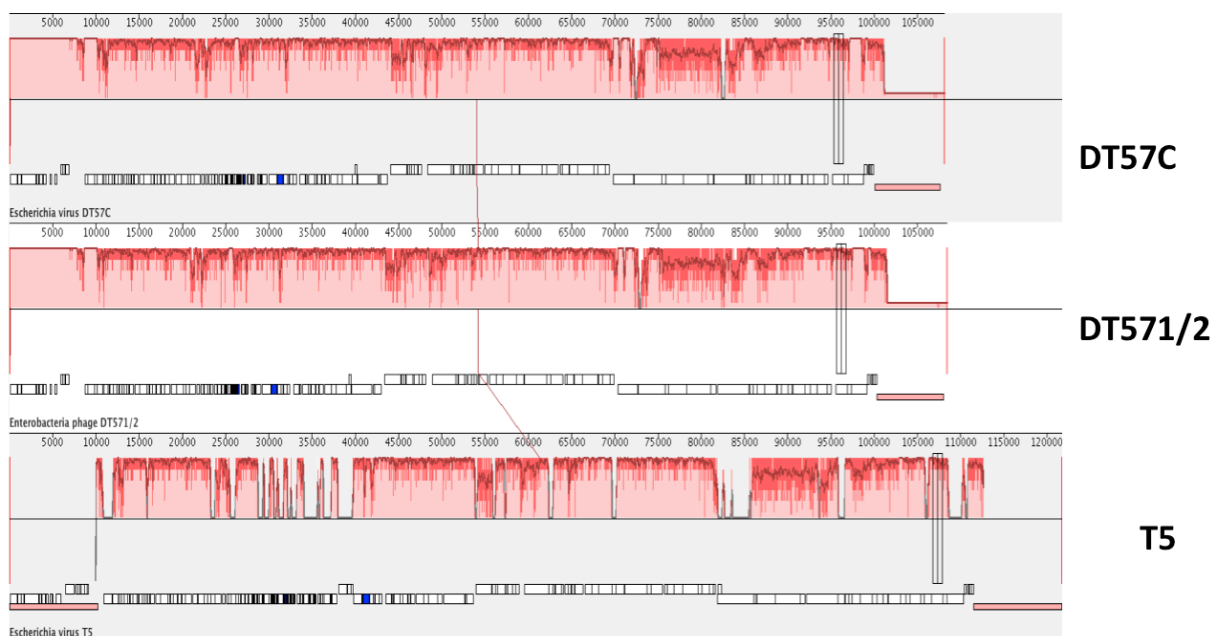


Рис.17. Выравнивание полных последовательностей геномов бактериофагов DT57C, DT571/2 и T5 с помощью программы Mauve (Version 2.4.0).

6.2.1 Организация генов адсорбционного аппарата бактериофагов DT57C и DT571/2

Сравнение двух фаговых геномов с фагом T5 также выявило различия в организации локусов хвостовых фибрилл. В отличие от хорошо изученных фагов T5 и BF23, которые кодируют единственный белок латеральной фибриллы (Ltf или pb1), образующий L-образную фибриллу (Zivanovic et al. 2014), геномы DT57C и DT571/2 содержат два идущих друг за другом гена, кодирующие большие полипептиды, имеющие сходство с известными фибриллярными белки бактериофагов. Более длинный ген *ltfA* имеет короткую область гомологии с геном *ltf* фага T5 лишь вблизи N-конца. Продукт гена *ltfB* расположенный рядом не имеет участков гомологии со структурными белками фага T5. Аминокислотная последовательность C-конца *ltfA* у фагов DT57C и DT571/2 различается, в то время как все остальные белки, потенциально относящиеся к адсорбционным, в том числе вторая хвостовая фибрилла LtfB и рецептор-узнающий белок pb5 (*hrs*), обеспечивающий связывание с конечным рецептором, являются у этих

вирусов практически идентичными. В результате этого анализа было сделано предположение, что первичным рецептором для исследуемых фагов могут быть поверхностные липополисахариды (ЛПС), распознаваемые с помощью белка LtfA. О функции адгезина LtfB из анализа последовательностей судить было невозможно.

Гены структурных белков pb5 (*hrs* gp144, рецептор-связывающий белок), который необходим для адсорбции фага и Llp (gp145, рецептор-блокирующий белок), являются идентичными между DT57C и DT571/2. Аминокислотные последовательности этих белков гораздо ближе к белку pb5 фага BF23 (*hrs*), чем к pb5 фага T5 (*oad*). Тем не менее, они имеют обширную область негомологии с белком pb5 фага BF23 (*hrs*). В то же время рецептор-блокирующий белок Llp практически идентичен (одна аминокислотная замена) во всех трёх фагах.

6.3 Генетический и функциональный анализ адсорбционного аппарата

6.3.1 Определение конечного рецептора для исследуемых бактериофагов

Определение полных последовательностей геномов фагов DT57C и DT571/2 позволило идентифицировать гены белков, потенциально вовлечённых в распознавание клетки-хозяина.

Как отмечено выше, фаги исследуемые в нашей работе T5 имеют одну и ту же последовательность генов рецептор-связывающего белка pb5 (*hrs*), который ближе по аминокислотной последовательности к фагу BF23, чем к T5. Ранее показано (Guterman *et al.* 1975), что белок pb5 фага BF23 распознает транспортёр внешней мембраны VtuB, а фага T5 – FhuA (Breyton *et al.* 2013). Белки Llp, предотвращающие суперинфекцию, также существенно отличаются у фагов T5 и BF23 и блокируют соответственно, рецепторы FhuA и VtuB (Mondigler *et al.* 2006).

В отличие от основной части генома наших фагов, которая имеет высокую степень сходства на уровне нуклеотидов с геномом бактериофага T5, нуклеотидная последовательность гена *hrs* довольно сильно расходятся как с T5, так и фага BF23. На уровне аминокислотных последовательностей

сходство белка pb5 фагов DT57C и DT57C1/2 с фагом BF23 является мозаичным (Рис.18). Большие расхождения наблюдаются в области от 107 по 285 а.к. (координаты для фага BF23), которые, предположительно, участвуют в распознавании конечного рецептора (Mondigler *et al.* 1996).

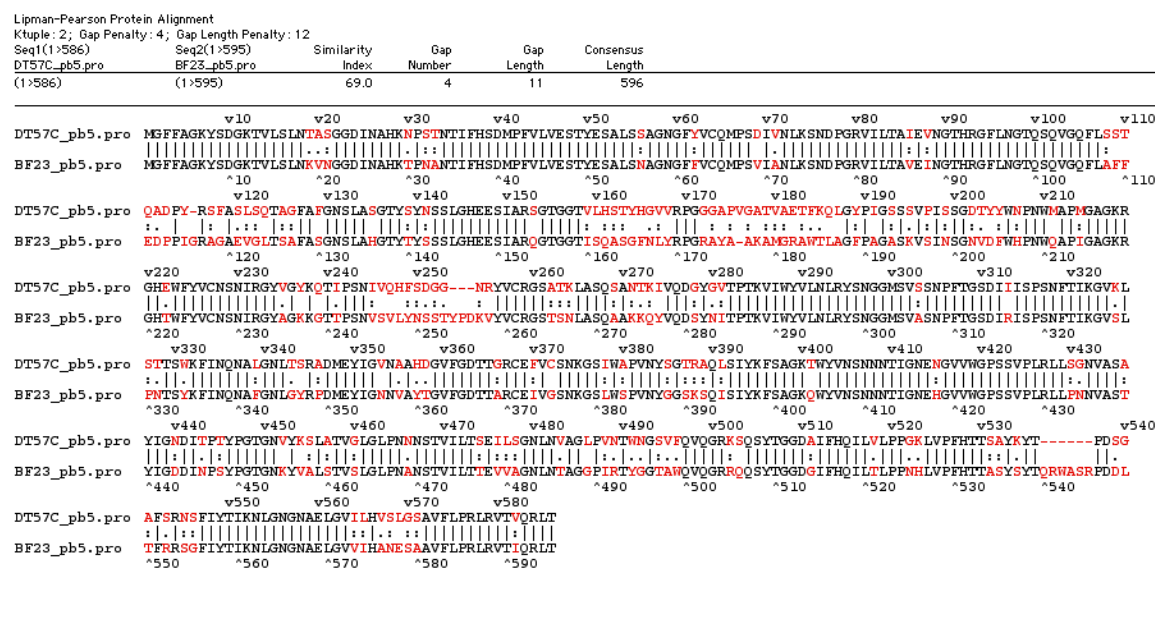


Рис. 18. Выравнивание последовательностей белка Pb5 (*hrs*) бактериофага DT57C и фага BF23.

В тоже время, соседний ген *llp*, практически идентичен гену *llp* бактериофага BF23, как на нуклеотидном, так и на белковом уровне (присутствует одна аминокислотная замена) (Рис. 19).

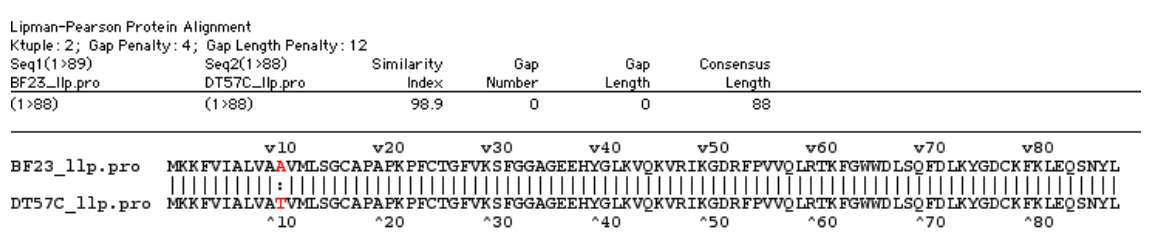


Рис. 19. Выравнивание последовательностей белка Llp (*llp*) бактериофага DT57C и фага BF23.

Низкое сходство нуклеотидной последовательности гена *hrs* по сравнению с соседними областями генома между нашими фагами и фагом BF23 даёт

возможность предположить, что этот вариант гена *hrs* является недавним приобретением наших фагов от предка, сходного с BF23 (или наоборот). Предполагаемая точка рекомбинации расположена между генами *hrs* и *llp*, внутри функционального модуля, как было установлено (Mondigler et al. 2006). Для проверки функциональной совместимости белков pb5 (*hrs*) и Llp наших фагов мы клонировали ген *llp* фага DT57C в вектор pGem-T под контролем собственного сайта инициации трансляции и промотора T7, имеющегося в векторе. Для тестирования активности данного белка, полученная конструкция была трансформирована в штамм *E. coli* JM109 (DE3), который, будучи, как и *E. coli* C600, производным штамма *E. coli* K12, чувствителен к нашим изолятам фагов, а также к фагам BF23 и T5. Эффективность ингибирования фагов экспрессированным белком Llp анализировали без индукции IPTG, ограничивая экспрессию Llp до уровня «подтекания» промотора. Экспрессия Llp фага DT57C снижает эффективность посева наших фагов и фага BF23, более чем в 100 раз, при этом эффекта на рост фага T5 не наблюдается. Следует отметить, что влияние экспрессии гена *llp* на наши фаговые изоляты, а так же против фага BF23 было менее выражено, чем указано в статье (Mondigler et al. 2006). В их экспериментах наблюдалось уменьшения эффективности образовывать бляшки на шесть порядков и более, по сравнению с двумя порядками в наших исследованиях. Причины этих различий не ясны.

Эти результаты демонстрируют, что рецептор блокирующий белок Llp у наших фагов, так же как и у фага BF23 блокирует белок VtuB. Анализируя полученные результаты, мы предположили, что белок pb5 (*hrs*) у наших изолятов распознает тот же белок (VtuB), что и у фага BF23 несмотря на существенные различия в аминокислотной последовательности.

Так же было показано, что мутанты *E. coli* C600, выбранные по резистентности к BF23, устойчивы к нашим фагам, но не к фагу T5 (личному сообщению Владимира Ксёзенко). Мы секвенировали ген *btuB* штаммов

E. coli 4S, *E. coli* HS1/2 и *E. coli* HS3-104. Полученные нуклеотидные последовательности были идентичными и не отличались от этого гена в большинстве опубликованных геномов *E. coli*, включая последовательность штамма *E. coli* MG1665. Мы получили клоны *E. coli* 4SR, устойчивые к мутанту *ltfA⁻ am*, полностью лишённому функции LTF (см. раздел 3.3.4), который, очевидно, инфицирует клетки хозяина только посредством прямого распознавания вторичного рецептора его белком pb5 (*hrs*). Все тестируемые клоны (n = 24) одновременно обладали устойчивостью к инфекции фагом BF23. Поскольку мы не наблюдали фенотипических изменений между этими клонами, мы обозначаем их все 4SR *ltfA^R*. Секвенирование гена *btuB* в двух случайно выбранных клонах 4SR *ltfA^R* показало большую делецию в одном случае и внедрение мобильного IS элемента в другом случае, приводившие к инактивации гена (штаммы депонированы под номерами KU291215.1, KU291214.1). Комплементация гена *BtuB* плазмиды возвращала чувствительность к фагам DT57C и DT571/2.

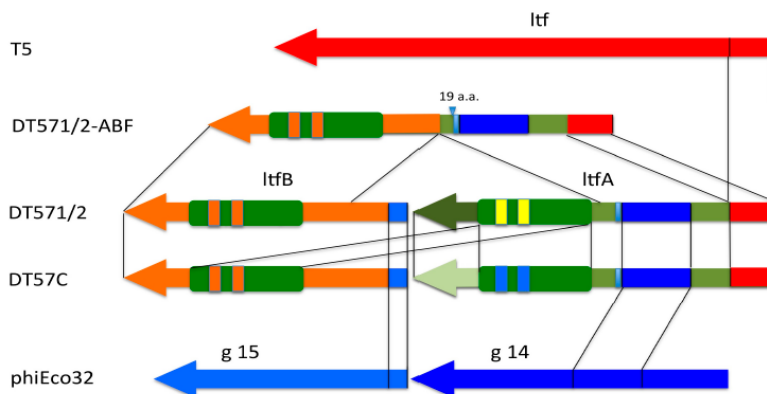
Суммируя имеющиеся данные, мы заключаем, что фаги DT57C и DT571/2 используют белок *BtuB* в качестве вторичного рецептора. В то же время, это распознавание рецептора не может нести ответственность за различия в диапазоне хозяев между фагами DT57C и DT571/2.

6.3.2 Организация генов латеральных хвостовых фибрилл (LTF)

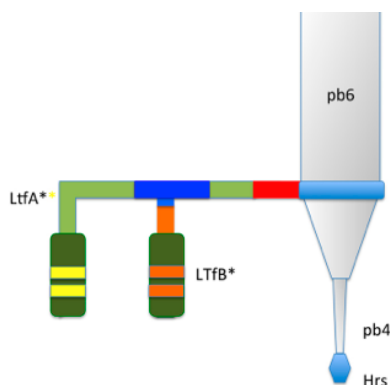
У обоих бактериофагов DT57C и DT571/2 имеются два больших гена кодирующих белки латеральных хвостовых фибрилл. Эти гены были названы *ltfA* и *ltfB* (Golomidova et al. 2015). В отличие от наших фагов, у бактериофагов T5 и BF23 в геноме присутствует только один такой ген (*g143* или *ltf*). Анализ опубликованных аннотированных геномов T5-подобных бактериофагов показал, что часть бактериофагов близкородственных T5, хозяевами которых являются энтеробактерии, phiR201, SPC35, 118970_sal2, Stitch, H8 и др. также обладают двумя генами *ltf*, в то время как у других представителей этого рода T5, BF23, EPS7,

slur09, vb_Kpn_IME260 и др. присутствует только один белок Ltf. При этом N-концевые домены белка Ltf фага T5 и подобных ему вирусов гомологичны N-концевой части белка LtfA наших фагов (Табл. П1, см. Приложение). Так, N-концевая часть генов *lftA* у наших фагов имеет высокую степень сходства. При этом последовательность 80 N-концевых аминокислотных остатков также на 63% идентична соответствующему домену белка Ltf бактериофага T5, который отвечает за присоединение LTF к хвосту вириона T5 (Рис. 20). Это позволяет предположить, что белок LtfA наших фагов отвечает за связывание с белками хвоста, которые практически идентичны соответствующим белкам T5.

Белки LtfB практически идентичны у фагов DT57C и DT571/2 за исключением короткого фрагмента расположенного на N-конце между 65 и 90 аминокислотными остатками (координаты приведены для фага DT57C). При этом средние и C-концевые участки белковых последовательностей LtfA и LtfB наших фагов имеют долю гомологии с некоторыми фибриллярными белками других бактериофагов. Следует акцентировать внимание, что область между аминокислотными позициями 223 и 471 белка LtfA (которая консервативна у фагов DT57C и DT571/2), имеет сходство с регионом 239-508 а.а. белка хвостовой фибриллы gp 14 фага phiEco32. В то же время, N-терминальные 45 аминокислот белка LtfB очень похожи (32 из 45 остатков идентичны) с N-концом другого белка хвостовой фибриллы фага phiEco32 gp15 (Рис. 20). У phiEco32 эти белки взаимодействуют друг с другом, формируя разветвленную фибриллу (данные криоэлектронной реконструкции; П. Г. Лейман, Техасский Университет, США, личное сообщение). Можно предположить, что белки LtfA и LtfB наших фагов взаимодействуют по такому же принципу. В этом случае, белок LtfA является связующим звеном между белком LtfB и вирусной частицей, что объясняет полное отсутствие у LtfB участков гомологии с белками фага T5.



(A)



(B)

Рис. 20. (A) Схема организации латеральных хвостовых фибрилл бактериофагов T5, DT57C, DT571/2, DT571/2-ABF и phiEco32 (частично). Сравнение аминокислотных регионов в Lrf's T5 подобных бактериофагов с другими вирусами отмечено различными цветами. Зелёными прямоугольниками с двойными полосками отмечены рецептор-связывающие домены белка LTF. Цвета двойных полосок указывают на один из трёх типов доменов LTF распознающих первичный рецептор: жёлтый LtfA-DT571/2, синий LtfA-DT57C, оранжевый LtfB специфичные для O81-подобных, O22-подобных и O87-подобных ЛПС, соответственно. (B) Предлагаемая модель разветвлённой организации LTF. Отображается только один из трёх LTF. Звёздочка указывает, что белок протеолитически процессирован. Толстые зелёного цвета прямоугольники с двойными полосками указывают на области связывания рецептора с белками Lrf. Темно-синие и светло-голубые части соответствуют областям гомологии с белками фага phiEco32 gp14 и gp15 соответственно, красная часть - область гомологии с Lrf фага T5.

Белки LrfA наших фагов обладают протяжённой областью расхождения в аминокислотной последовательности на С-конце (Рис. 21). Мы предположили, что эта белковая область может участвовать в распознавании хозяина (Рис. 22).

Lipman-Pearson Protein Alignment
 Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12
 Seq1(1>1076)
 DT57C_ltfA.pro DT571/2_ltfA.pro Similarity Index Gap Number Gap Length Consensus Length
 (1>1068) (1>1039) 72.1 15 33 1070

```

DT57C_ltfA.pro      v120 v130 v140 v150 v160 v170 v180 v190 v200 v210 v220
ADNSAASAQSEGFSDSAELAAQNAEQSRLAEQAKTAAQQAQIAEAAKTKGAEAKDGDADAATTAGEHAAARQSELNAKISETNAAGSATTEAGDKAIDATTEADRAK
DT571/2_ltfA.pro   ADNSAASAQSEGFSDSAELAAQNAEQSRLAEQAKTAAQQAQIAEAAKTKGAEAKDGDADAATTAGEHAAARQSELNAKISETNAAGSATTEAGDKAIDATTEADRAK
                  ^120  ^130  ^140  ^150  ^160  ^170  ^180  ^190  ^200  ^210  ^220
                  v230  v240  v250  v260  v270  v280  v290  v300  v310  v320  v330
DT57C_ltfA.pro     AEADRATQIVDSKLDKVDISGFIKVYKTKAEADADVNNRVLDEKVLVWVQNTSKYGVYKVGAGTAEETPVLELVETEOKLTVNNVRADDAAGNVQITLPGGNPSSLWLGVEVW
DT571/2_ltfA.pro   AEADRATQIVDSKLDKVDISGFIKVYKTKAEADADVNNRVLDEKVLVWVQNTSKYGVYKVGAGTAEETPVLELVETEOKLTVNNVRADDAAGNVQITLPGGNPSSLWLGVEVW
                  ^230  ^240  ^250  ^260  ^270  ^280  ^290  ^300  ^310  ^320  ^330
                  v340  v350  v360  v370  v380  v390  v400  v410  v420  v430  v440
DT57C_ltfA.pro     FFDKDKSGVGYFQVLPADGREVLRVDPDTWEAIEAGLIPVSEAEWQAGASLYSTGDSSTIFRLPDMQQAFAFRAPTKGEEDAGVIKQDIPYVVVYNGISPDALITGNV
DT571/2_ltfA.pro   FFDKDKSGVGYFQVLPADGREVLRVDPDTWEAIEAGLIPVSEAEWQAGASLYSTGDSSTIFRLPDMQQAFAFRAPTKGEEDAGVIKQDIPYVVVYNGISPDALITGNV
                  ^340  ^350  ^360  ^370  ^380  ^390  ^400  ^410  ^420  ^430  ^440
                  v450  v460  v470  v480  v490  v500  v510  v520  v530  v540  v550
DT57C_ltfA.pro     EIDTSLQGTIVSINQGGTGAITKEDARIALELNSSTTEVDSALADKADIAITTYTKTEVDSALADKADIAITTYTKTEVDSALADAKTQSDTYYLLKANNLSDLADRAAAHLNV
DT571/2_ltfA.pro   EIDTSLQGTIVSINQGGTGAITKEDARIALELNSSTTEVDSALADKADIAITTYTKTEVDSALADKADIAITTYTKTEVDSALADAKTQSDTYYLLKANNLSDLADRAAAHLNV
                  ^450  ^460  ^470  ^480  ^490  ^500  ^510  ^520  ^530  ^540  ^550
                  v560  v570  v580  v590  v600  v610  v620  v630  v640  v650  v660
DT57C_ltfA.pro     RPIGSTPLAGDPVGDYDAVTKRWENKINTGTGVPFMNGVMNMGVGDTHLRDSTRAYIQPYEVVSDGQLNLRADWPELWAYAQMLSPISDADWLADPTKGGYSLGDSGTT
DT571/2_ltfA.pro   RPIGSTPLAGDPVGDYDAVTKRWENKINTGTGVPFMNGVMNMGVGDTHLRDSTRAYIQPYEVVSDGQLNLRADWPELWAYAQMLSPISDADWLADPTKGGYSLGDSGTT
                  ^560  ^570  ^580  ^590  ^600  ^610  ^620  ^630  ^640  ^650  ^660
                  v670  v680  v690  v700  v710  v720  v730  v740  v750  v760  v770
DT57C_ltfA.pro     FRVFRDNGVYTGSIKGLFGRGDSASSTGGTILDSAAFNITGSGFRLVYASTTTEYANVYGAFAVLSQAKYKRLEISAADEGTAATYPSGGEFFASNSSPVYGRGST
DT571/2_ltfA.pro   FRVFRDNGVYTGSIKGLFGRGDSASSTGGTILDSAAFNITGSGFRLVYASTTTEYANVYGAFAVLSQAKYKRLEISAADEGTAATYPSGGEFFASNSSPVYGRGST
                  ^670  ^680  ^690  ^700  ^710  ^720  ^730  ^740  ^750  ^760  ^770
                  v780  v790  v800  v810  v820  v830  v840  v850  v860  v870  v880
DT57C_ltfA.pro     EVRPFKATFGVWVIRASGGFVAANTSWSVINGDARLPADGTTADGGEEIISRYNVNGVREAGMSWRIRAQIGAHEYARLVYNAATANKRTAVYDFNDLQTF-SAEHLNLSKGA
DT571/2_ltfA.pro   EVRPFKATFGVWVIRASGGFVAANTSWSVINGDARLPADGTTADGGEEIISRYNVNGVREAGMSWRIRAQIGAHEYARLVYNAATANKRTAVYDFNDLQTF-SAEHLNLSKGA
                  ^780  ^790  ^800  ^810  ^820  ^830  ^840  ^850  ^860  ^870  ^880
                  v890  v900  v910  v920  v930  v940  v950  v960  v970  v980  v990
DT57C_ltfA.pro     YSDGNLTIQNQGWPGINFKSNRYNTPATQIGGSTILEVSGTDGNVSGVNLIRRGDGNQAGQIIVSFPITGGALALQGTSGIEXKDDVD-ADAQEAADRINQRLVNFV
DT571/2_ltfA.pro   YSDGNLTIQNQGWPGINFKSNRYNTPATQIGGSTILEVSGTDGNVSGVNLIRRGDGNQAGQIIVSFPITGGALALQGTSGIEXKDDVD-ADAQEAADRINQRLVNFV
                  ^890  ^900  ^910  ^920  ^930  ^940  ^950  ^960  ^970  ^980  ^990
                  v1000 v1010 v1020 v1030 v1040 v1050 v1060
DT57C_ltfA.pro     YKDDQERVRFVIAEEAEALIAFQYIKHNQVSYEDILDEEGNKIGEKTRDRPVSVDVNFVMDLMGCVQALNAKTALEAR
DT571/2_ltfA.pro   YKDDQERVRFVIAEEAEALIAFQYIKHNQVSYEDILDEEGNKIGEKTRDRPVSVDVNFVMDLMGCVQALNAKTALEAR
                  ^970  ^980  ^990  ^1000 ^1010 ^1020 ^1030

```

Рис. 21. Выравнивание последовательности белка LtfA (*ltfA*) бактериофага DT57C и фага DT571/2. Фиолетовой стрелочкой обозначен предсказанный сайт протеолиза при автокаталитическом отщеплении С-концевого шаперонного домена.

Lipman-Pearson Protein Alignment
 Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12
 Seq1(1>476)
 DT57C_ltfA.pro DT571/2_ltfA.pro Similarity Index Gap Number Gap Length Consensus Length
 (1>468) (1>439) 42.1 15 33 470

```

DT57C_ltfA.pro      v10 v20 v30 v40 v50 v60 v70 v80 v90 v100
RDSRAYIQPYEVVSDGQLNLRADWPELWAYAQMLSPISDADWLADPTKGGYSLGDSGTTFRVFRDNGVYTGSIKGLFGRGDSASSTGGTILDSAAFNITGSGFRLVYASTTTEYANVYGAFAVLSQAKYKRLEISAADEGTAATYPSGGEFFASNSSPVYGRGSTEVRPFKATFGVWVIRASGGFVAANTSWSVIN
DT571/2_ltfA.pro   RDSRAYIQPYEVVSDGQLNLRADWPELWAYAQMLSPISDADWLADPTKGGYSLGDSGTTFRVFRDNGVYTGSIKGLFGRGDSASSTGGTILDSAAFNITGSGFRLVYASTTTEYANVYGAFAVLSQAKYKRLEISAADEGTAATYPSGGEFFASNSSPVYGRGSTEVRPFKATFGVWVIRASGGFVAANTSWSVIN
                  ^10  ^20  ^30  ^40  ^50  ^60  ^70  ^80  ^90
                  v110 v120 v130 v140 v150 v160 v170 v180 v190 v200
DT57C_ltfA.pro     TGSFRLVYASTTTEYANVYGAFAVLSQAKYKRLEISAADEGTAATYPSGGEFFASNSSPVYGRGSTEVRPFKATFGVWVIRASGGFVAANTSWSVIN
DT571/2_ltfA.pro   TGSFRLVYASTTTEYANVYGAFAVLSQAKYKRLEISAADEGTAATYPSGGEFFASNSSPVYGRGSTEVRPFKATFGVWVIRASGGFVAANTSWSVIN
                  ^100 ^110 ^120 ^130 ^140 ^150 ^160 ^170 ^180 ^190
                  v210 v220 v230 v240 v250 v260 v270 v280 v290
DT57C_ltfA.pro     GDATRFADGTTADGGEEIISRYNVNGVREAGMSWRIRAQIGAHEYARLVYNAATANKRTAVYDFNDLQTF-SAEHLNLSKGA IYSDGNLTIQNQGWPGINFKSNRYNTPATQIGGSTILEVSGTDGNVSGVNLIRRGDGNQAGQIIVSFPITGGALALQGTSGIEXKDDVD-ADAQEAADRINQRLVNFV
DT571/2_ltfA.pro   GDATRFADGTTADGGEEIISRYNVNGVREAGMSWRIRAQIGAHEYARLVYNAATANKRTAVYDFNDLQTF-SAEHLNLSKGA IYSDGNLTIQNQGWPGINFKSNRYNTPATQIGGSTILEVSGTDGNVSGVNLIRRGDGNQAGQIIVSFPITGGALALQGTSGIEXKDDVD-ADAQEAADRINQRLVNFV
                  ^190 ^200 ^210 ^220 ^230 ^240 ^250 ^260 ^270 ^280 ^290
                  v300 v310 v320 v330 v340 v350 v360 v370 v380 v390
DT57C_ltfA.pro     NRNYNTPATQIGGSTILEVSGTDGNVSGVNLIRRGDGNQAGQIIVSFPITGGALALQGTSGIEXKDDVD-ADAQEAADRINQRLVNFVYKDDQERVRFVIAEEAEALIAFQYIKHNQVSYEDILDEEGNKIGEKTRDRPVSVDVNFVMDLMGCVQALNAKTALEAR
DT571/2_ltfA.pro   NRNYNTPATQIGGSTILEVSGTDGNVSGVNLIRRGDGNQAGQIIVSFPITGGALALQGTSGIEXKDDVD-ADAQEAADRINQRLVNFVYKDDQERVRFVIAEEAEALIAFQYIKHNQVSYEDILDEEGNKIGEKTRDRPVSVDVNFVMDLMGCVQALNAKTALEAR
                  ^280 ^290 ^300 ^310 ^320 ^330 ^340 ^350 ^360
                  v400 v410 v420 v430 v440 v450 v460
DT57C_ltfA.pro     FGVIAEEAEALIAFQYIKHNQVSYEDILDEEGNKIGEKTRDRPVSVDVNFVMDLMGCVQALNAKTALEAR
DT571/2_ltfA.pro   FGVIAEEAEALIAFQYIKHNQVSYEDILDEEGNKIGEKTRDRPVSVDVNFVMDLMGCVQALNAKTALEAR
                  ^370 ^380 ^390 ^400 ^410 ^420 ^430

```

Рис. 22. Выравнивание последовательностей С-концевой области белка LtfA (*ltfA*) бактериофага DT57C и фага DT571/2. Голубым цветом выделена область расхождения в аминокислотной последовательности, предположительно участвующая в распознавании хозяина.

Несмотря на то, что наблюдаемые последовательности различаются между белками LtfA и LtfB и между С-концевыми частями белков LtfA двух исследуемых фагов (Рис. 23), было показано, что все вышеупомянутые

белки содержат на С-концах предсказанные (детекция консервативных доменов программой BlastP на сайте <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> и предсказание с помощью программы HHPred <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/hhpred> (Soding *et al.* 2005) консервативные шаперонные домены, потенциально способные к автокаталитическому отщеплению, что необходимо для корректного фолдинга терминальной β-спирали (Garcia-Doval *et al.* 2015).

```

LTFB_7C 179 NGTWGVYSDTE-NEWLALPVEQGGTG-----VNNREALWDVVRPQGSTPLAGDPV 227
      +   Y+ E+ LA  Q T           + +R A W VRP GSTPLAGDPV
LTFB_7C 505 D-IATTTYTKVEVDSALADAKTQSDTDYLLKANNLSDLADRAAAWLNVRPIGSTPLAGDPV 563

LTFB_7C 228 GDYDAVTKRWVENKINTGTVGPTMNGVMNYGVGDFHLRDSRAYIQPYEVVSDGQLLRAD 287
      GDYDAVTKRWVENKINTGTVGPTMNGVMNYGVGDFHLRDSRAYIQPYEVVSDGQLLRAD
LTFB_7C 564 GDYDAVTKRWVENKINTGTVGPTMNGVMNYGVGDFHLRDSRAYIQPYEVVSDGQLLRAD 623

LTFB_7C 288 WPELWAYAQM LSPISDATWLANP NQRGKYSTGDGTTFRVPRDRNGVQPGSIFGLFCRGDG 347
      WPELWAYAQM LSPISDA WLA+P +RG+YS GDG+TTFRVPRDRNGVQ GSI LF RGDG
LTFB_7C 624 WPELWAYAQM LSPISDADWLADP FRGQYSLGDGTTFRVPRDRNGVQPGSISALFGRGDG 683

LTFB_7C 348 GQSGNDGYIYESGAPNITG---RVELHGGGSAS IINGESGAFHGSGGADSQYRTPSNLTV 404
      G S  G I +S APNITG R+  G+  N +GAF  + ++Y+ S ++
LTFB_7C 684 GASSTGGTILDSAAPNITGSGFGRLVYASTGTIYEANTGTGAFSAVL-SQAKYKRLSEISA 742

LTFB_7C 405 SSG-AVSYGI-INLDASRVSAIYGRVTVELRPNFMGVVIRASGGFVAANTSWSVINGD 462
      + G A +Y  AS S +YGR TE+RP F GVWVIRASGGFVAANTSWSVINGD
LTFB_7C 743 ADGTAATYPSGFEFFASNSSPVYGRGSTEVRPKAFTGVWVIRASGGFVAANTSWSVINGD 802

LTFB_7C 463 ATRPANGTIAQGGNIFSLYKISGANEAASFARADIGGNY SARISVTNSTTQRSANLDF 522
      ATRPA+GT A GG I S Y ++G EA+ S+ RA IG + AR++V N+T R+A DF
LTFB_7C 803 ATRPADGTTADGGEIISRYNVNGVREAQMSWRIRAQIGAEHYARLNVYNATANRTAVYDF 862

LTFB_7C 523 DETGKLTIPNSIVVNSVNSD----FDGVCWADSADKVRWRMGINDASGNFKLQSYDASGA 578
      ++ G + N ++ SD W GIN S + + G+
LTFB_7C 863 NDLGTFSAENLHSGKAIYSDGNLTIQNGWP-----GINFKSNRYNTPATQIGGS 912

LTFB_7C 579 YRDTVVEIPGAGTGGVWARDITIRPTTDGVPKSFVLHNAKDSVPAGNFRMTMWDVSNINS 638
      T++E+ G TDG N++
LTFB_7C 913 ---TIIIEVSG-----TDG-----NVSG 926

LTFB_7C 639 NQIYKYFEKNGTG-ITINWPSSGGV LALQCTS^GRDFKKDIVNADVTEAVARIEQMRMVN 697
      + + GN G I +++P++GG +ALQCTS^G +++KD+ +AD EA+ RI R+VN
LTFB_7C 927 VNLIRRRGDGNQAGQIIVSPPTTGGAIALQCTS^GIEYKKDVTDADAQEAMDRINGQRLVN 986

LTFB_7C 698 YVYKDDVQERVRFGIIAEEAEIAPQYIKHREETYDVEVDPETNAIIGGKTRDRPSVDVN 757
      +VYKDD QERVRFG+IAEEAE IAPQYIKH + +Y+ +D E N IG KTRDRPSVDVN
LTFB_7C 987 FVYKDDVQERVRFGVIAEEAEIAPQYIKHNQVSYEDILDEEGNK-IGEKTRDRPSVDVN 1045

LTFB_7C 758 PIVMDLMGCVQYLNKQIEDLKAIEIAALKA 786
      PIVMDLMGCVQ LN +I L+A IA L++
LTFB_7C 1046 PIVMDLMGCVQALNAKIAALEARIAELES 1074

```

Рис. 23. Выравнивание С-концевых областей белков LtfA (*ltfA*) и LtfB (*ltfB*) бактериофага DT57C. Зелёным выделен область, которая отвечает за специфическое связывание с рецептором (экспериментально доказано только для LtfA). Знак "^" обозначает предсказанный сайт протеолиза при автокаталитическом отщеплении С-концевого шаперонного домена. (см. ниже). Консервативные аминокислотные остатки вблизи места расщепления выделены жёлтым цветом.

Участки расщепления могут быть легко предсказаны на основе консервативного мотива, присутствующего во всех белках. Сравнительный анализ последовательностей наших белков с белками, для которых автопротеолитический процессинг таких доменов был подтверждён

экспериментально позволил предсказать сайт протеолиза (Рис.21,23) (Muhlenhoff *et al.* 2003). Аналогичный автопротеолитический шапероновый домен был обнаружен также на С-конце бактериофага T5 Ltf белка, а также в хвостовых придатках некоторых других фагов, включая один хорошо изученный пример - эндосиалидазный хвостовой шип фагов K1F, K1E и K1-5 (Muhlenhoff *et al.* 2003, Stummeyer *et al.* 2005, Schulz *et al.* 2010). (Рис. 24).

```

LTFA_7C      GNVSGVNLIRRRGDEINQAGQIIIVSFPTTGGAIALQ---GTS^GIEYKKVTDADAQEAMDRINGQRLVNFV-YK
LTFA_1/2    GDMTIMITSV-----SGSTPRYFQFMQAGNAVCPGWSTTTS^DERIKEDVVRIPDPLGAMRTIKGVSWR---VK
LTFB_7C     VNINSNQIYKYFEKENGTG-ITINWPSSCGVLALQ---GTS^GRDFKKDIVNADVTEAVARIEQMRMVNYV-YK
LTFB_1/2    VNINSNQIYKYFEKENGTG-ITINWPSSCGVLALQ---GTS^GRDFKKDIVNADVTEAVARIEQMRMVNYV-YK
LTF_T5      NGTLMPMADNRYNLEWSGSRVKQYAVNGTI-----NTS^DARLKNDVRAMSDPETEAAKAIAKEIGFWTWK
gp12_Ga-1   NGAIVPSTDNLQNMQXSNRMRNIYAGTGAI-----NTS^DERHKTDIAPISDKVLDAWEKV-KFYQY2KFK
Endo-S K1F  SADVKPYNDNVTALSGPSNRFTTAYLGSNPI-----VTS^NGERKTEPVVFDDAFLDAW-GDVHYIMYQWLD

```

Рис. 24. Выравнивание регионов с помощью ClustalV, соседствующих с предполагаемым сайтом расщепления белков LtfA и LtfB наших фагов и в белках с известными структурами автокаталитического С-концевого шаперонового домена: Ltf бактериофага T5 (X69460), gp12 бактериофага *Bacillus subtilis* Ga-1 (NC_002649) и эндосиалидазы *E. coli* бактериофаг K1F (AJ505988).

«^» Указывает на предсказанные или экспериментально определённые участки сайта протеолиза при автокаталитическом отщеплении С-концевого шаперонного домена. Красным выделены аминокислотные остатки, сохранённые в шести и более выровненных последовательностей.

С-концевой домен латеральной фибриллы фага T5 был кристаллизован, и структура домена определена методом рентгеноструктурного анализа. Кроме того, была установлена структура мутантного белка с заменой S1264A, подавляющей протеолиз шаперона (Garcia-Doval *et al.* 2015). Чтобы подтвердить сходную организацию С-терминальных доменов коротких и длинных фибрилл фагов DT57C и DT571/2 мы провели анализ вторичной структуры фибриллы ltfB с помощью алгоритма ClustalV, сравнив её со структурой соответствующей части фибриллы фага T5, определили S649 (^) как вероятный сайт автопротеолиза (Рис.24)

Для подтверждения факта автокаталитического процессинга белки LtfA и LtfB фага DT571/2 были проклонированны в вектор pET32a под контролем T7-промотора (данная работа проведена совместно с Н.С. Прохоровым). Анализ экспрессии рекомбинантных белков с помощью ДСН-ПААГ

обнаружил присутствие двух форм каждого из них, отличающихся по подвижности (Рис. 25). Предсказанные молекулярные веса соответствующих полосок согласуются с ожидаемыми величинами для процессированной и непроцессированной форм.

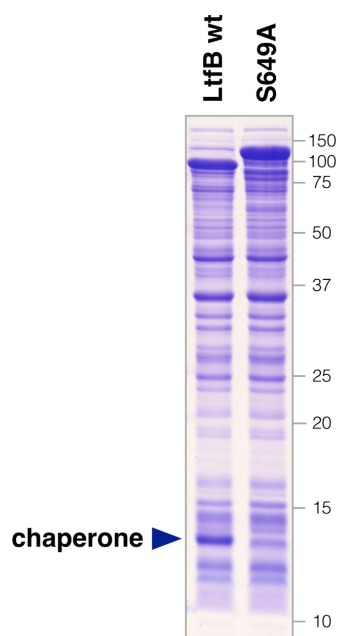


Рис. 25. Автокаталитический процессинг белка LtfB фага DT571/2. Мутация S649A нарушает предсказанный сайт автокаталитического процессинга (рисунок любезно предоставлен Н. Прохоровым).

6.3.3 Роль гена *lftA* в детерминации хозяйской специфичности бактериофагов DT57C и DT571/2

Дивергентные области генов *lftA* и *lftB* фагов DT57C и DT571/2 клонировали вместе с фланкирующими последовательностями (Рис. 22), которые идентичны у обоих фагов в вектор pGem-T для получения плазмид *plftA-7C*, *plftA-71/2*, *plftB-7C*, *plftB-71/2*. Клетки *E. coli* С600 трансформировали этими плазмидами и трансформанты использовали в качестве хозяев для получения фаговых частиц фагов DT57C и DT571/2.

Отбор рекомбинантов проводили путём посева на гетерологичных хозяевах (то есть *E. coli* 4S для фага DT571/2, и *E. coli* HS1/2 для фага фага DT57C). Такие рекомбинанты были обнаружены с плазмидами *plftA-7C* (для фага DT571/2) и *plftA-71/2* (для фага DT57C) с частотой около 10^{-4} .

Культивирование в присутствии с плазмид *pltfB-7C* и *pltfB-71/2*, не привело ни к каким изменениям спектра хозяев.

Рекомбинанты очищали путём повторной изоляции единичных бляшек и тестировали на обоих хозяйских штаммах, упомянутых выше. Было показано, что они утратили способность образовывать бляшки на хозяйских штаммах используемых для исходных фагов, но приобрели способность инфицировать хозяина фаго-донора последовательности *ltfA*.

Секвенирование генов *ltfA* из двух рекомбинантных фаговых клонов показало, что в была передана только часть дивергентной нуклеотидной последовательности, что указывает на то, что область определяющая специфичность хозяина уже, чем весь расходящийся С-концевой участок (Рис. 26). Интересно, что последовательность идентифицированного сайта распознавания рецептора белка *LtfA* фага DT57C соответствует 82% идентичности аминокислотной последовательности белка из бактериофага *phiKT* (*podovirus*), ранее выделенного нами с той же лошади (наши неопубликованные данные, см. GenBank NC_019520.1 для последовательности генома). Это наблюдение хорошо согласуется с способностью фага *phiKT* расти на клетках *E.coli* 4S (Knirel et al. 2015).

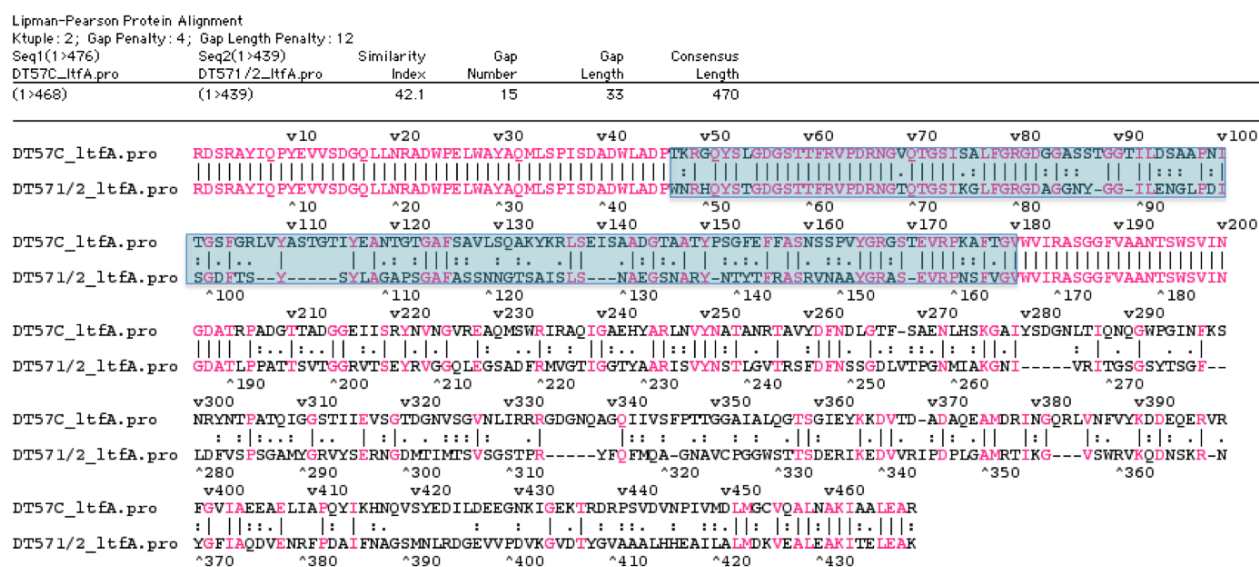


Рис.26. Выравнивание последовательностей С-концевой области белка *LtfA* (*ltfA*) бактериофага DT57C и фага DT571/2. Голубым выделен участок, передача которого при рекомбинации приводит к переключению спектра хозяев фага.

6.3.4 *LtfA* мутанты

Нами был обнаружен спонтанный мутант бактериофага DT57C, который потерял способность формировать бляшки на штамме *E. coli* 4S, однако продуцировал зону подавления роста газона клеток при проведении капельного теста, в случае если концентрация лизата была выше 10^8 б.о.е./мл (табл. 2). Такой же фенотип наблюдался и при тестировании мутанта на штамме *E. coli* HS3-104, который чувствителен к фагам DT57C и DT571/2. Секвенирование генома мутантного фага показало делецию трёх нуклеотидов в рамке, которая привела к удалению аминокислотного остатка 198 (Ala) в белке LtfA. Рекомбинация с плазмидой, содержащей дикий тип последовательности этого региона, восстановила способность фага нормально инфицировать штаммы *E. coli* 4S и HS3-104.

Мы пытались получить мутантов фага DT571/2 по продукции белка LtfA, проводя рекомбинацию с плазмидой содержащую мутантную последовательность (содержащую амбер-кодон). Фаги, у которых наблюдался ожидаемый фенотип (потеря способности инфицировать хозяина *E. coli* HS1/2), при проверке ожидаемой мутации с помощью ПЦР дали отрицательный результат. В контрольном эксперименте, мы перенесли зубочистками несколько сотен бляшек, полученных в результате титрования фага дикого типа на газоне штамма *E. coli* C600 на газон штамма *E. coli* HS1/2. Было обнаружено, что около 30% клонов спонтанно потеряли способность инфицировать этого хозяина. Таким образом при культивировании фагов DT57C и DT571/2 на штамме *E. coli* C600, не имеющим на своей поверхности O-антигена, мутации в генах *ltf* возникают и/или отбираются с неожиданно высокой эффективностью.

При проведении рекомбинации с плазмидной конструкцией (pGem-T *ltfA* S23am) в клетках штамма *E. coli* HS1/2 мы смогли снизить фон спонтанных мутаций и отобрать фаг, содержащих мутацию *ltfA* S23am. Этот мутант не способен расти на *E. coli* HS1/2 и *E. coli* HS3-104, однако сохранил способность образовывать бляшки на штамме *E. coli* C600 и мутантах *E. coli*

4S не продуцирующих О-антигена (Табл. 4). Оказалось, что присутствие белка LtfA имеет важное значение для инфицирования как штамма HS1/2, так и HS3-104. При этом, как выяснилось позже, в отличие от штамма HS1/2 для роста на *E. coli* HS3-104 тип рецептор-связывающего домена белка LtfA не имеет значения.

6.3.5 Функция белка LtfB

Рекомбинация изучаемых бактериофагов с плазмидами pltfB-7C и pltfB-71/2, содержащими дивергентный участок гена *ltfB* и консервативные фланки, не привела к появлению вирусов с изменённым спектром хозяев. Это свидетельствует о том, что дивергентная часть белка LtfB не важна для узнавания хозяйской клетки. Данный результат был ожидаем, поскольку различающийся участок аминокислотной последовательности находится в N-концевой части белка. Для того чтобы установить функцию белка LtfB мы сконструировали мутант фага DT571/2 не имеющего функционального белка LtfB. Изначально фенотип этого мутанта не мог быть предсказан, поэтому отбор рекомбинантов проводили с помощью ПЦР –тестирования отдельных бляшек бактериофага на наличие рекомбинантных генов. В результате необходимый мутантный клон DT571/2 *ltfB* Q45opal был идентифицирован, очищен, подтверждён секвенированием гена *ltfB* и исследован на диапазон хозяйской специфичности. Этот мутант потерял способность расти на штамме *E. coli* HS3-104 (Табл. 4; наблюдаемая ЕОР около 10^{-5} связана с возникновением ревертантов), однако образовывал маленькие мутные бляшки на газоне из штамма *E. coli* HS1/2 с эффективностью посева около 10^{-1} по отношению к штамму С600. Интересно, что эта величина снижалась в 100-1000 раз после очистки лизата бактериофага центрифугированием в градиенте хлорида цезия. Секвенирование гена *ltfA* у данного мутанта не выявило никаких изменений. Таким образом, инактивация гена *ltfB* у фага DT571/2 приводит к снижению его жизнеспособности (Табл. 4) при посеве на штамм HS1/2

продуцирующий О-антиген типа O87, а на штамме *E. coli* HS3-104 (O81) он перестаёт размножаться совсем. В то же время *ltaA* мутант полностью теряет способность расти на обоих этих штаммах. Инактивация фибриллы LtfB не приводит к изменениям эффективности роста ни на лабораторных штаммах (*E. coli* C600, BL21), ни на мутантных штаммах *E. coli* 4SR и 4SI. Эти результаты позволяют предполагать, что функция LTF не является необходимой при инфицировании данных штаммов. Электронная микроскопия фага DT571/2 *ltaB opal* показала полное отсутствие каких-либо латеральных хвостовых фибрилл (Рис. 27). При этом морфология фага DT571/2 *ltaB opal* не отличалась от морфологии вириона *ltaA am*.

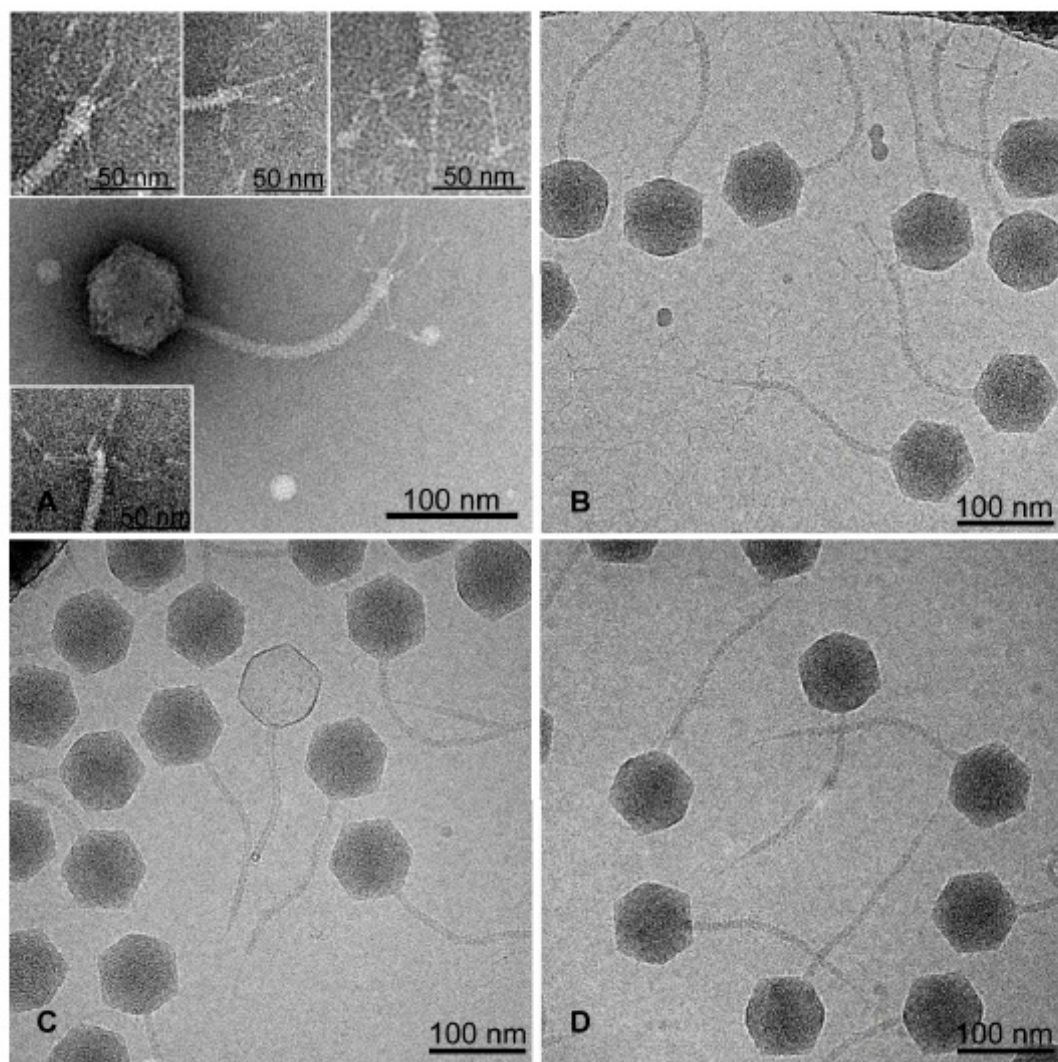


Рис. 27. Морфология фага DT571/2 и его *lta* мутантов. А. дикий тип негативное окрашивание; В. дикий тип крио-ЭМ; С. *ltaA* крио-ЭМ; D. *ltaB* крио-ЭМ. (Электронные микрофотографии получены др-ом R.C. Guerrero-Ferreira в EPFL, Лозанна, Швейцария).

Этот результат свидетельствует, что большая часть вирусных частиц в очищенном препарате фага, использованном для микроскопии, не несёт LTF, что согласуется с выше приведёнными данными по эффективности посева.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что белок LtfB необходим для распознавания рецептора на клетках HS3-104 (O81), тогда как LtfA для узнавания поверхности клеток штаммов 4S (O22) или HS1/2 (O87) у фагов DT57C или DT571/2 соответственно. В то же время отсутствие синтеза белка LtfB приводит к нестабильности фибриллы, сформированной LtfA по-видимому из-за того, что сайт присоединения LtfB остаётся свободным.

6.4 Анализ ЛПС штамма *E. coli* HS3-104, 4S и HS1/2

Чтобы выяснить природу рецептора LtfB, мы очистили ЛПС штамма *E. coli* HS3-104 и сравнивали его с ЛПС из штаммов *E. coli* 4S, O22 и HS1/2 (Рис. 28).

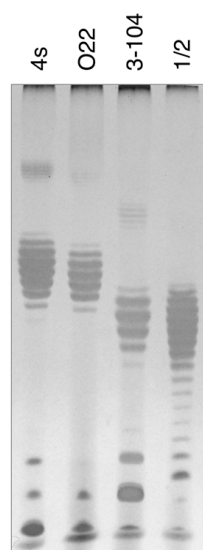


Рис. 28 Электрофорез в полиакриламидном геле ЛПС экстрагированных из штаммов *E. coli* 4S (O22-подобный), O22, HS3-104 (O81-подобный) и HS1/2 (O87-подобный).

Результаты показывают, что *E. coli* HS3-104 продуцирует поверхностные полисахариды и профиль ЛПС HS3-104, значительно отличается от других штаммов. Тип O-антигена штамма отличается от штамма 4S или HS1/2. Мы амплифицировали генный кластер синтеза поверхностных полисахаридов

(ППС) с помощью ПЦР, как было описано ранее (Coimbra *et al.* 2000), и частично секвенировали его с тех же праймеров. Поиск по базе данных NCBI BLASTn показал, что полученные последовательности очень близки к генному кластеру синтез ППС *E. coli* O81. Следовательно, у штамма HS3-104 тип ППС O81, вероятно, эти молекулы и являются рецептором, распознаваемым LtfB. С помощью прямого ЯМР-анализа были получены структуры ППС ранее неизученной серогруппы *E. coli* O81 и структурно связанных ППС штамма *E. coli* HS3-104 (Рис. 29). Генный кластер O81-антигена присутствовал в обоих штаммах и соответствовал структуре ППС *E. coli* O81, также характерной для основной цепи ППС штамма HS3-104. Структура O-антигена HS3-104 в целом воспроизводит структуру O81, но при этом имеется заметное отличие в виде дополнительного гликозилирования боковой цепи. Ферменты, катализирующие этот процесс, расположены вне генного кластера O-антигена (Zdrovenko *et al.* 2018).

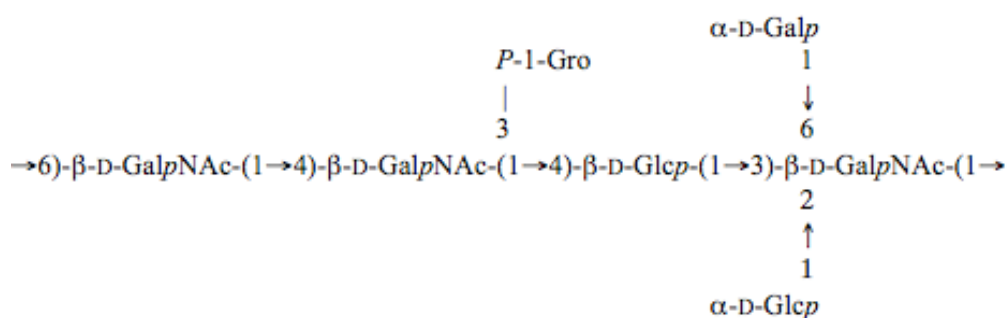


Рис. 29. Структура O-АГ серогруппы O81 *E. coli* HS3-104 полученная с помощью ЯМР анализа.

Анализ ЛПС штаммов *E. coli* 4S и HS1/2 проводили по такому же принципу, что и у штамма HS3-104. С помощью прямого ЯМР-анализа была получена структура ППС штамма HS1/2, которая была идентична серогруппе *E. coli* O87 (Zdrovenko *et al.* 2015) (Рис. 30). O-антиген штамма *E. coli* 4S схож с O-антигеном *E. coli* O22, но дополнительное гликозилирование повторяющегося звена делает данную структуру уникальной (Knirel *et al.* 2015).

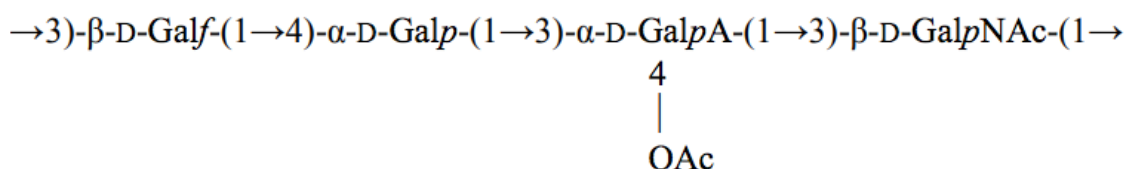


Рис. 30. Структура О-АГ серогруппы O87 *E. coli* HS1/2 полученная с помощью ЯМР анализа.

Инкубация препаратов ЛПС из штаммов *E. coli* 4S и HS1/2 с фаговыми частицами не приводила к уменьшению титра бактериофага. Деградация цепей О-антигена не обнаруживалась (ДСН-ПААГ), что указывает на то, что фибриллы не обладают ферментативной активностью. Эти результаты согласуются с нашим заключением, что ЛПС являются первичными рецепторами для фагов DT57C и DT571/2, но не вызывает инъекции ДНК из вирионов.

Было показано, что адсорбция фага DT57C на *E. coli* HS3-104 мутантных по гену *VtuB* на первых минутах происходит достаточно эффективно, однако после пятой минуты наступает равновесие между клетками-хозяина и фага. Эти результаты подтверждают, что взаимодействие с ЛПС происходит при отсутствии конечного рецептора и оно обратимо.

6.5 Высокий уровень генетической изменчивости локуса *ltf*

С-концевые области генов *ltfA* и *ltfB* наших фагов содержат протяжённые участки гомологии на нуклеотидном уровне. Это сходство более ярко выражено у фага DT57C (Рис. 23), но присутствует и у DT571/2. Данные участки гомологии перемежаются с сильно различающимися фрагментами, очевидно отвечающими за формирование различных рецептор-связывающих центров данных белков. Тем не менее, наличие длинных прямых нуклеотидных повторов в генах *ltfA* и *ltfB* позволяет ожидать, что локус *ltf* может быть генетически не стабильным из-за частых рекомбинаций между этими повторами. Эта нестабильность особенно

должна быть выражена у фага DT57C, так как уровень гомологии между двумя генами LTF у него выше.

Соответствующее событие было зафиксировано нами при определении последовательности *ltf* локуса фага DT530, который принадлежит к той же серии изолятов, что и фаги DT57C и DT571/2. Этот вирус мы культивировали в нашей лаборатории на штамме *E. coli* C600 с момента его изоляции в 2006 году. Последовательность локуса *ltf* была почти идентична последовательности фага DT57C, однако в ней наблюдается делеция большого участка, приведшая к объединению генов *ltfA* и *ltfB* в одну ORF. По видимому, эта делеция произошла в результате гомологической рекомбинации между идентичными последовательностями в генах *ltfA* и *ltfB* и затем произошёл отбор данного мутанта в следствие длительного культивирования на лабораторном штамме *E. coli* C600. Мы повторно очистили фаг DT530 из первичного лизата, сохранившегося в коллекции, и повторно секвенировали его локус *ltf*. Последовательность была очень близка к локусу *ltf* фага DT57C и содержала два отдельных гена *ltfA* и *ltfB*. Первоначально секвенированный делеционный мутант фага DT530 был назван DT530 (1), а имя DT530 было присвоено родительскому штамму, содержащему полноценные гены боковых фибрилл. У фага DT530(1) объединение фрагментов генов *ltfA* и *ltfB* в одну химерную рамку считывания приводит, по-видимому, к нарушению сборки или стабильности LTF в результате чего функциональная фибрилла присутствует лишь у отдельных частиц. Это может объяснить очень слабый рост бактериофага на штамме *E. coli* HS3-104.

Мы решили, что с высокой вероятностью могут существовать супрессорные мутации, стабилизирующие LTF, которые состоят из химерного белка LtfA-LtfB, возникающего в результате делеций. Для этого мы перенесли около 200 бляшек фага DT571/2 *ltfB opal* выращенного на штамме *E. coli* C600 на газоны с *E. coli* HS3-104 и HS1/2. В результате были получены бляшки, которые давали хороший рост на штамме *E. coli* HS3-

104, при этом не инфицировали клетки штамма HS1/2. Этот штамм фага назвали DT571/2-ABF.

Фаговый мутант DT571/2-ABF очищали путём повторной изоляции бляшек и подтверждали его фенотип. Мутантный фаг продуцирует нормальные бляшки на *E. coli* HS3-104. Секвенирование локуса *ltf* показало делецию большого участка от 71916 до 74004 н. п. (координаты даны по исходной последовательности DT571/2), что приводит к соединению аминокислотных остатков 1-663 белка LtfA и аминокислотных остатков 288-767 LtfB, формируя единую полипептидную цепь (Рис. 20). В фрагменте, происходящем из белка LtfA у фага DT571/2-ABF также имеется тандемная дупликация мотива из 19 а.к. (VDSALADKADIATTYTKME). Эта дупликация располагается сразу после области гомологичной белку gp14 фага phiEco32, который как мы предполагаем, формирует контакт с фибриллой LtfB. Таким образом, мы можем предположить, что дублирование этого небольшого участка имеет компенсаторный эффект и приводит к стабилизации химерной фибриллы с рецептор-узнающим участком из белка LtfB. Независимо от механизма стабилизации фибриллы, фенотип фага DT571/2-ABF полностью соответствует нашим заключениям о специфичности белков LtfA и LtfB.

Самопроизвольная конверсия двухгенного локуса *ltf* в моногенный, происходящая с высокой частотой, с одной стороны, и превалирование двухгенного варианта у полевых изолятов с другой, свидетельствуют о том, что в природном местообитании имеется селективное давление, поддерживающее двухгенную организацию. По-видимому, это давление связано с тем, что высокое внутривидовое разнообразие популяции *E. coli* в кишечнике лошадей (Golomidova et al. 2007, Isaeva et al. 2010) уменьшает долю клеток, восприимчивых к инфекции и делает расширение спектра хозяев за счёт одновременной экспрессии двух разных рецептор-узнающих белков адаптивным для вируса.

6.6 Модель стратегии адсорбции T5-подобных бактериофагов

Суммируя полученные результаты, мы можем заключить, что белки LtfA и LtfB необходимы для роста фагов на хозяевах, производящих ЛПС, но не требуется для штаммов лишённых O-антигена или имеющих разреженный/не плотный слой ЛПС. Результаты исследований показывают, что рецепторами для LtfA являются O-полисахариды штаммов *E. coli* 4S O22-подобные (для фага DT57C) или HS1/2 серотипа O87 (для фага DT571/2), а LtfB – O-ПС серотипа O81 штамма HS3-104 (для обоих фагов). Белки LtfA и LtfB образуют разветвлённую латеральную фибриллу, присоединение которой к вириону опосредовано N-концевым доменом LtfA. Белок LtfA способен выполнять свою функцию и в отсутствие LtfB, однако сформированная им фибрилла оказывается нестабильной при вакантном участке связывания LtfB.

В то же время оказалось, что нестабильность фибриллы, лишённой LtfB может быть преодолена за счёт как минимум одной компенсаторной мутации, представляющей собой тандемную дубликацию последовательности из 19 а.к. белке LtfA, расположенной в районе предполагаемого сайта связывания LtfB. Это делает возможным спонтанную конверсию двухгенной структуры локуса *ltf* в моногенную в результате рекомбинации по прямым повторам (гомологичным последовательностям) в генах *ltfA* и *ltfB* с образованием химерного гена *ltf*, кодирующего белок с рецептор-связывающим доменом из LtfA (Рис. 20).

На основании полученных нами данных мы сформулировали модель стратегии инфекции наших фагов при росте на O-антиген-продуцирующих штаммах хозяев (Рис. 31).

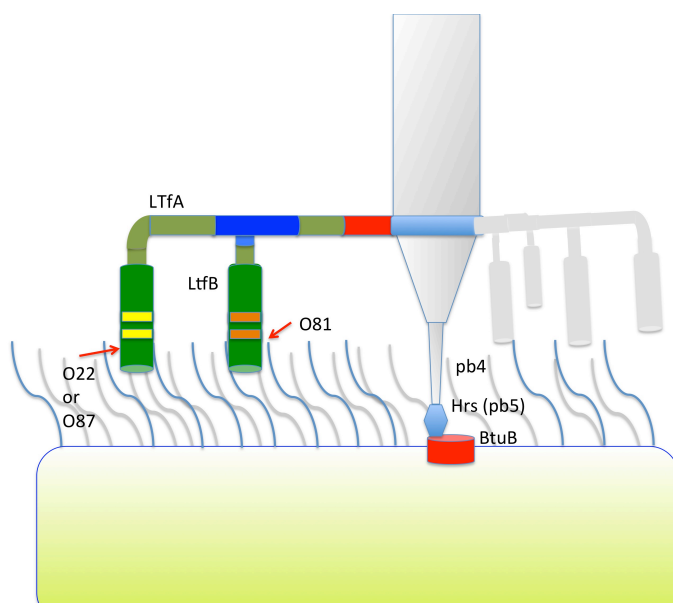


Рис. 31 Модель стратегии адсорбции фагов DT57C и DT571/2 на O-антиген продуцирующем хозяине (цит. по Golomidova et al. 2016).

В соответствии с этой моделью взаимодействие LTF с О-ПС хозяина за счёт любого из рецептор-узнающих сайтов (LtfA или LtfB) закрепляет вирион на поверхности клетки. При этом не возникает никакого сигнала или трансформации структуры вирусной частицы, то есть данное взаимодействие является полностью (потенциально) обратимым. По-видимому, длительное удержание вириона на поверхности оказывается достаточным для успешного проникновения иглообразной осевой фибриллы (pb4), несущей рецептор-связывающий белок pb5 (*Hrs*) через слой О-ПС или его локальные дефекты. Связывание pb5 с конечным рецептором (BtuB) индуцирует перестройку частицы и начало транспорта ДНК в клетку хозяина.

Эта модель согласуется с ранее опубликованными данными по фагу T5 (Heller and Braun 1979, 1982), однако в отличие от T5, который может расти на штамме *E. coli* F продуцирующем ППС даже без LTF, хотя и менее эффективно (Heller and Braun 1982), наши изоляты строго зависят от нормального функционирования LTF для инфицирования их хозяйских штаммов. Результаты Heller, K. et al. (Heller and Braun 1982) можно

объяснить тем, что плотность О-ПС на поверхности использованных ими клеток могла быть недостаточна для полного экранирования рецептора (FhuA) от T5 фагов и их мутантов по гену *lrf*. Так же это расхождение может говорить о том, что эффективность защиты поверхности наружной мембраны исследованными нами типами О-антигена (O22, O87, O81) намного выше, чем эффективность линейного полиманнозного О-ПС, изученного Heller and Braun (Heller and Braun 1979, 1982) (Рис. 11).

Описанная нами разветвлённая организация LTF не могла быть подтверждена прямой визуализацией, хотя она в целом согласуется с морфологией LTF фагов дикого типа (морфология DT57C и DT571/2 была идентична Рис. 27), которая выглядит более сложной, чем “обычные” LTF фага T5 (Zivanovic et al. 2014) (Рис. 16). В то же время разветвленная организация LTF в наших фагах логично следует из совокупности существующих на данный момент биоинформатических и генетических данных.

Насколько нам известно, о такой организации хвостовых фибрилл у фагов семейства *Siphoviridae* ранее не было описано. Разветвленные хвостовые шипы были описаны у колифагов K1E и K1-5 (*Podoviruses*) (Leiman et al. 2007) и у Vi-I-подобных бактериофагов (*Myoviruses*) (Adriaenssens et al. 2012, Kutter et al. 2011) и предполагается, что данная организация необходима для расширения хозяйского спектра вирусов. При изучении бактериофага G7C мы наблюдали у данного вируса организацию разветвлённых адгезинов (Kulikov et al. 2012). В этом фаге белок gp 63.1 взаимодействует с gp 66, а последний присоединён к вириону. Действие обоих белков требуется для необратимой адсорбции фага (Prokhorov et al. 2017).

Как упоминалось выше, часть T5-подобных отсекуированных бактериофагов, имеют двухгенную организацию локуса *lrf*, аналогичную DT57C или DT571/2, что указывает на то, что наличие разветвлённых адгезинов имеет важное экологическое значение для этой группы вирусов.

Эта гипотеза согласуется с наблюдением очень частых потерь LTF при культивировании фага на лабораторных штаммах без O-антигена, а также с обнаруженным спонтанным переключением на моногенную структуру (Рис. 20). Распространённость в природе T5-подобных фагов, содержащих разветвлённые LTF, многие из которых имеют разветвлённые LTF, свидетельствует о сильном стабилизирующем отборе для этих структур.

Фибриллярные адгезины бактериофагов давно известны как генетически пластичные структуры, которые могут легко меняться в ходе эволюции вирусов (Sandmeier *et al.* 1992, Trojet *et al.* 2011). Было также показано, что фибриллы бактериофагов являются первичными местами накопления мутаций в лабораторных экспериментах по ко-эволюции фаг-хозяин (Scanlan *et al.* 2011), что свидетельствует о том, что мутации в этих белках могут оказывать сильное влияние на жизнеспособность вируса. В то же время для многих сифовирусов таких как T5-подобные (Heller and Braun 1982) или λ -подобные (Gallet *et al.* 2009), было показано, что боковые хвостовые фибриллы не являются необходимыми для инфицирования лабораторных штаммов. Более того, удаление хвостовых фибрилл может повысить пригодность фага в отношении скоростей диффузии в диффузионно-ограничивающих средах, таких как агарозный гель (Gallet *et al.* 2009), что приводит к более быстрому распространению фагового потомства из первых лизированных клеток, так же возможны иные способы ограничения, способные снизить эффективность адсорбция на ближайших клетках-хозяевах, присутствующих в среде. Это противоречие можно объяснить тем, что в естественных экосистемах, где плотность хозяев намного ниже, повышенная скорость адсорбции может обеспечить фагу значительное преимущество при отборе, что облегчает быструю эволюцию фибрилл, которые часто отвечают за обратимое связывание на стадии адсорбции. В соответствии с этим предположением, распознавание рецепторов по средствам LTFs считается менее специфичным, чем конечное взаимодействие осевой фибриллы с соответствующим рецептором

приводящее к инфекции хозяйской клетки. Фактически, LTFs бактериофага T5 распознают полиманозные цепи, тем самым обеспечивают довольно быстрое, но неспецифическое присоединение к клеткам-хозяевам, продуцирующим этот ЛПС (Heller and Braun 1982).

В экосистеме толстого отдела кишечника лошадей разнообразие штаммов *E. coli* чрезвычайно велико. В образцах, которые мы использовали для выделения серии T5-подобных фагов, было установлено, что в образцах фекалий насчитывается примерно 700-1000 генетически отличающихся штаммов *E. coli* (Golomidova et al. 2007, Isaeva et al. 2010). Доля от общей колиформной популяции, которая может служить хозяином для любого данного бактериофага, может быть ограничена 2% или менее (Golomidova et al. 2007). В этих условиях плотность доступных хозяев может быть довольно низкой (10^3 - 10^4 КОЕ на 1 мл содержимого кишечника), при этом повышенная скорость адсорбции может в значительной степени обеспечить стабильность популяции фагов в кишечнике, препятствуя снижению уровня производства фагового потомства ниже скорости вымывания.

Как было показано Lenski и Levin (Bohannan and Lenski 2000, Lenski 1984), *E. coli* В могут стать устойчивыми к фагу T5 в лабораторных условиях из-за мутаций в белке FhuA, который служит вторичным рецептором для фага T5 (Bohannan and Lenski 2000) практически не теряя при этом приспособленности. Мутанты по вторичному рецептору VtuB также были отобраны в наших экспериментах к бактериофагу DT571/2 на штаммах без O-антигена.

Тем не менее, в природных экосистемах, таких как кишечник лошади, неспецифическая резистентность, основанная на защите рецепторов поверхностными структурами клеток, включая ЛПС, по-видимому, преобладает над мутационными изменениями рецептора VtuB при защите бактерий от инфекции T5-подобными фагами. Это различие можно объяснить тем, что в кишечнике лошади разнообразие колифагов довольно велико (Golomidova et al. 2007), а влияние T5-подобных фагов не может

быть отделено от воздействия других вирусов. Вместо модификации FhuA или VtuB, которые могут быть наиболее благоприятным ответом на инфекцию T5-подобными фагами в экспериментах *in vitro*, более выгодно для бактерий *in vivo* отвечать на такое взаимодействие посредством модификации наружных полисахаридных защитных структур, что, в свою очередь, стимулирует увеличение разнообразия LTF T5-подобных бактериофагов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важным следствием из нашей модели инфекции T5-подобными бактериофагами является то, что единственной функцией LTF является связывание с первичным рецептором (в случае наших вирусов О-антигеном), при этом никаких ограничений на способ этого взаимодействия не накладывается. Более того, ингибирование адсорбции фага очищенными ЛПС, наблюдаемое в наших экспериментах, было незначительным (в отличие от результатов Heller K. и Braun V. 1979 (Heller and Braun 1979)). Низкое сродство к первичному рецептору может указывать на то, что проникновение фага к его вторичному рецептору при первоначальном взаимодействии с клеткой является довольно быстрым процессом, и слишком длительное удерживание вириона на поверхности клетки-хозяина, опосредуемое только LTF, не требуется для инфекции. Это создаёт возможность достаточно простой искусственной манипуляции спектром хозяев T5-подобных бактериофагов, в частности для использования их в качестве агентов фаговой терапии нового поколения. Так, например, *E. coli* отвечает за более, чем 50% урологических инфекций. Уропатогенные штаммы *E. coli* (штаммам UPEC) отличаются большим разнообразием О-антигенов, что затрудняет подбор фагов с широким спектром действия. Искусственная модификация спектров хозяев одного или нескольких фагов-платформ могла бы позволить таргетировать их к различным UPEC, при этом фаг-платформа может быть всесторонне исследован (и модифицирован) для обеспечения его безопасности и улучшения параметров фармакокинетики (Barbu *et al.* 2016, Malik *et al.* 2017).

Наши данные позволяют предположить, что для модификации спектра хозяев можно проводить замену фрагментов рецептор-узнающих доменов белков LtfA и LtfB на фрагменты из структурно-сходных доменов, которые весьма распространены у различных бактериофагов, включая профаги в штаммах с известными типами О-антигена, так и использовать

гетерологичные рецептор-связывающие домены из фибриллярных адгезинов любых бактериофагов.

Ограничением подобного подхода является небольшое число типов вторичных рецепторов, распознаваемых колифагами, родственными T5. Сейчас в качестве таких рецепторов известны только белки FhuA, FerA и VtuB (Etz *et al.* 2001, Rabsch *et al.* 2007). При этом взаимодействие pb5 с соответствующим рецептором является достаточно сильным и вызывает перестройку вириона и инъекцию ДНК. В этой связи приобретают особую актуальность исследования биоразнообразия T5-подобных фагов с целью поиска новых типов pb5, узнающих другие рецепторы, а также экспериментальное изучение возможности замены рецептор-узнающего белка осевой фибриллы T5-подобных фагов на гетерологичные белки или домены, способные выполнять аналогичную функцию.

ВЫВОДЫ

1. Полученные в работе бактериофаги DT57C и DT571/2 являются представителями нового вида в составе рода *T5virus* подсемейства *Tunavirinae* семейства *Siphoviridae* порядка *Caudovirales*, что подтверждается сравнительным анализом их геномных последовательностей с другими представителями рода *T5virus*.
2. Первичным рецептором изученных фаговых изолятов (DT57C и DT571/2) являются O-антигены бактерий-хозяев. Конечным рецептором является белок внешней мембраны VtuB.
3. Впервые показано, что латеральные хвостовые фибриллы (LTF) изученных фагов, имеют разветвлённую структуру и состоят из двух белков – LtfA и LtfB. Ранее такая структура не была описана у T5-подобных бактериофагов.
4. Распознавание рецепторов LTF является критически необходимым для инфицирования клеток, продуцирующих O-антигены серотипов. При этом белок LtfA специфичен по отношению к O-антигенам серогрупп O87 или O22 (у фагов DT57C и DT571/2 соответственно), а белок LtfB распознает O-антиген серогруппы O81.
5. Двухгенный локус *ltf* генетически нестабилен и склонен к самопроизвольной конверсии в моногенную организацию, при этом у полевых фаговых изолятов преобладает двухгенная организация, что свидетельствует о наличии в природном местообитании отбора на расширение спектров хозяев.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abedon S.T. 2008. *Bacteriophage ecology: population growth, evolution and impact of bacterial viruses*. Vol. 15: Cambridge University Press: 463.
2. Abedon S.T. 2014. Phage therapy: eco-physiological pharmacology. *Scientifica (Cairo)* 2014:29. doi: 10.1155/2014/581639.
3. Ackermann H.W. 1998. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. *Adv Virus Res* 51:135-201.
4. Ackermann H.W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol* 154 (4):245-51. doi: 10.1016/S0923-2508(03)00067-6.
5. Ackermann H.W. 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* 152 (2):227-43. doi: 10.1007/s00705-006-0849-1.
6. Ackermann H.W. and DuBow M.S. 1987. Viruses of Prokaryotes. In *General properties of bacteriophages*, 216. Boca Raton, USA: CRC press.
7. Adriaenssens E.M., Ackermann H.W., Anany H., Blasdel B., Connerton I.F., Goulding D., Griffiths M.W., Hooton S.P., Kutter E.M., Kropinski A.M., Lee J.H., Maes M., Pickard D., Ryu S., Sepehrizadeh Z., Shahrabak S.S., Toribio A.L. and Lavigne R. 2012. A suggested new bacteriophage genus: "Viunaliikevirus". *Arch Virol* 157 (10):2035-46. doi: 10.1007/s00705-012-1360-5.
8. Al-Badr A. and Al-Shaikh G. 2013. Recurrent urinary tract infections management in women: a review. *Sultan Qaboos Univ Med J* 13 (3):359-67.
9. Allocati N., Masulli M., Alexeyev M.F. and Di Ilio C. 2013. Escherichia coli in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health* 10 (12):6235-54. doi: 10.3390/ijerph10126235.
10. Anantharaman V., Koonin E.V. and Aravind L. 2002. SPOUT: a class of methyltransferases that includes spoU and trmD RNA methylase superfamilies, and novel superfamilies of predicted prokaryotic RNA methylases. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4 (1):71-5.
11. Andersson A.F. and Banfield J.F. 2008. Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science* 320 (5879):1047-50. doi: 10.1126/science.1157358.
12. Atanasiu C., Su T.J., Sturrock S.S. and Dryden D.T. 2002. Interaction of the ocr gene 0.3 protein of bacteriophage T7 with EcoKI restriction/modification enzyme. *Nucleic Acids Res* 30 (18):3936-44.
13. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L. and Mori H. 2006. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2:2006 0008. doi: 10.1038/msb4100050.
14. Baker J.R., Dong S. and Pritchard D.G. 2002. The hyaluronan lyase of Streptococcus pyogenes bacteriophage H4489A. *Biochem J* 365 (Pt 1):317-22. doi: 10.1042/BJ20020149.
15. Barbu E.M., Cady K.C. and Hubby B. 2016. Phage therapy in the era of synthetic biology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8 (10). doi: 10.1101/cshperspect.a023879.

16. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A. and Horvath P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315 (5819):1709-12. doi: 10.1126/science.1138140.
17. Bingham R., Ekunwe S.I., Falk S., Snyder L. and Kleanthous C. 2000. The major head protein of bacteriophage T4 binds specifically to elongation factor Tu. *J Biol Chem* 275 (30):23219-26. doi: 10.1074/jbc.M002546200.
18. Bohannan B.J.M. and Lenski R.E. 2000. The relative importance of competition and predation varies with productivity in a model community. *Am Nat* 156 (4):329-340. doi: 10.1086/303393.
19. Böhm J., Lambert O., Frangakis A.S., Letellier L., Baumeister W. and Rigaud J.L. 2001. FhuA-mediated phage genome transfer into liposomes: a cryo-electron tomography study. *Current Biology* 11 (15):1168-1175.
20. Bondy-Denomy J., Pawluk A., Maxwell K.L. and Davidson A.R. 2013. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* 493 (7432):429-32. doi: 10.1038/nature11723.
21. Boulanger P., Jacquot P., Plancon L., Chami M., Engel A., Parquet C., Herbeuval C. and Letellier L. 2008. Phage T5 straight tail fiber is a multifunctional protein acting as a tape measure and carrying fusogenic and muralytic activities. *J Biol Chem* 283 (20):13556-64. doi: 10.1074/jbc.M800052200.
22. Boulanger P., le Maire M., Bonhivers M., Dubois S., Desmadril M. and Letellier L. 1996. Purification and structural and functional characterization of FhuA, a transporter of the Escherichia coli outer membrane. *Biochemistry* 35 (45):14216-24. doi: 10.1021/bi9608673.
23. Braun V. 1995. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS microbiology reviews* 16 (4):295-307.
24. Braun V., Killmann H. and Benz R. 1994. Energy-coupled transport through the outer membrane of Escherichia coli small deletions in the gating loop convert the FhuA transport protein into a diffusion channel. *FEBS Lett* 346 (1):59-64.
25. Braun V., Killmann H. and Herrmann C. 1994. Inactivation of FhuA at the cell surface of Escherichia coli K-12 by a phage T5 lipoprotein at the periplasmic face of the outer membrane. *J Bacteriol* 176 (15):4710-7.
26. Breyton C., Flayhan A., Gabel F., Lethier M., Durand G., Boulanger P., Chami M. and Ebel C. 2013. Assessing the conformational changes of pb5, the receptor-binding protein of phage T5, upon binding to its Escherichia coli receptor FhuA. *J Biol Chem* 288 (42):30763-72. doi: 10.1074/jbc.M113.501536.
27. Brussow H. and Hendrix R.W. 2002. Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 108 (1):13-6.
28. Calendar R. 2012. *The bacteriophages*. Vol. 1: Springer Science & Business Media: 596.
29. Canchaya C., Fournous G., Chibani-Chennoufi S., Dillmann M.L. and Brussow H. 2003. Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* 6 (4):417-24.
30. Castillo F.J. and Bartell P.F. 1974. Studies on the bacteriophage 2 receptors of Pseudomonas aeruginosa. *J Virol* 14 (4):904-9.
31. Castillo F.J. and Bartell P.F. 1976. Localization and functional role of the pseudomonas bacteriophage 2 depolymerase. *J Virol* 18 (2):701-8.

32. Cerritelli M.E., Wall J.S., Simon M.N., Conway J.F. and Steven A.C. 1996. Stoichiometry and domainal organization of the long tail-fiber of bacteriophage T4: a hinged viral adhesin. *J Mol Biol* 260 (5):767-80. doi: 10.1006/jmbi.1996.0436.
33. Chatterjee S. and Rothenberg E. 2012. Interaction of bacteriophage λ with its E. coli receptor, LamB. *Viruses* 4 (11):3162-78. doi: 10.3390/v4113162.
34. Chen Y., Sun E., Song J., Tong Y. and Wu B. 2018. Three Salmonella enterica serovar Enteritidis bacteriophages from the Siphoviridae family are promising candidates for phage therapy. *Can J Microbiol*:1-11. doi: 10.1139/cjm-2017-0740.
35. Chibani-Chennoufi S., Bruttin A., Dillmann M.L. and Brussow H. 2004. Phage-host interaction: an ecological perspective. *J Bacteriol* 186 (12):3677-86. doi: 10.1128/JB.186.12.3677-3686.2004.
36. Chopin M.C., Chopin A. and Bidnenko E. 2005. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr Opin Microbiol* 8 (4):473-9. doi: 10.1016/j.mib.2005.06.006.
37. Clokie M.R., Millard A.D., Letarov A.V. and Heaphy S. 2011. Phages in nature. *Bacteriophage* 1 (1):31-45. doi: 10.4161/bact.1.1.14942.
38. Coimbra R.S., Grimont F., Lenormand P., Burguiere P., Beutin L. and Grimont P.A. 2000. Identification of Escherichia coli O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP). *Res Microbiol* 151 (8):639-54.
39. Coulton J.W., Mason P., Cameron D.R., Carmel G., Jean R. and Rode H.N. 1986. Protein fusions of beta-galactosidase to the ferrichrome-iron receptor of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* 165 (1):181-92.
40. d'Herelle F. 1921. *Le Bactériophage: Son rôle dans l'immunité*. Vol. 5: Masson et Cie, Paris.
41. d'Herelle F. 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad. Sci. Paris* 165:373-375.
42. Dalmaso M., Strain R., Neve H., Franz C.M., Cousin F.J., Ross R.P. and Hill C. 2016. Three new Escherichia coli phages from the human gut show promising potential for phage therapy. *PLoS One* 11 (6):e0156773. doi: 10.1371/journal.pone.0156773.
43. Davidson A.R., Cardarelli L., Pell L.G., Radford D.R. and Maxwell K.L. 2012. Long noncontractile tail machines of bacteriophages. *Adv Exp Med Biol* 726:115-42. doi: 10.1007/978-1-4614-0980-9_6.
44. Dellas N., Snyder J.C., Bolduc B. and Young M.J. 2014. Archaeal viruses: diversity, replication and structure. *Annu Rev Virol* 1 (1):399-426. doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085357.
45. Demerec M. and Fano U. 1945. Bacteriophage-resistant mutants in Escherichia coli. *Genetics* 30 (2):119.
46. Destoumieux-Garzon D., Duquesne S., Peduzzi J., Goulard C., Desmadril M., Letellier L., Rebuffat S. and Boulanger P. 2005. The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11-Pro16 beta-hairpin region in the recognition mechanism. *Biochem J* 389 (Pt 3):869-76. doi: 10.1042/BJ20042107.
47. Deveau H., Barrangou R., Garneau J.E., Labonte J., Fremaux C., Boyaval P., Romero D.A., Horvath P. and Moineau S. 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in Streptococcus thermophilus. *J Bacteriol* 190 (4):1390-400. doi: 10.1128/JB.01412-07.

48. Doulatov S., Hodes A., Dai L., Mandhana N., Liu M., Deora R., Simons R.W., Zimmerly S. and Miller J.F. 2004. Tropism switching in Bordetella bacteriophage defines a family of diversity-generating retroelements. *Nature* 431 (7007):476-81. doi: 10.1038/nature02833.
49. Drozd M., Piekarowicz A., Bujnicki J.M. and Radlinska M. 2012. Novel non-specific DNA adenine methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 40 (5):2119-30. doi: 10.1093/nar/gkr1039.
50. Duckworth D.H. 1987. History and basic properties of bacterial viruses. In *Phage ecology*, edited by Goyal S.M., Gerba C.P. and Bitton G., 1-44. Singapore: John Wiley and Sons.
51. Dy R.L., Richter C., Salmond G.P. and Fineran P.C. 2014. Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. *Annu Rev Virol* 1 (1):307-31. doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085500.
52. Effantin G., Boulanger P., Neumann E., Letellier L. and Conway J.F. 2006. Bacteriophage T5 structure reveals similarities with HK97 and T4 suggesting evolutionary relationships. *J Mol Biol* 361 (5):993-1002. doi: 10.1016/j.jmb.2006.06.081.
53. Endriss F. and Braun V. 2004. Loop deletions indicate regions important for FhuA transport and receptor functions in Escherichia coli. *J Bacteriol* 186 (14):4818-23. doi: 10.1128/JB.186.14.4818-4823.2004.
54. Etz H., Minh D.B., Schellack C., Nagy E. and Meinke A. 2001. Bacterial phage receptors, versatile tools for display of polypeptides on the cell surface. *J Bacteriol* 183 (23):6924-35. doi: 10.1128/JB.183.23.6924-6935.2001.
55. Everett R.D. 1981. DNA replication of bacteriophage T5. 3. Studies on the structure of concatemeric T5 DNA. *J Gen Virol* 52 (Pt 1):25-38. doi: 10.1099/0022-1317-52-1-25.
56. Ferguson A.D., Breed J., Diederichs K., Welte W. and Coulton J.W. 1998. An internal affinity-tag for purification and crystallization of the siderophore receptor FhuA, integral outer membrane protein from Escherichia coli K-12. *Protein Sci* 7 (7):1636-8. doi: 10.1002/pro.5560070719.
57. Flayhan A., Vellieux F.M., Lurz R., Maury O., Contreras-Martel C., Girard E., Boulanger P. and Breyton C. 2014. Crystal structure of pb9, the distal tail protein of bacteriophage T5: a conserved structural motif among all siphophages. *J Virol* 88 (2):820-8. doi: 10.1128/JVI.02135-13.
58. Flayhan A., Wien F., Paternostre M., Boulanger P. and Breyton C. 2012. New insights into pb5, the receptor binding protein of bacteriophage T5, and its interaction with its Escherichia coli receptor FhuA. *Biochimie* 94 (9):1982-9. doi: 10.1016/j.biochi.2012.05.021.
59. Forde A. and Fitzgerald G.F. 2003. Molecular organization of exopolysaccharide (EPS) encoding genes on the lactococcal bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658. *Plasmid* 49 (2):130-42.
60. Forsgren A. and Nordstrom K. 1974. Protein A from Staphylococcus aureus: the biological significance of its reaction with IgG. *Ann N Y Acad Sci* 236 (0):252-66.
61. Foster T.J. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 3 (12):948-58. doi: 10.1038/nrmicro1289.
62. Fraga H., Arnaud C.A., Gauto D.F., Audin M., Kurauskas V., Macek P., Krichel C., Guan J.Y., Boisbouvier J., Sprangers R., Breyton C. and Schanda P. 2017. Solid-state

- NMR H-N-(C)-H and H-N-C-C 3D/4D correlation experiments for resonance assignment of large proteins. *Chemphyschem* 18 (19):2697-2703. doi: 10.1002/cphc.201700572.
63. Gallet R., Shao Y. and Wang I.N. 2009. High adsorption rate is detrimental to bacteriophage fitness in a biofilm-like environment. *BMC Evol Biol* 9:241. doi: 10.1186/1471-2148-9-241.
 64. Garcia-Doval C., Caston J.R., Luque D., Granell M., Otero J.M., Llamas-Saiz A.L., Renouard M., Boulanger P. and van Raaij M.J. 2015. Structure of the receptor-binding carboxy-terminal domain of the bacteriophage T5 L-shaped tail fibre with and without its intra-molecular chaperone. *Viruses* 7 (12):6424-40. doi: 10.3390/v7122946.
 65. Garcia-Doval C., Luque D., Caston J.R., Boulanger P. and van Raaij M.J. 2013. Crystallization of the C-terminal domain of the bacteriophage T5 L-shaped fibre. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 69 (Pt 12):1363-7. doi: 10.1107/S1744309113028959.
 66. Garneau J.E., Dupuis M.E., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadan A.H. and Moineau S. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468 (7320):67-71. doi: 10.1038/nature09523.
 67. Glonti T., Chanishvili N. and Taylor P.W. 2010. Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* 108 (2):695-702. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04469.x.
 68. Golomidova A., Kulikov E., Isaeva A., Manykin A. and Letarov A. 2007. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions. *Appl Environ Microbiol* 73 (19):5975-81. doi: 10.1128/AEM.01145-07.
 69. Golomidova A.K., Kulikov E.E., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R.C., Ksenzenko V.N., Tarasyan K.K. and Letarov A.V. 2015. Complete genome sequences of T5-related *Escherichia coli* bacteriophages DT57C and DT571/2 isolated from horse feces. *Arch Virol* 160 (12):3133-7. doi: 10.1007/s00705-015-2582-0.
 70. Golomidova A.K., Kulikov E.E., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira Rcapital Es C., Knirel Y.A., Kostryukova E.S., Tarasyan K.K. and Letarov A.V. 2016. Branched lateral tail fiber organization in T5-like bacteriophages DT57C and DT571/2 is revealed by genetic and functional analysis. *Viruses* 8 (1). doi: 10.3390/v8010026.
 71. Grover J.M., Luna A.J., Wood T.L., Chamakura K.R. and Kutty Everett G.F. 2015. Complete genome of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T5-like Siphophage Stich. *Genome Announc* 3 (1). doi: 10.1128/genomeA.01435-14.
 72. Guo H., Arambula D., Ghosh P. and Miller J.F. 2014. Diversity-generating retroelements in phage and bacterial genomes. *Microbiol Spectr* 2 (6). doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0029-2014.
 73. Guterman S.K., Wright A. and Boyd D.H. 1975. Genes affecting coliphage BF23 and *E. coli* sensitivity in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 124 (3):1351-8.
 74. Guttman B. and Raya R. 2004. Basic Phage Biology. In *Bacteriophages: Biology and Applications*, 29-66. Boca Raton: CRC Press Florida.
 75. Hanlon G.W., Denyer S.P., Olliff C.J. and Ibrahim L.J. 2001. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through

- Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 67 (6):2746-53. doi: 10.1128/AEM.67.6.2746-2753.2001.
76. Heller K. and Braun V. 1979. Accelerated adsorption of bacteriophage T5 to *Escherichia coli* F, resulting from reversible tail fiber-lipopolysaccharide binding. *J Bacteriol* 139 (1):32-8.
 77. Heller K. and Braun V. 1982. Polymannose O-antigens of *Escherichia coli*, the binding sites for the reversible adsorption of bacteriophage T5+ via the L-shaped tail fibers. *J Virol* 41 (1):222-7.
 78. Heller K.J. 1984. Identification of the phage gene for host receptor specificity by analyzing hybrid phages of T5 and BF23. *Virology* 139 (1):11-21.
 79. Hendrix R.W. 2002. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol* 61 (4):471-80.
 80. Hendrix R.W. and Duda R.L. 1992. Bacteriophage lambda PaPa: not the mother of all lambda phages. *Science* 258 (5085):1145-8.
 81. Hill C., Miller L.A. and Klaenhammer T.R. 1991. In vivo genetic exchange of a functional domain from a type II A methylase between lactococcal plasmid pTR2030 and a virulent bacteriophage. *J Bacteriol* 173 (14):4363-70.
 82. Hinton D.M. 2010. Transcriptional control in the prereplicative phase of T4 development. *Virology* 407:289. doi: 10.1016/j.virol.2010.07.029.
 83. Hofer B., Ruge M. and Dreiseikelmann B. 1995. The superinfection exclusion gene (*sieA*) of bacteriophage P22: identification and overexpression of the gene and localization of the gene product. *J Bacteriol* 177 (11):3080-6.
 84. Hong J., Kim K.-P., Heu S., Lee S.J., Adhya S. and Ryu S. 2008. Identification of host receptor and receptor-binding module of a newly sequenced T5-like phage EPS7. *FEMS microbiology letters* 289 (2):202-209.
 85. Hong Y., Pan Y., Harman N.J. and Ebner P.D. 2014. Complete genome sequences of two *Escherichia coli* O157:H7 phages effective in limiting contamination of food products. *Genome Announc* 2 (5). doi: 10.1128/genomeA.00519-14.
 86. Huet A., Conway J.F., Letellier L. and Boulanger P. 2010. In vitro assembly of the T=13 procapsid of bacteriophage T5 with its scaffolding domain. *J Virol* 84 (18):9350-8. doi: 10.1128/JVI.00942-10.
 87. Isaeva A.S., Kulikov E.E., Tarasyan K.K. and Letarov A.V. 2010. A novel high-resolving method for genomic PCR-fingerprinting of Enterobacteria. *Acta Naturae* 2 (1):82-8.
 88. Israel J.V., Anderson T.F. and Levine M. 1967. In vitro morphogenesis of phage P22 from heads and base-plate parts. *Proc Natl Acad Sci USA* 57 (2):284-91.
 89. Jann B., Reske K. and Jann K. 1975. Heterogeneity of lipopolysaccharides. Analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Biochem* 60 (1):239-46.
 90. Jann K., Jann B., Orskov F., Orskov I. and Westphal O. 1965. Immunochemical studies of K antigens from *Escherichia coli*. II. K antigen from *E. coli* 08:K42(A):H-. *Biochem Z* 342 (1):1-22.
 91. Jennes S., Merabishvili M., Soentjens P., Pang K.W., Rose T., Keersebilck E., Soete O., Francois P.M., Teodorescu S., Verween G., Verbeken G., De Vos D. and Pirnay J.P. 2017. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas*

- aeruginosa septicaemia in a patient with acute kidney injury-a case report. *Crit Care* 21 (1):129. doi: 10.1186/s13054-017-1709-y.
92. Kaufmann G. 2000. Anticodon nucleases. *Trends Biochem Sci* 25 (2):70-4.
 93. Killmann H., Videnov G., Jung G., Schwarz H. and Braun V. 1995. Identification of receptor binding sites by competitive peptide mapping: phages T1, T5, and phi 80 and colicin M bind to the gating loop of FhuA. *J Bacteriol* 177 (3):694-8.
 94. Kim J.H., Jun J.W., Choresca C.H., Shin S.P., Han J.E. and Park S.C. 2012. Complete genome sequence of a novel marine siphovirus, pVp-1, infecting *Vibrio parahaemolyticus*. *J Virol* 86 (12):7013-4. doi: 10.1128/JVI.00742-12.
 95. Kim M. and Ryu S. 2011. Characterization of a T5-like coliphage, SPC35, and differential development of resistance to SPC35 in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 77 (6):2042-50. doi: 10.1128/AEM.02504-10.
 96. Kim M. and Ryu S. 2012. Spontaneous and transient defence against bacteriophage by phase-variable glucosylation of O-antigen in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 86 (2):411-25. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08202.x.
 97. King A., Adams M., Carstens E. and Lefkowitz E. 2012. International Committee on Taxonomy of Viruses: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press: 1327.
 98. Knirel Y.A., Prokhorov N.S., Shashkov A.S., Ovchinnikova O.G., Zdrovenko E.L., Liu B., Kostryukova E.S., Larin A.K., Golomidova A.K. and Letarov A.V. 2015. Variations in O-antigen biosynthesis and O-acetylation associated with altered phage sensitivity in *Escherichia coli* 4s. *J Bacteriol* 197 (5):905-12. doi: 10.1128/JB.02398-14.
 99. Kruger D.H., Schroeder C., Reuter M., Bickle T.A., Bogdarina I.G. and Buryanov Y.I. 1988. Use of bacterial virus T7 as a tool for the study of DNA methylation. *Gene* 74 (1):85-7.
 100. Krupovic M., Ghabrial S.A., Jiang D. and Varsani A. 2016. Genomoviridae: a new family of widespread single-stranded DNA viruses. *Arch Virol* 161 (9):2633-43. doi: 10.1007/s00705-016-2943-3.
 101. Kulikov E., Kropinski A.M., Golomidova A., Lingohr E., Govorun V., Serebryakova M., Prokhorov N., Letarova M., Manykin A., Strotskaya A. and Letarov A. 2012. Isolation and characterization of a novel indigenous intestinal N4-related coliphage vB_EcoP_G7C. *Virology* 426 (2):93-9. doi: 10.1016/j.virol.2012.01.027.
 102. Kutter E.M., Skutt-Kakaria K., Blasdel B., El-Shibiny A., Castano A., Bryan D., Kropinski A.M., Villegas A., Ackermann H.W., Toribio A.L., Pickard D., Anany H., Callaway T. and Brabban A.D. 2011. Characterization of a ViI-like phage specific to *Escherichia coli* O157:H7. *Virol J* 8:430. doi: 10.1186/1743-422X-8-430.
 103. Labrie S.J. and Moineau S. 2007. Abortive infection mechanisms and prophage sequences significantly influence the genetic makeup of emerging lytic lactococcal phages. *J Bacteriol* 189 (4):1482-7. doi: 10.1128/JB.01111-06.
 104. Labrie S.J., Samson J.E. and Moineau S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* 8 (5):317-27. doi: 10.1038/nrmicro2315.
 105. Lacks S. and Greenberg B. 1975. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA. *J Biol Chem* 250 (11):4060-66.

106. Lee D.H., Lee J.-H., Shin H., Ji S., Roh E., Jung K., Ryu S., Choi J. and Heu S. 2012. Complete genome sequence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* bacteriophage My1. *Journal of virology* 86 (20):11410-11411.
107. Leiman P.G., Battisti A.J., Bowman V.D., Stummeyer K., Muhlenhoff M., Gerardy-Schahn R., Scholl D. and Molineux I.J. 2007. The structures of bacteriophages K1E and K1-5 explain processive degradation of polysaccharide capsules and evolution of new host specificities. *J Mol Biol* 371 (3):836-49. doi: 10.1016/j.jmb.2007.05.083.
108. Lenski R.E. 1984. Two-step resistance by *Escherichia coli* B to bacteriophage T2. *Genetics* 107 (1):1-7.
109. Letarov A. and Kulikov E. 2017. Adsorption of bacteriophages on bacterial cells. *Biochemistry (Moscow)* 82 (13):1632-1658.
110. Letarov A.V., Golomidova A.K. and Tarasyan K.K. 2010. Ecological basis for rational phage therapy. *Acta Naturae* 2 (1):60-72.
111. Li S., Liu L., Zhu J., Zou L., Li M., Cong Y., Rao X., Hu X., Zhou Y., Chen Z. and Hu F. 2010. Characterization and genome sequencing of a novel coliphage isolated from engineered *Escherichia coli*. *Intervirology* 53 (4):211-20. doi: 10.1159/000299063.
112. Lida Y. 1987. DNA sequences and multivariate statistical analysis. Categorical discrimination approach to 5' splice site signals of mRNA precursors in higher eukaryotes' genes. *Comput Appl Biosci* 3 (2):93-8.
113. Lin T.Y., Lo Y.H., Tseng P.W., Chang S.F., Lin Y.T. and Chen T.S. 2012. A T3 and T7 recombinant phage acquires efficient adsorption and a broader host range. *PLoS One* 7 (2):e30954. doi: 10.1371/journal.pone.0030954.
114. Liu M., Deora R., Doulatov S.R., Gingery M., Eiserling F.A., Preston A., Maskell D.J., Simons R.W., Cotter P.A., Parkhill J. and Miller J.F. 2002. Reverse transcriptase-mediated tropism switching in *Bordetella* bacteriophage. *Science* 295 (5562):2091-4. doi: 10.1126/science.1067467.
115. Lu M.J., Stierhof Y.D. and Henning U. 1993. Location and unusual membrane topology of the immunity protein of the *Escherichia coli* phage T4. *J Virol* 67 (8):4905-13.
116. Mahony J., McGrath S., Fitzgerald G.F. and van Sinderen D. 2008. Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes. *Appl Environ Microbiol* 74 (20):6206-15. doi: 10.1128/AEM.01053-08.
117. Maillou J. and Dreiseikelmann B. 1990. The sim gene of *Escherichia coli* phage P1: nucleotide sequence and purification of the processed protein. *Virology* 175 (2):500-7.
118. Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolf Y.I. and Koonin E.V. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* 1:7. doi: 10.1186/1745-6150-1-7.
119. Makarova K.S., Wolf Y.I., van der Oost J. and Koonin E.V. 2009. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol Direct* 4:29. doi: 10.1186/1745-6150-4-29.
120. Malik D.J., Sokolov I.J., Vinner G.K., Mancuso F., Cinquerrui S., Vladislavjevic G.T., Clokie M.R.J., Garton N.J., Stapley A.G.F. and Kirpichnikova A. 2017. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv Colloid Interface Sci* 249:100-133. doi: 10.1016/j.cis.2017.05.014.

121. Maszewska A. 2015. Phage associated polysaccharide depolymerases - characteristics and application. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 69:690-702. doi: 10.5604/17322693.1157422.
122. Mattoo S. and Cherry J.D. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 18 (2):326-82. doi: 10.1128/CMR.18.2.326-382.2005.
123. McCorquodale D.J. and Warner H.R. 1988. Bacteriophage T5 and related phages. In *The bacteriophages*, 439-475. Springer.
124. McPhee J.B., Small C.L., Reid-Yu S.A., Brannon J.R., Le Moual H. and Coombes B.K. 2014. Host defense peptide resistance contributes to colonization and maximal intestinal pathology by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Infect Immun* 82 (8):3383-93. doi: 10.1128/IAI.01888-14.
125. Medhekar B. and Miller J.F. 2007. Diversity-generating retroelements. *Curr Opin Microbiol* 10 (4):388-95. doi: 10.1016/j.mib.2007.06.004.
126. Meyer J.R., Dobias D.T., Medina S.J., Servilio L., Gupta A. and Lenski R.E. 2016. Ecological speciation of bacteriophage lambda in allopatry and sympatry. *Science* 354 (6317):1301-1304. doi: 10.1126/science.aai8446.
127. Meyer J.R., Dobias D.T., Weitz J.S., Barrick J.E., Quick R.T. and Lenski R.E. 2012. Repeatability and contingency in the evolution of a key innovation in phage lambda. *Science* 335 (6067):428-32. doi: 10.1126/science.1214449.
128. Michel A., Clermont O., Denamur E. and Tenaillon O. 2010. Bacteriophage PhiX174's ecological niche and the flexibility of its *Escherichia coli* lipopolysaccharide receptor. *Appl Environ Microbiol* 76 (21):7310-3. doi: 10.1128/AEM.02721-09.
129. Moak M. and Molineux I.J. 2000. Role of the Gp16 lytic transglycosylase motif in bacteriophage T7 virions at the initiation of infection. *Mol Microbiol* 37 (2):345-55.
130. Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Soria E. and Juez G. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 36 (1):244-6.
131. Molineux I.J. 1991. Host-parasite interactions: recent developments in the genetics of abortive phage infections. *New Biol* 3 (3):230-6.
132. Mondigler M., Ayoub A.T. and Heller K.J. 2006. The DNA region of phage BF23 encoding receptor binding protein and receptor blocking lipoprotein lacks homology to the corresponding region of closely related phage T5. *J Basic Microbiol* 46 (2):116-25. doi: 10.1002/jobm.200510047.
133. Mondigler M., Holz T. and Heller K.J. 1996. Identification of the receptor-binding regions of pb5 proteins of bacteriophages T5 and BF23. *Virology* 219 (1):19-28. doi: 10.1006/viro.1996.0218.
134. Morita M., Tasaka M. and Fujisawa H. 1995. Structural and functional domains of the large subunit of the bacteriophage T3 DNA packaging enzyme: importance of the C-terminal region in prohead binding. *Journal of molecular biology* 245 (5):635-644.
135. Morley T.J., Willis L.M., Whitfield C., Wakarchuk W.W. and Withers S.G. 2009. A new sialidase mechanism: bacteriophage K1F endo-sialidase is an inverting glycosidase. *J Biol Chem* 284 (26):17404-10. doi: 10.1074/jbc.M109.003970.
136. Morozova V.V., Vlassov V.V. and Tikunova N.V. 2018. Applications of bacteriophages in the treatment of localized infections in humans. *Front Microbiol* 9:1696. doi: 10.3389/fmicb.2018.01696.

137. Muhlenhoff M., Stummeyer K., Grove M., Sauerborn M. and Gerardy-Schahn R. 2003. Proteolytic processing and oligomerization of bacteriophage-derived endosialidases. *J Biol Chem* 278 (15):12634-44. doi: 10.1074/jbc.M212048200.
138. Nagasu T., Yoshinari K., Kikuchi S. and Mizobuchi K. 1988. Relationships among genes and gene products of bacteriophage BF23. *J Virol* 62 (12):4561-8.
139. Niu Y.D., Stanford K., Kropinski A.M., Ackermann H.W., Johnson R.P., She Y.M., Ahmed R., Villegas A. and McAllister T.A. 2012. Genomic, proteomic and physiological characterization of a T5-like bacteriophage for control of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS One* 7 (4):e34585. doi: 10.1371/journal.pone.0034585.
140. Oliveira H., Costa A.R., Konstantinides N., Ferreira A., Akturk E., Sillankorva S., Nemeč A., Shneider M., Dotsch A. and Azeredo J. 2017. Ability of phages to infect *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species through acquisition of different pectate lyase depolymerase domains. *Environ Microbiol* 19 (12):5060-5077. doi: 10.1111/1462-2920.13970.
141. Oliveira H., Pinto G., Hendrix H., Noben J.P., Gawor J., Kropinski A.M., Lobočka M., Lavigne R. and Azeredo J. 2017. A lytic providencia rettgeri virus of potential therapeutic value is a deep-branching member of the T5virus genus. *Appl Environ Microbiol* 83 (23). doi: 10.1128/AEM.01567-17.
142. Ong Z.Y., Wiradharma N. and Yang Y.Y. 2014. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. *Adv Drug Deliv Rev* 78:28-45. doi: 10.1016/j.addr.2014.10.013.
143. Orskov I., Orskov F., Jann B. and Jann K. 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* 41 (3):667-710.
144. Paradiso R., Lombardi S., Iodice M.G., Riccardi M.G., Orsini M., Bolletti Censi S., Galiero G. and Borriello G. 2016. Complete genome sequence of a lytic Siphoviridae bacteriophage infecting several serovars of *Salmonella enterica*. *Genome Announc* 4 (5). doi: 10.1128/genomeA.00943-16.
145. Paterson S., Vogwill T., Buckling A., Benmayor R., Spiers A.J., Thomson N.R., Quail M., Smith F., Walker D., Libberton B., Fenton A., Hall N. and Brockhurst M.A. 2010. Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution. *Nature* 464 (7286):275-8. doi: 10.1038/nature08798.
146. Patrick Higgins N. 2018. Muprints and whole genome insertion scans: methods for investigating chromosome accessibility and DNA dynamics using bacteriophage Mu. *Methods Mol Biol* 1681:303-314. doi: 10.1007/978-1-4939-7343-9_22.
147. Pepin K.M. and Wichman H.A. 2008. Experimental evolution and genome sequencing reveal variation in levels of clonal interference in large populations of bacteriophage phiX174. *BMC Evol Biol* 8:85. doi: 10.1186/1471-2148-8-85.
148. Petrie K.L., Palmer N.D., Johnson D.T., Medina S.J., Yan S.J., Li V., Burmeister A.R. and Meyer J.R. 2018. Destabilizing mutations encode nongenetic variation that drives evolutionary innovation. *Science* 359 (6383):1542-1545. doi: 10.1126/science.aar1954.
149. Piya D., Xie Y., Hernandez Morales A.C. and Kutty Everett G.F. 2015. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium siphophage Shivani. *Genome Announc* 3 (1). doi: 10.1128/genomeA.01443-14.
150. Plancon L., Janmot C., Le Maire M., Desmadril M., Bonhivers M., Letellier L. and Boulanger P. 2002. Characterization of a high-affinity complex between the bacterial

- outer membrane protein FhuA and the phage T5 protein pb5. *Journal of molecular biology* 318 (2):557-569.
151. Ponchon L., Boulanger P., Labesse G. and Letellier L. 2006. The endonuclease domain of bacteriophage terminases belongs to the resolvase/integrase/ribonuclease H superfamily: a bioinformatics analysis validated by a functional study on bacteriophage T5. *J Biol Chem* 281 (9):5829-36. doi: 10.1074/jbc.M511817200.
 152. Prehm P., Jann B., Jann K., Schmidt G. and Stirm S. 1976. On a bacteriophage T3 and T4 receptor region within the cell wall lipopolysaccharide of Escherichia coli B. *J Mol Biol* 101 (2):277-81.
 153. Prokhorov N.S., Riccio C., Zdrovenko E.L., Shneider M.M., Browning C., Knirel Y.A., Leiman P.G. and Letarov A.V. 2017. Function of bacteriophage G7C esterase tailspike in host cell adsorption. *Mol Microbiol* 105 (3):385-398. doi: 10.1111/mmi.13710.
 154. Przech A.J., Yu D. and Weller S.K. 2003. Point mutations in exon I of the herpes simplex virus putative terminase subunit, UL15, indicate that the most conserved residues are essential for cleavage and packaging. *J Virol* 77 (17):9613-21.
 155. Qimron U., Marintcheva B., Tabor S. and Richardson C.C. 2006. Genomewide screens for Escherichia coli genes affecting growth of T7 bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (50):19039-44. doi: 10.1073/pnas.0609428103.
 156. Rabsch W., Ma L., Wiley G., Najjar F.Z., Kaserer W., Schuerch D.W., Klebba J.E., Roe B.A., Laverde Gomez J.A., Schallmey M., Newton S.M. and Klebba P.E. 2007. FepA- and TonB-dependent bacteriophage H8: receptor binding and genomic sequence. *J Bacteriol* 189 (15):5658-74. doi: 10.1128/JB.00437-07.
 157. Rakhuba D.V., Kolomiets E.I., Dey E.S. and Novik G.I. 2010. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol J Microbiol* 59 (3):145-55.
 158. Raya R.R., Oot R.A., Moore-Maley B., Wieland S., Callaway T.R., Kutter E.M. and Brabban A.D. 2011. Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce Escherichia coli O157:H7 levels in sheep guts. *Bacteriophage* 1 (1):15-24. doi: 10.4161/bact.1.1.14175.
 159. Riede I. and Eschbach M.L. 1986. Evidence that TraT interacts with OmpA of Escherichia coli. *FEBS Lett* 205 (2):241-5.
 160. Rothenberg E., Sepulveda L.A., Skinner S.O., Zeng L., Selvin P.R. and Golding I. 2011. Single-virus tracking reveals a spatial receptor-dependent search mechanism. *Biophys J* 100 (12):2875-82. doi: 10.1016/j.bpj.2011.05.014.
 161. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold spring harbor laboratory press, New York.
 162. Samson J.E., Magadan A.H., Sabri M. and Moineau S. 2013. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol* 11 (10):675-87. doi: 10.1038/nrmicro3096.
 163. Sandmeier H., Iida S. and Arber W. 1992. DNA inversion regions Min of plasmid p15B and Cin of bacteriophage P1: evolution of bacteriophage tail fiber genes. *J Bacteriol* 174 (12):3936-44.
 164. Sayers J. 2006. Bacteriophage T5. In *The bacteriophages*, 268-276. Oxford, UK; New York, USA: Oxford University Press.

165. Scanlan P.D., Hall A.R., Lopez-Pascua L.D. and Buckling A. 2011. Genetic basis of infectivity evolution in a bacteriophage. *Mol Ecol* 20 (5):981-9. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04903.x.
166. Scholl D. and Merrill C. 2005. The genome of bacteriophage K1F, a T7-like phage that has acquired the ability to replicate on K1 strains of Escherichia coli. *J Bacteriol* 187 (24):8499-503. doi: 10.1128/JB.187.24.8499-8503.2005.
167. Schulz E.C., Dickmanns A., Urlaub H., Schmitt A., Muhlenhoff M., Stummeyer K., Schwarzer D., Gerardy-Schahn R. and Ficner R. 2010. Crystal structure of an intramolecular chaperone mediating triple-beta-helix folding. *Nat Struct Mol Biol* 17 (2):210-5. doi: 10.1038/nsmb.1746.
168. Schwarzer D., Buettner F.F., Browning C., Nazarov S., Rabsch W., Bethe A., Oberbeck A., Bowman V.D., Stummeyer K., Muhlenhoff M., Leiman P.G. and Gerardy-Schahn R. 2012. A multivalent adsorption apparatus explains the broad host range of phage phi92: a comprehensive genomic and structural analysis. *J Virol* 86 (19):10384-98. doi: 10.1128/JVI.00801-12.
169. Seed K.D., Lazinski D.W., Calderwood S.B. and Camilli A. 2013. A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature* 494 (7438):489-91. doi: 10.1038/nature11927.
170. Sellvam D., Lau N.S. and Arip Y.M. 2018. Genome organization of Escherichia phage YD-2008.s: a new entry to Siphoviridae family. *Trop Life Sci Res* 29 (1):37-50. doi: 10.21315/tlsr2018.29.1.3.
171. Sime-Ngando T. 2014. Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Front Microbiol* 5:355. doi: 10.3389/fmicb.2014.00355.
172. Smith E.J., Thompson A.P., O'Driscoll A. and Clarke D.J. 2013. Pathogenesis of adherent-invasive Escherichia coli. *Future Microbiol* 8 (10):1289-300. doi: 10.2217/fmb.13.94.
173. Snyder L. 1995. Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents? *Mol Microbiol* 15 (3):415-20.
174. Soding J., Biegert A. and Lupas A.N. 2005. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* 33 (Web Server issue):W244-8. doi: 10.1093/nar/gki408.
175. Sorek R., Kunin V. and Hugenholz P. 2008. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 6 (3):181-6. doi: 10.1038/nrmicro1793.
176. Stockdale S.R., Mahony J., Courtin P., Chapot-Chartier M.P., van Pijkeren J.P., Britton R.A., Neve H., Heller K.J., Aideh B., Vogensen F.K. and van Sinderen D. 2013. The lactococcal phages Tuc2009 and TP901-1 incorporate two alternate forms of their tail fiber into their virions for infection specialization. *J Biol Chem* 288 (8):5581-90. doi: 10.1074/jbc.M112.444901.
177. Studier F.W. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41 (1):207-34.
178. Studier F.W. and Movva N.R. 1976. SAMase gene of bacteriophage T3 is responsible for overcoming host restriction. *J Virol* 19 (1):136-45.
179. Stummeyer K., Dickmanns A., Muhlenhoff M., Gerardy-Schahn R. and Ficner R. 2005. Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Nat Struct Mol Biol* 12 (1):90-6. doi: 10.1038/nsmb874.

180. Summers W.C. 2012. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage* 2 (2):130-133. doi: 10.4161/bact.20757.
181. Sutherland I.W. 1995. Polysaccharide lyases. *FEMS Microbiol Rev* 16 (4):323-47.
182. Sutherland I.W. 1999. Microbial polysaccharide products. *Biotechnol Genet Eng Rev* 16:217-29.
183. Sutherland I.W., Hughes K.A., Skillman L.C. and Tait K. 2004. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 232 (1):1-6.
184. Suzuki M., Kaneko-Tanaka Y. and Azegami M. 1974. Transfection of non-host bacterial spheroplasts with bacteriophage phi chi 174 DNA. *Nature* 252 (5481):319-20.
185. Sváb D., Falgenhauer L., Rohde M., Szabó J., Chakraborty T. and Tóth I. 2018. Identification and characterization of T5-like bacteriophages representing two novel subgroups from food products. *Frontiers in microbiology* 9:202.
186. Swarts D.C., Jore M.M., Westra E.R., Zhu Y., Janssen J.H., Snijders A.P., Wang Y., Patel D.J., Berenguer J., Brouns S.J.J. and van der Oost J. 2014. DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature* 507 (7491):258-261. doi: 10.1038/nature12971.
187. Taylor N.M., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R.C., Shneider M.M., Browning C., Goldie K.N., Stahlberg H. and Leiman P.G. 2016. Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. *Nature* 533 (7603):346-52. doi: 10.1038/nature17971.
188. Tetart F., Desplats C. and Krisch H. 1998. Genome plasticity in the distal tail fiber locus of the T-even bacteriophage: recombination between conserved motifs swaps adhesin specificity1. *Journal of molecular biology* 282 (3):543-556.
189. Tetart F., Repoila F., Monod C. and Krisch H.M. 1996. Bacteriophage T4 host range is expanded by duplications of a small domain of the tail fiber adhesin. *J Mol Biol* 258 (5):726-31. doi: 10.1006/jmbi.1996.0281.
190. Thomas J.O., Sternberg N. and Weisberg R. 1978. Altered arrangement of the DNA in injection-defective lambda bacteriophage. *Journal of molecular biology* 123 (2):149-161.
191. Tock M.R. and Dryden D.T. 2005. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr Opin Microbiol* 8 (4):466-72. doi: 10.1016/j.mib.2005.06.003.
192. Trojet S.N., Caumont-Sarcos A., Perrody E., Comeau A.M. and Krisch H.M. 2011. The gp38 adhesins of the T4 superfamily: a complex modular determinant of the phage's host specificity. *Genome Biol Evol* 3:674-86. doi: 10.1093/gbe/evr059.
193. Twort F.W. 1915. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet* 186 (4814):1241-1243.
194. Veessler D., Robin G., Lichiere J., Auzat I., Tavares P., Bron P., Campanacci V. and Cambillau C. 2010. Crystal structure of bacteriophage SPP1 distal tail protein (gp19.1): a baseplate hub paradigm in gram-positive infecting phages. *J Biol Chem* 285 (47):36666-73. doi: 10.1074/jbc.M110.157529.
195. Viazis S., Akhtar M., Feirtag J., Brabban A.D. and Diez-Gonzalez F. 2011. Isolation and characterization of lytic bacteriophages against enterohaemorrhagic Escherichia coli. *J Appl Microbiol* 110 (5):1323-31. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04989.x.
196. Villion M. and Moineau S. 2013. Virology: Phages hijack a host's defence. *Nature* 494 (7438):433-4. doi: 10.1038/494433a.

197. Vinga I., Droge A., Stiege A.C., Lurz R., Santos M.A., Daugelavicius R. and Tavares P. 2006. The minor capsid protein gp7 of bacteriophage SPP1 is required for efficient infection of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 61 (6):1609-21. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05327.x.
198. Wang A., Nizran P., Malone M.A. and Riley T. 2013. Urinary tract infections. *Prim Care* 40 (3):687-706. doi: 10.1016/j.pop.2013.06.005.
199. Wang I.N. 2006. Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics* 172 (1):17-26. doi: 10.1534/genetics.105.045922.
200. Watson B.N.J., Staals R.H.J. and Fineran P.C. 2018. CRISPR-Cas-Mediated Phage Resistance Enhances Horizontal Gene Transfer by Transduction. *MBio* 9 (1). doi: 10.1128/mBio.02406-17.
201. Weinbauer M.G. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* 28 (2):127-81. doi: 10.1016/j.femsre.2003.08.001.
202. Wilson W.W. and Hoffman R.M. 1990. Methylation of intact chromosomes by bacterial methylases in agarose plugs suitable for pulsed-field electrophoresis. Methylation of intact chromosomes in agarose by methylases. *Anal Biochem* 191 (2):370-5.
203. Xing S., Pan X., Sun Q., Pei G., An X., Mi Z., Huang Y., Zhao B. and Tong Y. 2017. Complete genome sequence of a novel multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* phage, vB_Kpn_IME260. *Genome Announc* 5 (19). doi: 10.1128/genomeA.00055-17.
204. Yang L., Li W., Jiang G.Z., Zhang W.H., Ding H.Z., Liu Y.H., Zeng Z.L. and Jiang H.X. 2017. Characterization of a P1-like bacteriophage carrying CTX-M-27 in *Salmonella* spp. resistant to third generation cephalosporins isolated from pork in China. *Sci Rep* 7:40710. doi: 10.1038/srep40710.
205. Zabeau M., Friedman S., Van Montagu M. and Schell J. 1980. The *ral* gene of phage lambda. I. Identification of a non-essential gene that modulates restriction and modification in *E. coli*. *Mol Gen Genet* 179 (1):63-73.
206. Zaleski P., Wojciechowski M. and Piekarowicz A. 2005. The role of Dam methylation in phase variation of *Haemophilus influenzae* genes involved in defence against phage infection. *Microbiology* 151 (Pt 10):3361-9. doi: 10.1099/mic.0.28184-0.
207. Zdorovenko E.L., Golomidova A.K., Prokhorov N.S., Shashkov A.S., Wang L., Letarov A.V. and Knirel Y.A. 2015. Structure of the O-polysaccharide of *Escherichia coli* O87. *Carbohydr Res* 412:15-8. doi: 10.1016/j.carres.2015.04.014.
208. Zdorovenko E.L., Wang Y., Shashkov A.S., Chen T., Ovchinnikova O.G., Liu B., Golomidova A.K., Babenko V.V., Letarov A.V. and Knirel Y.A. 2018. O-Antigens of *Escherichia coli* Strains O81 and HS3-104 Are Structurally and Genetically Related, Except O-Antigen Glucosylation in *E. coli* HS3-104. *Biochemistry (Mosc)* 83 (5):534-541. doi: 10.1134/S0006297918050061.
209. Zivanovic Y., Confalonieri F., Ponchon L., Lurz R., Chami M., Flayhan A., Renouard M., Huet A., Decottignies P., Davidson A.R., Breyton C. and Boulanger P. 2014. Insights into bacteriophage T5 structure from analysis of its morphogenesis genes and protein components. *J Virol* 88 (2):1162-74. doi: 10.1128/JVI.02262-13.
210. Zweig M. and Cummings D.J. 1973. Cleavage of head and tail proteins during bacteriophage T5 assembly: selective host involvement in the cleavage of a tail protein. *J Mol Biol* 80 (3):505-18.
211. Zweig M., Rosenkranz H.S. and Morgan C. 1972. Development of coliphage T5: ultrastructural and biochemical studies. *J Virol* 9 (3):526-43.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Табл. П1. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков адсорбционного аппарата T5-подобных бактериофагов.

	T5-подобные бактериофаги	Pb5 (<i>oad</i>) T5	Pb5 (<i>hrs</i>) BF23	LTFC	LTFA	LTFB	LTFX*
1	Escherichia phage T5 (NC_005859.1)	100%	31%	+	1396 ак		
2	Escherichia phage BF23 (AAZ03642.1)	31%	100%	+	1265 ак		
3	Salmonella phage SP01 (KY114934.1)	30%	67%	+			1083ак
4	Escherichia phage Gostya9 (MH203051.1)	21%	28%	+	896 ак		
5	Salmonella phage SP1 (MF774687.1)	31%	97%	+			1302ак
6	Salmonella phage SP3 (MG387042.1)	31%	97%	+	1083 ак		
7	Escherichia phage OSYSP (MF402939.1)	30%	83%	+	969 ак		
8	Salmonella phage Stp1 (KY775453.1)	31%	97%	+	1236 ак		
9	Escherichia phage phiLLS (KY677846.1)	30%	67%	+			
10	Bacteriophage T5-like chee24 (MF431730)	30%	67%	+	1116 ак	695 ак	
11	Bacteriophage T5-like pork27 (MF431731)	30%	67%	+	1116 ак	695 ак	
12	Bacteriophage T5-like pork29 (MF431732)	30%	67%	+	1116 ак	695 ак	
13	Bacteriophage T5-like saus47N (MF431733)	30%	67%	+	1116 ак	695 ак	
14	Bacteriophage T5-like saus111K (MF431734)	30%	67%	+	1116 ак	695 ак	
15	Bacteriophage T5-like poul124 (MF431735)	30%	67%	+	1116 ак	695 ак	
16	Bacteriophage T5-like chee130_1 (MF431736)	29%	75%	+	975 ак		
17	Bacteriophage T5-like saus132 (MF431737)	29%	75%	+	975 ак**		
18	Bacteriophage T5-like poul149 (MF431738)	29%	75%	+	975 ак**		
19	Bacteriophage T5-like chee158 (MF431739)	29%	75%	+	975 ак**		
20	Bacteriophage T5-like cott162 (MF431740)	29%	75%	+	975 ак		
21	Bacteriophage T5-like saus176N (MF431741)	29%	75%	+	975 ак		
22	Salmonella phage NR01 (NC_031042.1)	30%	84%	+	1116 ак	695 ак	
23	Klebsiella phage Sugarland (MG459987.1)	40%	29%	+	1591 ак		
24	Proteus phage PM135 (ATW69903.1)	23%	26%	+	861 ак		
25	Proteus phage Stubb (MH830339.1)	< 20%	< 20%	+	784 ак		
26	Providencia phage vB_PreS_PR1 (KY363465.1)	< 20%	< 20%	+	759 ак		

27	Escherichia phage vB_EcoS_FFH1 (NC_024139.1)	95%	30%	+	816 ак		580 ак
28	Escherichia phage slur09 (NC_028840.1)	65%	32%	+	1272 ак		
29	Escherichia phage APCEc03 (KR422353.1)	30%	67%	+	815 ак		580 ак
30	Salmonella phage Spc35 (NC_015269.1)	30%	84%	+	1116 ак	695 ак	
31	Salmonella phage LVR16A (MF681663.1)	30%	67%	+	1119 ак	625 ак	1.
32	Salmonella phage SH9 (MF001363.1)	30%	76%	+	983 ак		
33	Yersinia phage phiR201 (NC_019919.2)	28%	59%	+	922 ак		655ак
34	Salmonella phage Stitch (NC_027297.1)	29%	76%	+	1074 ак		
35	Escherichia phage Eps7 (NC_010583.1)	34%	76%	+	807 ак		
36	Escherichia phage Akfv33 (NC_017969.1)	29%	66%	+	784 ак		557 ак
37	Salmonella phage 118970_sal2 (KX017521.1)	29%	74%	+	1027ак	295 ак	381ак
38	Enterobacteria phage DT57C (NC_027356.1)	33%	70%	+	1076 ак	788 ак	
39	Enterobacteria phage DT571/2 (KM979355.1)	33%	70%	+	1039 ак	767 ак	
40	Salmonella phage Shivani (NC_028754.1)	24%	28%	+	961 ак		
41	Shigella phage SHSML-45 (KX130863.1)	30%	66%	+	565 ак		
42	Klebsiella phage vB_Kpn_IME260 (KX845404.2)	39%	27%	+	680 ак		
43	Providencia phage vB_PreS_PR1 (KY363465.1)	24%	28%	+	759 ак		
44	Salmonella phage S113 (MH370366.1)	29%	74%	+	755 ак		
45	Salmonella phage S114 (MH370367.1)	29%	75%	+	976 ак		
46	Salmonella phage S116 (AXC40713.1)	29%	76%	+	983 ак		
47	Salmonella phage S126 (MH370376.1)	28%	74%	+	983 ак	755 ак	
48	Salmonella phage S130 (MH370377.1)	95%	31%	+	1095 ак	695 ак	
49	Salmonella phage S131 (MH370378.1)	95%	31%	+	1095 ак	695 ак	
50	Salmonella phage S132 (MH370379.1)	29%	74%	+	1071 ак	761 ак	
51	Salmonella phage BSP22A (KY787212.1)	29%	76%	+	983 ак	-	
52	Salmonella phage S147 (MH370386.1)	29%	76%	+	755 ак		
53	Salmonella phage SH9 (MF001363)	30%	76%	+	983 ак	-	
54	Salmonella phage STG2 (MK005300.1)	29%	76%	+	1066 ак	625 ак	
55	Salmonella phage vB_SenS_PHB06 (MH102285.1)	Нет гена***	Нет гена***	+	1116 ак	695 ак	
56	Escherichia virus vB_Eco_mar003J3 (VCU43823.1)	29%	75%	+	880 ак	713 ак	
57	Salmonella phage Seafire (AZF88057.1)	29%	75%	+	983 ак		
58	Escherichia virus vB_Eco_mar004NP2 (LR027384.1)	30%	67%	+	589 ак		796 ак
59	Salmonella phage Sw2 (AXY85102.1)	31%	73%	+	1027ак	767 ак	
60	Escherichia virus H8	24%	51%	+	755 ак		

	(AC171169.12)						
61	Escherichia phage EcoS-CEV2 (HQ661859.1)	Нет полной последовательности генома					
62	Pectobacterium phage My1 (NC_018837.1)			+			
63	Pectobacterium phage DU_PP_V (ATS94091)			+			
64	Vibrio phage vB_VorS-PVo5 (KT345706.1)						+
65	Vibrio phage pVp01 (NC_019529.1)						+
66	Vibrio phage JSF10 (KY883654.1)						+
67	Vibrio phage phi3 (NC_028895.1)						+
68	Vibrio virus Ceto (AUG85044.1)						
69	Vibrio phage vB_VpS_PG07 (MH645904.1)			+			
70	Vibrio virus Thalassa (AUG85236.1)						
71	Pectobacterium phage DU_PP_V (MF979564.1)			+			

*LTFX - фибриллярный белок не имеющий гомологии с белками LTFA и LTFB;

** Ошибка определения рамки гена *ltf*;

*** Геном опубликован не полностью.

Приложение 2

Табл. П2. Различие генов и ОРС у фагов DT57C, DT571/2 и T5.

<i>Enterobacteria phage T5</i> (NC_005859.1)	<i>Enterobacteria phage DT57C</i> (KM979354.1)	<i>Enterobacteria phage DT571/2</i> (KM979355.1)	Product
T5.003	-	-	hypothetical protein
T5.008	-	-	hypothetical protein
T5.009	-	-	hypothetical protein
-	DT57C_000007	DT5712_000007	hypothetical protein
-	DT57C_000008	DT5712_000008	repeat completion protein
T5.010	-	-	putative H-N-H-endonuclease P-TfIVII
T5.011	-	-	hypothetical protein
T5.012	-	-	hypothetical protein
T5.016	-	-	hypothetical protein
T5.017	-	-	hypothetical protein
T5.018	-	-	hypothetical protein
-	DT57C_000012	DT5712_000012	putative homing endonuclease P-TfIXVII
-	DT57C_000013	DT5712_000013	hypothetical protein
-	DT57C_000014	DT5712_000014	hypothetical protein
T5.021	DT57C_000017	-	hypothetical protein
T5.022	DT57C_000018	-	hypothetical protein
T5.031	-	-	hypothetical protein
T5.046	-	-	H-N-H-endonuclease F-TfIVI
T5.050	-	-	hypothetical protein
T5.051	-	-	H-N-H-endonuclease F-TfIV
-	DT57C_000048	DT5712_000046	hypothetical protein
T5.057	-	-	hypothetical protein
T5.059	-	-	hypothetical protein
T5.060	-	-	hypothetical protein
-	DT57C_000051	DT5712_000049	hypothetical protein
-	DT57C_000052	DT5712_000050	hypothetical protein
T5.061	-	-	H-N-H endonuclease F-TfIII
T5.062	-	-	hypothetical protein
T5.063	-	-	hypothetical protein
T5.064	-	-	H-N-H endonuclease TfII

T5.065	-	-	hypothetical protein
T5.066	-	-	hypothetical protein
T5.069	-	-	hypothetical protein
T5.070	-	-	hypothetical protein
T5.071	-	-	hypothetical protein
T5.072	-	-	hypothetical protein
T5.075	-	-	H-N-H endonuclease TflIV
T5.077	-	-	hypothetical protein
T5.078	-	-	hypothetical protein
T5.079	-	-	hypothetical protein
-	DT57C_000074	DT5712_000072	putative H-N-H-endonuclease P-TflVIII
T5.100	-	-	hypothetical protein
-	DT57C_000079	DT5712_000077	hypothetical protein
T5.103	-	-	hypothetical protein
T5.104	-	DT5712_000080	hypothetical protein
T5.105	-	DT5712_000081	hypothetical protein
-	DT57C_000085	DT5712_000085	hypothetical protein
T5.109	-	-	putative H-N-H-endonuclease P-TflIX
-	DT57C_000091	DT5712_000091	hypothetical protein
T5.121	-	-	putative DNA replication primase
T5.132	-	-	hypothetical protein
-	DT57C_000107	DT5712_000107	L-shaped tail fiber assembly
T5.135	-	-	hypothetical protein
T5.136	-	-	hypothetical protein
T5.141	-	-	hypothetical protein
T5.154	-	-	hypothetical protein

Приложение 3

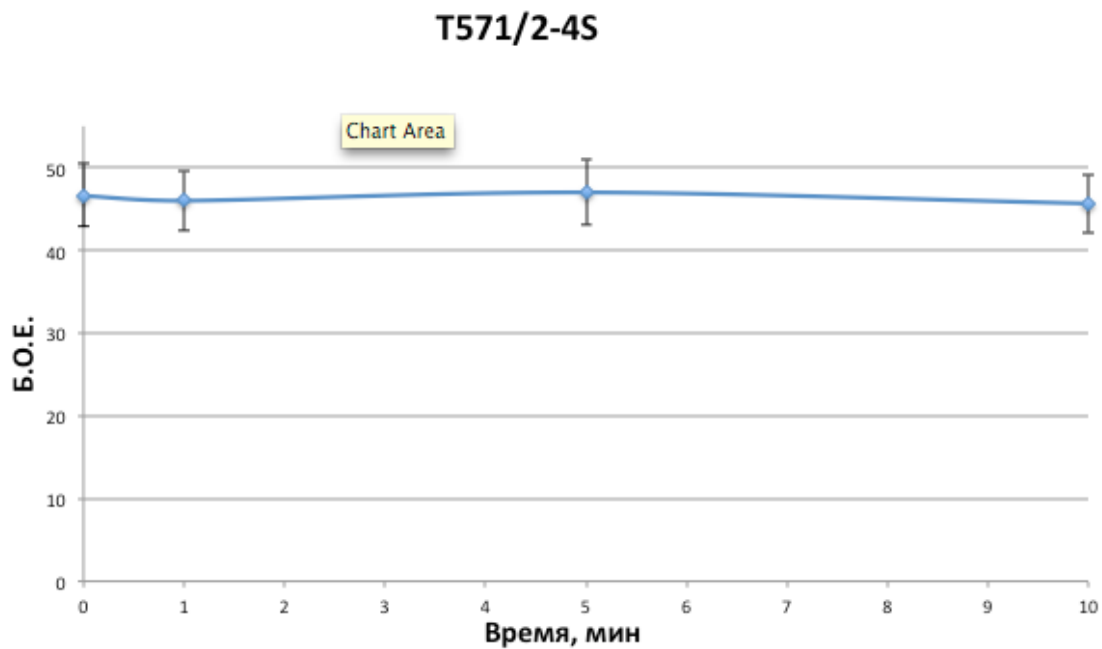
Табл. ПЗ. Праймеры.

Название	Последовательность 5' - 3'
T5-hdD	TCTCTGGAAGGTCTGACCG
T5-hdR	GCTGAGTAACGTAGTACGC
BF23Llp-R	TGACATATCTTTCATGCTCCT
BF23Llp42-F	GGAGAGATAAATATGAAAAAGTTTGTAATTGCACTAGTTGC
71/2f1m-F	CGAGTATTTAATTCTTCTTTATCTATAGTGTAGTTAGAG ATT CACA AGTATTTAGAAAGTTAGTGCAACAG
71/2f1m-R	AGCACTACTTCTGACGAGCG
71/2f2m-F	ATTCTGAACATAGATGACACTACAAC TACTGCTTAGA AGTATCCTA AATATACAGTAG
71/2f2m-R	GATGCTGCTCAAGGTGCTG
T5f1-F	CCTGTGGTCTTACAACGTCC
T5f2-F	GTTAGTGCAACAGCACCAGC
T5f2-R	GATATTGCTACCACGTATAC
T5f1-R	TGCCTAAATCCGGCGCAATG
BtuB-F	CCAACGTCGCATCTGGTTC
BtuB-F2	GTAACGCTGTTGGGCGAT
BtuB-R	GATCTCGTCATAGACCGA
70.5f1.F5	CAGGGCAGCGGATCCATGTCACGTAATTTAATGCCTAA
70.5f1.R5	ACGGAGCTCGAATTCTCAGCGCCTTGAGTGAAT
S649ARM	TCCCGCCCCG c TGTGCCTTGC
S649AFM	GCAAGGCACA g CGGGGCGGGA

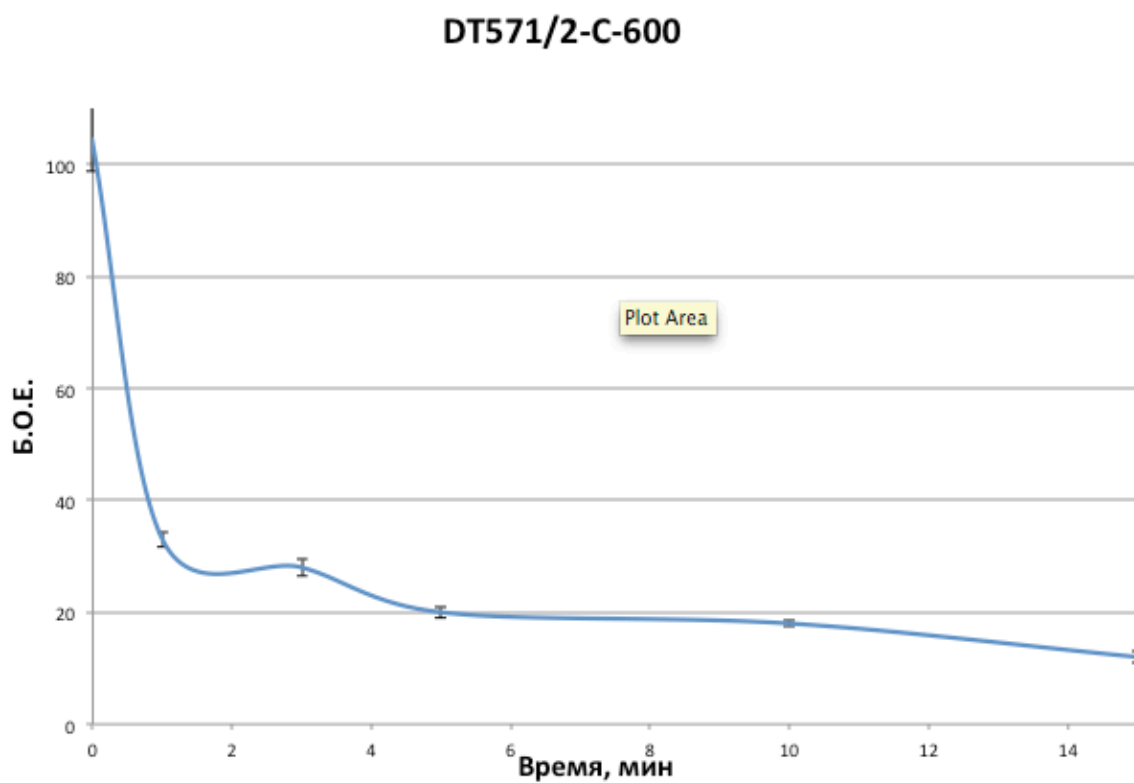
Приложение 4

Рис. П4. Кривые адсорбции бактериофага DT71/2 на штаммах *E. coli* (4S, HS1/2, C-600 и HS3/104).

А

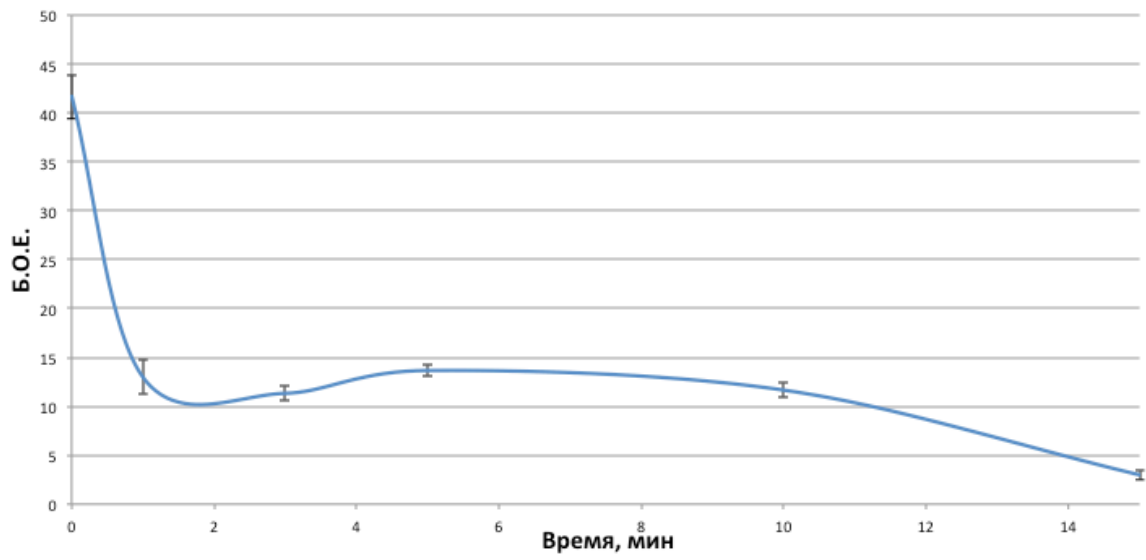


В



C

T571/2-HS1/2



D

DT571/2-HS 3-104

