

На правах рукописи

Алла Константиновна Голомидова

**Структурная и функциональная организация адсорбционного аппарата T5-
подобных бактериофагов DT57C и DT571/2**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва 2019

Работа 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)

Научный руководитель:	Летаров Андрей Викторович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией вирусов микроорганизмов, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
Официальные оппоненты:	Мирошников Константин Анатольевич, доктор технических наук, главный научный сотрудник, и.о. зав. лаборатории молекулярной биоинженерии, ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук Грановский Игорь Эдуардович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»
Ведущая организация:	ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (г. Оболенск)

Защита состоится 17 июня 2019 г. в 14:00 ч на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание учёной степени доктора наук, на соискание учёной степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д.7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ РАН (117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д.7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <https://www.fbras.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 граммотрицательные 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, *Escherichia coli* является ведущим возбудителем урологических инфекций у пациентов без анатомических аномалий (Al-Badr et al., 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 (Allocatti 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 потенциальных факторов патогенности, являются вирулентными, а также обладают широким хозяйским спектром (Svab et al., 2018). Бактериофаг T5 один из первых фагов энтеробактерий, который был подробно описан еще 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., 2018; Oliveira et al., 2017).

Детально изученная организация адсорбционного аппарата T5-подобных бактериофагов и стратегии распознавания ими клеток хозяев позволит использовать эти вирусы как основу для системы управления хозяйской специфичностью вируса, которая бы позволила быстро адаптировать фага к штаммам *E. coli*, продуцирующим практически самые различные варианты O-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 ее 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 разветвленное 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 (О-антигены клеток), обеспечивая возможность проникновения осевой фибриллы к конечному рецептору (в случае фагов DT57С и DT571/2 – белку-транспортеру внешней мембраны BtuВ *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 О-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.

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. Guettero-Ferreira – сотруднику Федеральной Политехнической школы в Лозанне (Швейцария), за помощь в проведении криоэлектронной микроскопии бактериофагов. Автор благодарит руководителя группы геной 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

Бактериальные штаммы

В работе использовали лабораторные штаммы *E. coli* (производные K12 и B: C600, NM522, BL21(DE3), DH5 α), а также природные изоляты *E. coli* 4S, HS1/2 и HS3-104, выделенные из фекалий лошадей. Бактериофаги DT57C и DT571/2, а также фаг DT5730 были выделены из фекалий лошадей в 2006 г. в ходе экологического мониторинга динамики колифагов в индивидуальных микробиомах лошадей (Golomidova et al., 2007).

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.

Секвенирование ДНК и определение полных последовательностей фаговых геномов

Нуклеотидные последовательности были определены при использовании автоматического секвенатора (Avant 3150; Applied Biosystems) со стандартными реактивами. Полные геномные последовательности были получены в Центре Биоинженерии РАН с помощью NGS секвенатора Junior (Roche), а также в геномном центре ФНКЦ ФХМ ФМБА РФ с помощью секвенатора Ion Torrent. Сборка геномов осуществлялась с помощью программы Newbler. Фаговые геномы были собраны в один контиг. Положение физических концов геномов фагов DT57C и DT571/2 было определено экспериментально. Концы геномов других близкородственных фагов были размечены в тех же сайтах по аналогии.

Электронная микроскопия

Каплю фагового лизата наносили на медную сетку, покрытую слоем полимера (0,3% формвар) и аморфного углерода. Сетки окрашивали 1% уранилацетатом и исследовали с помощью электронного микроскопа Jeol 100S (Japan) при 50 000-кратном увеличении.

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 $2 \cdot 10^3$ БОЕ в 1 мл и смесь инкубировали при 37° С. 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.

Получение мутантов бактериофагов

Получение мутантов бактериофагов осуществляли двумя способами. Отбор случайных мутантов проводили по признаку приобретения или потери способности ими образовать бляшки на том или ином штамме. При необходимости, для установления точного положения мутаций проводили повторное секвенирование генома фага.

Нонсенс-мутации создавали с помощью рекомбинации фагов с плазмидными конструкциями. Для этого в вектор pGEM-T клонировали фрагмент гена-мишени, в который вводили амбер-кодон. Длина полностью гомологичных фланкирующих последовательностей составляла не менее 200 п.н. с одной стороны и не менее 50 п.н. с противоположной. Культуру чувствительных бактерий, несущую соответствующую плазмиду, заражали фагом. Потомство фага высевали на амбер-супрессирующий штамм *E. coli* C600 (SupE44 (glnV44)). После этого фаги скринировали на потерю способности к росту на несупрессирующем штамме (в зависимости от предполагаемого фенотипа фага, дефицитного по соответствующему белку). Наличие мутации подтверждали таргетным секвенированием.

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 mM пиридин-ацетатным буфером pH 4.5, наблюдая пики О-ПС с помощью дифференциального рефрактометра.

Более развёрнутый перечень методов, использованных в работе представлен в рукописи диссертации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Определение спектров хозяев бактериофагов

В ходе нашей предшествующей работы были выделены 10 бактериофагов, из образцов фекалий двух лошадей, содержащихся на одной конюшне, способных расти на лабораторном штамме *E. coli* С600. В их числе было пять близкородственных фагов, имевших сходные рестрикционные профили ДНК (Рис. 1А – С1-2, D1-3). Морфологически они представляли собой крупные сифовирусы (Рис. 1В – D1). Эти вирусы были нами выбраны в качестве объектов диссертационного исследования.

Для идентификации данных фагов были получены случайные клоны фрагментов геномной ДНК одного из них. Секвенирование этих клонов обнаружило последовательности, имевшие более 95% идентичности с геномом фага Т5, на основании чего они были отнесены к Т5-подобным бактериофагам. Из той же серии образцов, из которой были выделены данные бактериофаги, нами была получена серия полевых изолятов *E. coli*. Среди них в дальнейшем были обнаружены штаммы 4S, HS1/2 и HS3-104, способные поддерживать рост исследуемых фагов.

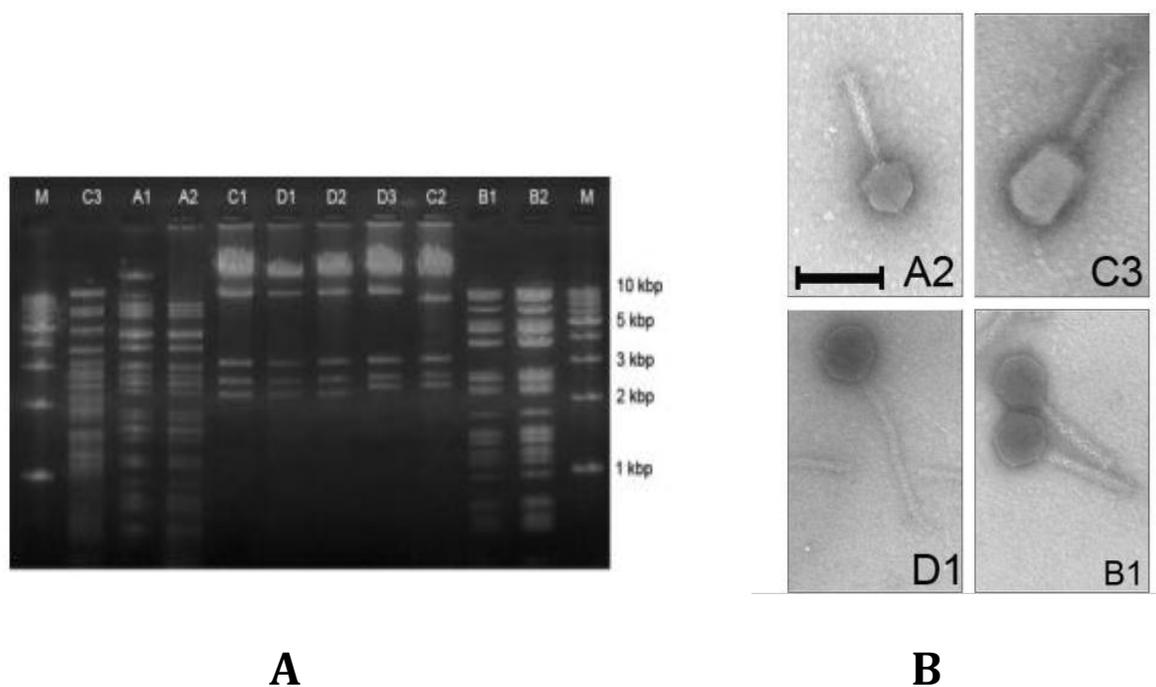
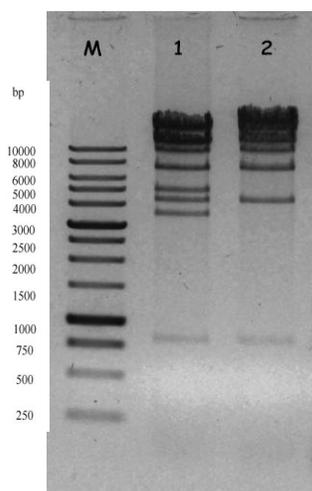
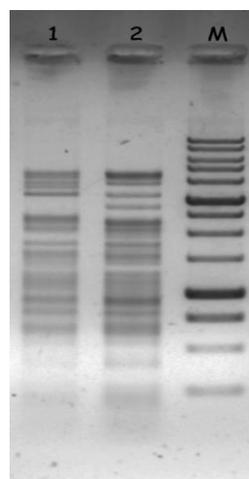


Рис. 1. (А) Рестрикционный анализ ДНК фагов с помощью рестриктазы *EcoRV*. М – 1 kb маркер (Сибэнзим); (В) Морфология 3 типов фагов (С3 – JS98-подобный (*Myoviridae*); А1-2, В1-2 – Felix01-подобные (*Myoviridae*); С1-2, D1-3 – Т5-подобные (*Siphoviridae*). Масштабная линейка 100 нм.



Hind III



Hae III

Рис. 2. 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).

В ходе работы по изучению спектра хозяев исследуемых фагов относительно серии полевых изолятов *E. coli* мы обнаружили, что культура фага D1 содержала примесь другого бактериофага, несмотря на очистку путём повторного выделения отдельной бляшки. Вирусы удалось разделить при посеве на штамм 4S, на котором эффективность посева исходного лизата D1 была близка к 1 (по отношению к штамму С600), и на штамм HS1/2, на котором эффективность посева составляла около 10^{-6} . В результате выделенный на штамме 4S фаг был назван DT57C, а изолят, выделенный на штамме HS1/2, получил наименование DT571/2. Рестрикционный анализ (ферменты HaeIII и HindIII) ДНК этих фагов показал, что они являются близкородственными, хотя и не идентичными (Рис. 2). Спектр хозяев этих бактериофагов оказался очень похож (Табл. 1). Оба фага образуют бляшки на лабораторных, лишённых О-антигена (rough), штаммах *E. coli*: С-600, BL21, JM109, Ве, Z85. В то же время эти фаги демонстрировали различия в хозяйском спектре по отношению к природным штаммам *E. coli* (HS1/2 и 4S), выделенным из образцов фекалий лошадей, собранных от тех же самых животных.

Табл. 1. Оценка хозяйского спектра фагов DT57C и DT571/2 на разных штаммах *E. coli*.

	Природные изоляты						Лабораторные штаммы			
	4S	HS3-104	HS1/2	4/2	9SM	5S	С-600	BL21	Z85	NM522
DT57C	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
DT571/2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-

Фаг DT57C образовывал бляшки на *E. coli* 4S (серотип O22 с дополнительным гликозилированием), который ранее был описан как уникальный хозяин для N4-подобного бактериофага G7C (Kulikov et al., 2012), но не на штамме HS1/2 (серотип O87). Фаг DT571/2, напротив, инфицировал клетки штамма HS1/2, но не штамм 4S. И тот, и другой фаг могли расти на культуре *E. coli* HS3/104, которая продуцирует O-антиген типа O81. Также оба фага способны инфицировать производные штамма *E. coli* 4S, устойчивые к бактериофагу G7C. Эти штаммы являются дефицитными по O-ацетилированию или биосинтезу O-АГ (Knirel et al., 2015).

Табл. 2. Эффективность роста бактериофагов и их мутантов на различных хозяйских штаммах *E. coli*.

Бактериофаги	Штаммы <i>E. coli</i>							
	4S	4SR	4SltfAR	4SI	4SI:pwclK	HS1/2	C-600	HS3/104
BF23	-	+	-	+	-	-	+	-
DT571/2	-	+	-	+	-	+	+	+
DT5712 ltfA am	-	+	-	+	-	-	+	-
DT5712 ltfB opal	-	+	-	+	-	10 ⁻¹ b	+	10 ⁻⁵ a
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; a – эффективность посева 10⁻⁵ (формируются бляшки нормальной морфологии); b – в свежем лизате наблюдалась эффективность образования бляшек около 10⁻¹, бляшки очень маленькие и мутные.

2. Полные геномные последовательности бактериофагов DT57C и DT571/2

Геномы бактериофагов DT57C и DT571/2 были секвенированы, аннотированы и депонированы в GenBank (KM979354.1 и KM979355.1). Длина уникальной последовательности генома DT57C составила 108065 п.н., а для DT571/2 108418 п.н. Сходство нуклеотидных последовательностей между двумя фагами составило более 96% (100% в большей части генов). При этом уровень совпадения геномов исследуемых фагов и генома бактериофага T5 значительно ниже; так например, фаги DT57C и T5 имеют около 71% идентичных нуклеотидных позиций. Таким образом, в соответствии с принятым международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) критерием выделения видов бактериофагов (<95% идентичности геномных последовательностей) был предложен новый вид DT57C в составе рода *T5virus* подсемейства *Tunavirinae* семейства *Siphoviridae* порядка *Caudovirales* (talk.ictvonline.org/taxonomy/). Фаг DT571/2 был описан в качестве штамма вида DT57C.

Организация геномов фагов DT57C и DT571/2 оказалась в целом сходной с организацией генома фага T5. Последовательности большинства структурных белков оказались практически идентичными. Различия в последовательностях геномов исследуемых изолятов и фага T5 связаны в основном с латеральным переносом генов с неизвестными функциями, хоминговыми нуклеазами, а также с рядом генов адсорбционного аппарата (см. ниже).

3. Генетический и функциональный анализ адсорбционного аппарата

3.1 Определение конечного рецептора для исследуемых бактериофагов

Определение полных последовательностей геномов фагов DT57C и DT571/2 позволило идентифицировать гены белков, потенциально вовлеченных в распознавание клетки-хозяина. В частности, было выяснено, что оба исследуемых изолята имели нефибриллярный рецептор-узнающий белок Pb5 (*hrs*), сходный по последовательности с соответствующим белком бактериофага BF23. Аминокислотные последовательности Pb5 фагов BF23 и T5 имели уровень сходства 31%. Ранее показано (Guterman et al., 1975), что белок Pb5 фага BF23 распознает белок мембраны VtuB, ответственный за транспорт цианокобаламина, а Pb5 фага T5 связывается с другим транспортером FhuA, осуществляющим перенос сидерофоров (Braun et al., 1973; Breyton et al., 2013). Белок Pb5 фагов DT57C и DT571/2 по первичной структуре ближе к белку Pb5 (*hrs*) фага BF23, однако в его последовательности имеются обширные участки, существенно отличающиеся от фага BF23 (Рис. 3). В то же время соседний ген *lpr* практически идентичен гену *lpr* бактериофага BF23 как на нуклеотидном, так и на белковом уровне (присутствует всего одна аминокислотная замена) (Рис. 4). Ген *lpr* кодирует липопротеин, блокирующий рецепторы инфицированной фагом клетки, что исключает суперинфекцию (Braun et al., 1994; Mondigler et al., 2006). Эти белки существенно отличаются у фагов T5 и BF23 и блокируют белки внешней мембраны FhuA и VtuB, являющиеся рецепторами этих вирусов.

Для установления рецептора, узнаваемого белком Pb5 исследуемых изолятов, мы клонировали ген *lpr* 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), чувствительный к фагам DT57C, DT571/2, BF23 и T5. На полученные таким образом газоны производили посевы тестируемых фагов нанесением капель различных разведений соответствующих лизатов (спот-тест). В результате было выяснено, что белок Lpr фага DT57C подавлял инфекцию клеток фагами DT57C и DT571/2, а также фагом BF23 более чем в 100 раз, но не влиял на инфекцию фагом T5. Этот результат свидетельствует о том, что полученные изоляты используют тот же самый рецептор, что и фаг BF23, а именно – белок VtuB.

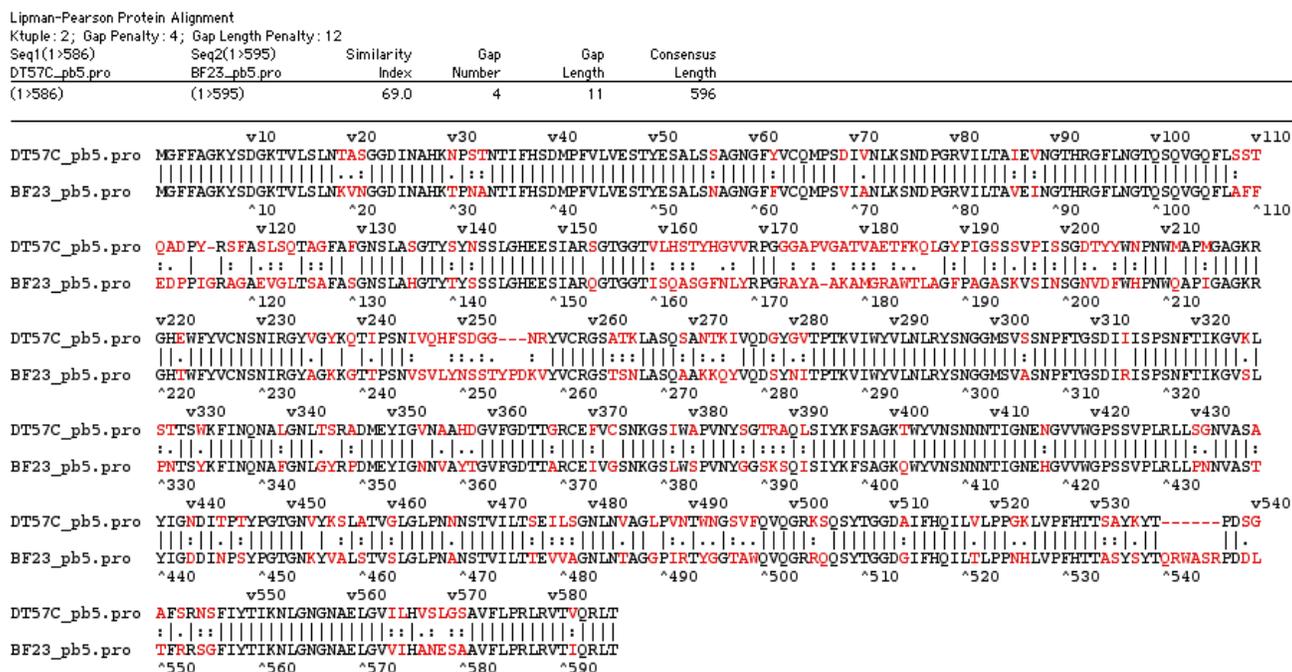


Рис. 3. Выравнивание последовательностей белка Pb5 (*hrs*) бактериофагов DT57C и BF23.

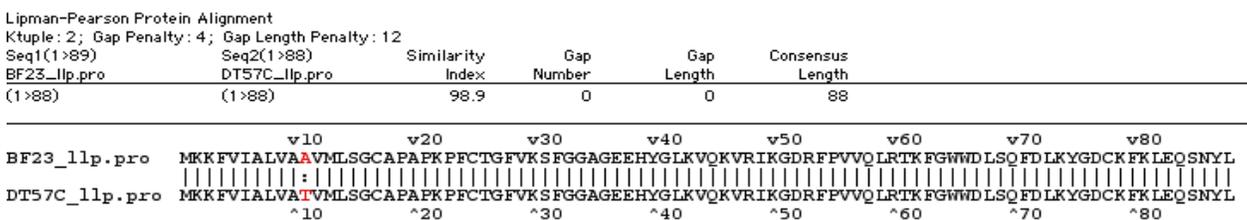


Рис. 4. Выравнивание последовательностей белка Llp (*llp*) бактериофагов DT57C и BF23.

Еще одно подтверждение того, что конечным рецептором исследуемых бактериофагов является белок VtuB, было получено в эксперименте по отбору устойчивых к фагу BF23 мутантов штамма *E. coli* C600, оказавшихся устойчивыми к бактериофагам DT57C и DT571/2, но не к фагу T5. Так же были отобраны мутанты штамма *E. coli* 4SI (rough производное штамма 4S; Knirel et al., 2015), устойчивые к мутантному фагу DT571/2 ltfA⁻. Фаг DT571/2 ltfA⁻ полностью лишен латеральных хвостовых фибрилл (см. ниже) и, в соответствии с современными представлениями о механизме инфекции T5-подобных бактериофагов, заражает хозяйские клетки только в результате прямого взаимодействия рецептор-узнающего белка Pb5 (*hrs*) с конечным клеточным рецептором. Полученные устойчивые клоны *E. coli* 4SI (n=24) проверяли на чувствительность к бактериофагу BF23: все штаммы оказались устойчивы. Так как отличий в фенотипе между этими клонами не наблюдалось, они были обозначены как 4SI ltfA^R. Секвенирование гена *btuB* у двух случайно выбранных клонов 4SI ltfA^R показало наличие большой делеции в одном случае и

инсерцию мобильного IS-элемента в другом. Оба события приводят к инактивации гена (последовательности депонированы в GenBank под номерами KU291215.1, KU291214.1). Для подтверждения распознавания фагом именно белка *BtuB* была поставлена комлементация. Ген данного белка дикого типа штамма *E.coli* 4SI был амплифицирован. Этот ПЦР-фрагмент был клонирован в вектор pGem-T, проведен отбор конструкции с ориентацией вставки под контролем лактозного промотора. Трансформирование штамма 4SI *ltaA^R* полученной плазмидой привело к полному восстановлению фенотипа по чувствительности к бактериофагу. Сопоставляя полученные данные, можно заключить, что бактериофаги DT57C и DT57-1/2 используют в качестве вторичного рецептора белок *BtuB*.

Секвенирование гена *btuB* штаммов *E. coli* HS3-104, HS1/2, 4S и C-600, показало, что аминокислотные последовательности этого белка не отличались друг от друга и от большинства опубликованных геномов *E. coli*. Кроме того, как отмечено выше, последовательности *Pb5* исследуемых фагов были также идентичны. Таким образом, различие в спектре хозяев фагов DT57C и DT571/2 не связаны с распознаванием ими конечного рецептора.

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 *ltaA* и *ltaB*. В отличие от фагов DT57C и DT571/2, у бактериофагов T5 и BF23 в геноме присутствует только один такой ген (g143 или *lta*).

Анализ опубликованных аннотированных геномов T5-подобных бактериофагов показал, что часть вирусов, близкородственных T5, хозяевами которых являются энтеробактерии (*phiR201*, *SPC35*, *118970_sal2*, *Akfv33*, *LVR16A* и др.) обладают двумя генами *lta*, в то время как у других представителей этого рода (T5, BF23, EPS7, *slur09*, *vb_Kpn_IME260* и др.) присутствует только один белок *Lta*. При этом N-концевые домены белка *Lta* фага T5 и подобных ему вирусов гомологичны N-концевой части белка *LtaA* фагов DT57C и DT571/2. Таким образом, фаги DT57C и DT571/2 обладают новым (не охарактеризованным в структурном и функциональном отношениях) и при этом распространенным среди T5-подобных бактериофагов типом организации латеральных фибрилл хвоста.

Белки *LtaB* практически идентичны у фагов DT57C и DT571/2, за исключением короткого фрагмента, расположенного на N-конце между аминокислотными остатками 65 и 90 (координаты приведены для фага DT57C).

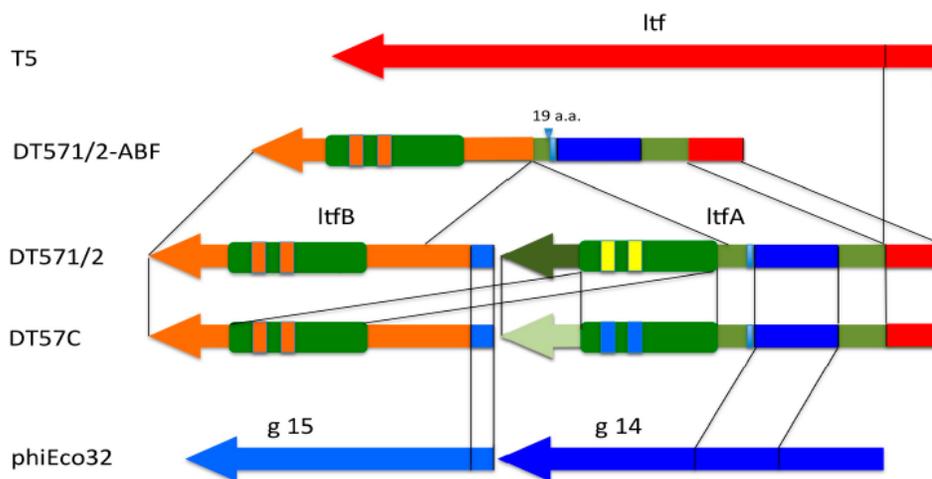


Рис. 5. Схема организации латеральных хвостовых фибрилл бактериофагов T5, DT57C, DT57-1/2, DT571/2-ABF и phiEco32 (частично). Сравнение аминокислотных регионов в белке Ltf T5 подобных бактериофагов с другими вирусами отмечено различными цветами. Зелёными прямоугольниками с двойными полосками отмечены 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.

N-концевая часть генов *ltfA* у исследуемых 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. 5).

В тоже время белки LtfA фагов DT57C и DT571/2 обладают протяжённой областью расхождения в аминокислотной последовательности на C-конце (Рис. 5). В средней части белка LtfA и на N-конце белка LtfB имеются участки гомологии с белками gp14 и gp15 фага phiEco32 (Рис. 5). У phiEco32 эти белки взаимодействуют друг с другом, формируя разветвлённую фибриллу (личное сообщение П. Г. Леймана, Техасский Университет, США). Можно предположить, что белки LtfA и LtfB исследуемых 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 гомологичных с белками фага T5.

Анализ последовательностей белков LtfA и LtfB с помощью программы BlastP (ncbi.nlm.nih.gov) обнаружил присутствие в их C-концевой области консервативного шаперонного домена, потенциально способного к автокаталитическому отщеплению. Сравнительный анализ последовательностей белков исследуемых бактериофагов с белками, для которых автопротеолитический процессинг таких доменов был подтверждён экспериментально (Muhlenhoff et al., 2003), позволил предсказать сайт протеолиза (Рис. 6).

Lipman-Pearson Protein Alignment
 Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12
 Seq1(1>1076) DT57C_ltfA.pro (1>1068)
 Seq2(1>1039) DT571/2_ltfA.pro (1>1039)

Similarity Index	Gap Number	Gap Length	Consensus Length
72.1	15	33	1070

```

DT57C_ltfA.pro      v120 v130 v140 v150 v160 v170 v180 v190 v200 v210 v220
ADNSAASAQESGFRD SAE LAAQNAEQSRLLAEQAKTAAQQAQTAAEAAKTGAETAKDGADAAATPAGEHAAAARQSELNAK ISETNAAGSATEAGDKAIDATTEADRAK
DT571/2_ltfA.pro   ADNSAASAQESGFRD SAE LAAQNAEQSRLLAEQAKTAAQQAQTAAEAAKTGAETAKDGADAAATPAGEHAAAARQSELNAK ISETNAAGSATEAGDKAIDATTEADRAK
DT57C_ltfA.pro      ^120 ^130 ^140 ^150 ^160 ^170 ^180 ^190 ^200 ^210 ^220
AEADRATQ IVD SK LDKVD I S G F I K V Y K T K A E A D A D V V N R V L D E K V L V W N Q T N S K Y G W Y V A G T A E T P V L E L V E T E Q K L T S V N N V R A D D A G N V Q I T L P G G N P S L W L G E V I W
DT571/2_ltfA.pro   AEADRATQ IVD SK LDKVD I S G F I K V Y K T K A E A D A D V V N R V L D E K V L V W N Q T N S K Y G W Y V A G T A E T P V L E L V E T E Q K L T S V N N V R A D D A G N V Q I T L P G G N P S L W L G E V I W
DT57C_ltfA.pro      v230 v240 v250 v260 v270 v280 v290 v300 v310 v320 v330
^340 ^350 ^360 ^370 ^380 ^390 ^400 ^410 ^420 ^430 ^440
FPYDKDSGVGYPGVLPADGREVLRVDYFDTWEAIEAGLIPVSEAEWQAGASLYFSTGDSSTFFRLPDMMDGQAFRAPTKGEEDAGVIKQDIPYVVVTWNGISPDAITGNV
DT571/2_ltfA.pro   FPYDKDSGVGYPGVLPADGREVLRVDYFDTWEAIEAGLIPVSEAEWQAGASLYFSTGDSSTFFRLPDMMDGQAFRAPTKGEEDAGVIKQDIPYVVVTWNGISPDAITGNV
DT57C_ltfA.pro      v450 v460 v470 v480 v490 v500 v510 v520 v530 v540 v550
EIDTSLQGTVSNQGGTGATTKEDEARALELYSTTEVDSALADKADIATTYTKMEVDSALADKADIATTYTKMEVDSALADAKTQSDTIDYLLKANNLSDLADRAAAWLN
DT571/2_ltfA.pro   EIDTSLQGTVSNQGGTGATTKEDEARALELYSTTEVDSALADKADIATTYTKMEVDSALADKADIATTYTKMEVDSALADAKTQSDTIDYLLKANNLSDLADRAAAWLN
DT57C_ltfA.pro      ^450 ^460 ^470 ^480 ^490 ^500 ^510 ^520 ^530 ^540 ^550
RPIGSTPLAGDIPVGYDAVTKRWVENKINIGTVGPTMNGVMYGVGDHFLRDSRAYTQPYEVVSDGQLLNRADWPELWYAQMLSPTSDADWLADFNWNRHYSISDGSSTI
DT571/2_ltfA.pro   RPIGSTPLAGDIPVGYDAVTKRWVENKINIGTVGPTMNGVMYGVGDHFLRDSRAYTQPYEVVSDGQLLNRADWPELWYAQMLSPTSDADWLADFNWNRHYSISDGSSTI
DT57C_ltfA.pro      v560 v570 v580 v590 v600 v610 v620 v630 v640 v650 v660
FRVPDRNGVITGSI S A L F G R G D G G A S S T G T I I L D S A A P N I T S S P G R L V Y A S T G T I V E A N I G V G A F S A V L S Q A K Y K R L S E I S A A D G T A A T Y P S G F F F A S N S S P V Y G R G S T
DT571/2_ltfA.pro   FRVPDRNGVITGSI S K G L P G R G D A G N Y G G I I E N G L P I S D D T S Y L A G A P S G A F A S S N N G T S A I S I S N A E G S N A R Y N T Y T F R A S R V N A A Y G R A S
DT57C_ltfA.pro      ^670 ^680 ^690 ^700 ^710 ^720 ^730 ^740 ^750
SVREKATDQWVWRASGGFVAANTSWSVINGDATR PADGTADGGEIISRINVNGVREAGMSWRIRAOIGAEHYARLNVMYNAITANRTAVYD FMDLGT FSAENLHSGKAI
DT571/2_ltfA.pro   SVRENSFVGVVWRASGGFVAANTSWSVINGDATLP PATTSVTGGRVTESEVRVGGQLEGSADFRVMVGTIGGTYAARISVNSVTLGVTRSFDMNSGGDLVTPGMNIAKNGNI
DT57C_ltfA.pro      v880 v890 v900 v910 v920 v930 v940 v950 v960 v970 v980
YSDGNLTIQNGWPGINFKSNRYNTPATQIGGSTILEVSGTIDGNVSGVNLIRRGDGNQAGLIIVSFPITGGAIALQGTSGIEYKDVTD-ADAQEAMDRINGORLVNFV
DT571/2_ltfA.pro   ----VRITGSGSYTSGF--LDVFSFGMAYGRVYSERNIDMTIMTSVSGSTPR----YFVFMQA-GNAVCPGGWSTSTDERIKEDVVRIPDPLGANRTIKG---VSWR
DT57C_ltfA.pro      v990 v1000 v1010 v1020 v1030 v1040 v1050 v1060
YKDEQERVRVRFVLEEAELIAQYIKHNQVSYEDILDEEGNKIQEKTDRRPSVDVNPVIMDLMSGVQALIKKTALEAR
DT571/2_ltfA.pro   VKQDNSKR-NYGFIAQDVENRFDAIFNAGSMNLRDGEVVPDVKGVDTYGVAAALHHEAILALMDKVEALEAKITELEAK

```

Рис. 6. Выравнивание последовательностей белка LtfA (*ltfA*) бактериофага DT57C и фага DT571/2. Цветом выделен участок, контролирующий специфичность рецептор-узнающего домена. Стрелкой обозначен предсказанный сайт протеолиза при автокаталитическом отщеплении С-концевого шаперонного домена.

Для подтверждения факта автокаталитического процессинга белка LtfA и LtfB фага DT571/2 были клонированы в вектор pET32a под контролем промотора T7. Анализ экспрессии рекомбинантных белков с помощью ДСН-ПААГЭ обнаружил присутствие двух форм каждого из них, отличающихся по электрофоретической подвижности (Рис. 7). Предсказанные молекулярные массы белков соответствуют ожидаемым величинами для процессированной и непроцессированной форм.

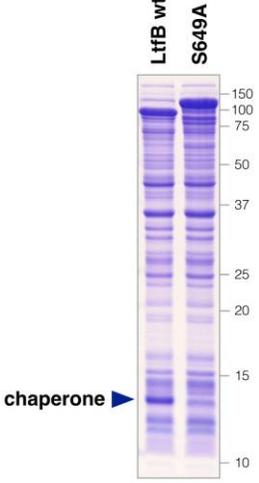


Рис. 7. Автокаталитический процессинг белка LtfB фага DT571/2. Мутация S649A нарушает предсказанный сайт автокаталитического процессинга.

3.3 Роль гена *ltfA* в детерминации хозяйской специфичности бактериофагов DT57C и DT571/2

Дивергентные области генов *ltfA* фагов DT57C и DT571/2 клонировали вместе с фланкирующими последовательностями, которые идентичны у обоих фагов, для получения плазмид *pltfA-7C*, *pltfA-71/2*. С помощью рекомбинации с этими плазмидами были получены фаги, которые изменили хозяйский спектр, переключившись на фенотип фага – донора соответствующей последовательности в плазмиде. Такие рекомбинанты были обнаружены с плазмидами *pltfA-7C* (для фага DT571/2) и *pltfA-71/2* (для фага DT57C) с частотой около 10^{-4} . Секвенирование соответствующего локуса у двух изолятов подтвердило перенос части дивергентной области (Рис. 6, 9).

3.4 *LtfA* мутанты

В ходе работы было замечено, что при культивировании фага DT571/2 на штамме *E. coli* C600 около 30% бактериофагов спонтанно теряли способность инфицировать клетки хозяина – *E. coli* HS1/2. На основании этих данных был отобран 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 БОЕ/мл. Схожий фенотип наблюдался и на штамме *E. coli* HS3-104. Секвенирование генома мутантного фага показало делецию трёх нуклеотидов в рамке, которая привела к удалению аминокислотного остатка A198 в белке *LtfA*. Рекомбинация с плазмидой, содержащей исходный тип последовательности этого региона, восстановила способность фага нормально инфицировать штамм *E. coli* 4S.

Высокая частота спонтанных мутантов была препятствием для отбора искусственных амбер-мутантов по гену *ltfA* методом рекомбинации с плазмидной конструкцией. Однако постановка рекомбинации фага DT571/2 с плазмидой *pltfA-S23am* в клетках штамма *E. coli* HS1/2 позволило снизить фон спонтанных мутаций и отобрать фаг, содержащий мутацию *ltfA S23am*. Этот мутант был не способен инфицировать *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. 2).

3.5 Функция белка *LtfB*

Рекомбинация изучаемых бактериофагов с плазмидами *pltfB-7C* и *pltfB-71/2*, содержащими дивергентный участок гена *ltfB* и консервативные фланги, не привела к появлению вирусов с измененным спектром хозяев. Это свидетельствует о том, что дивергентная часть белка *LtfB* не важна для узнавания фагом хозяйской клетки. Данный результат был ожидаем, поскольку различающийся участок аминокислотной последовательности находится в N-концевой части белка. Для установления функции белка

LtfB был сконструирован мутант фага DT571/2 *ltfB* Q45opal. 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 был идентифицирован, очищен и подтверждён секвенированием гена *ltfB*. Этот мутант потерял способность расти на штамме *E. coli* HS3-104 (Табл. 2; наблюдаемая эффективность посева около 10^{-5} связана со спонтанным 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 приводила к снижению его жизнеспособности (Табл. 2) при посеве на штамм *E. coli* HS1/2, продуцирующий О-антиген типа О87, а на штамме *E. coli* HS3-104 (О81) данный фаг переставал размножаться совсем. Мутант *ltfA* полностью терял способность инфицировать оба эти штамма. Инактивация фибриллы LtfB не приводила к изменениям эффективности инфекции ни на лабораторных rough штаммах (*E. coli* С600, BL21), ни на мутантных штаммах *E. coli* 4SR и 4SI. Эти результаты позволяют заключить, что функция LTF не является необходимой при инфицировании штаммов, лишённых протективного слоя О-антигена. Электронная микроскопия фага DT571/2 *ltfB* opal показала полное отсутствие у него каких-либо латеральных хвостовых фибрилл (Рис. 8). Морфология фага DT571/2 *ltfB* opal не отличалась от морфологии вириона *ltfA* am. Этот результат говорит о том, что большая часть вирусных частиц в очищенном препарате фага, использованном для микроскопии, не содержит LTF, что согласуется с выше приведёнными данными по эффективности посева фага.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что белок LtfB необходим для распознавания рецептора на клетках HS3-104 (О81), тогда как LtfA необходим для узнавания поверхности клеток штаммов 4S (О22) или HS1/2 (О87) у фагов DT57С или DT571/2 соответственно. Отсутствие синтеза белка LtfB приводило к нестабильности фибриллы, сформированной LtfA, из-за того, что сайт присоединения LtfB оставался свободным.

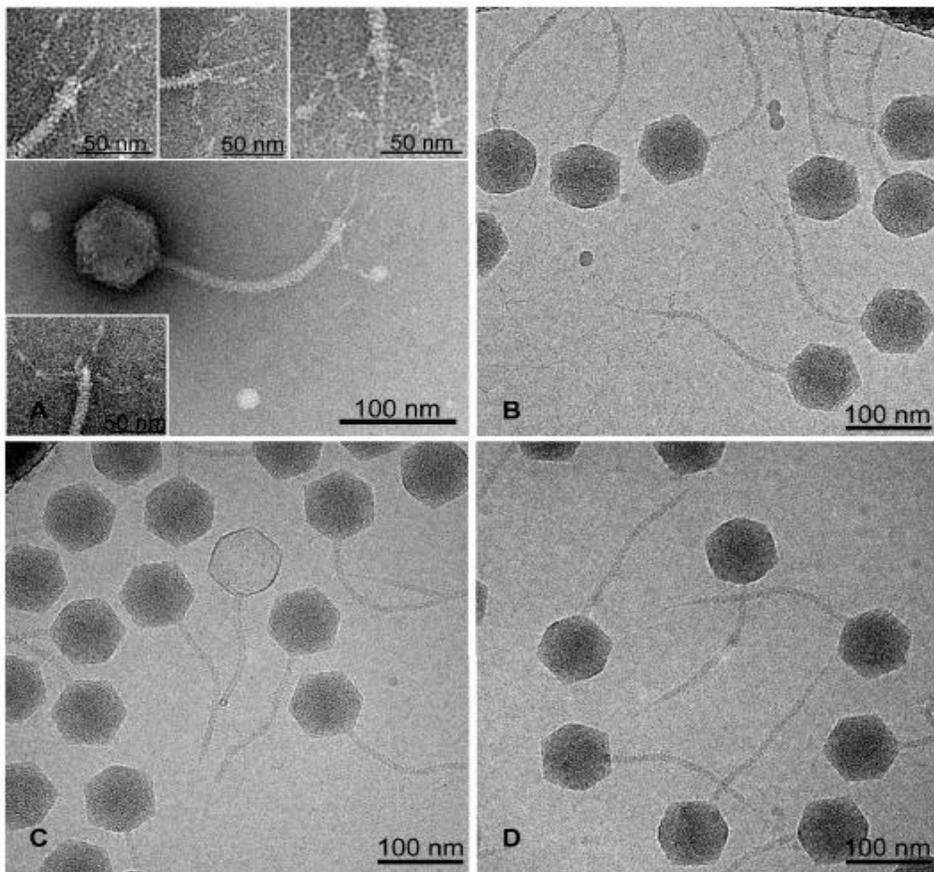


Рис. 8. Морфология фага DT571/2 и его *ltf* мутантов. **А.** дикий тип, негативное окрашивание; **В.** дикий тип, крио-ЭМ; **С.** *ltfA*⁻, крио-ЭМ; **Д.** *ltfB*⁻, крио-ЭМ.

3.6 Уровень генетической изменчивости локуса *ltf*

Последовательности *ltf* локуса фага DT530, который принадлежит к той же серии изолятов, что и фаги DT57С и DT571/2, была почти идентична последовательности фага DT57С, однако в ней наблюдалась 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*. Спонтанный мутант фага DT530, не способный инфицировать клетки хозяина – *E. coli* 4S, был отобран при культивировании на лабораторном штамме *E. coli* С600. При повторном секвенировании локуса *ltf* фага DT530 из первичного лизата, сохранившегося в коллекции, полученная последовательность была очень близка к локусу *ltf* фага DT57С и содержала два отдельных гена *ltfA* и *ltfB*. Бактериофаг с делецией был назван DT530(1). У фага DT530(1) делеция, по-видимому, приводит 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.

С-концевые области генов *ltfA* и *ltfB* фагов DT57С и DT571/2 содержат протяжённые участки гомологии на аминокислотном и нуклеотидном уровне. Это сходство более ярко

выражено у фага DT57C (Рис. 9), но присутствует и у DT571/2. Эти участки гомологии перемежаются с сильно различающимися фрагментами, вероятно отвечающими за формирование различных рецептор-связывающих центров данных белков. Наличие длинных прямых нуклеотидных повторов в генах *ltfA* и *ltfB* позволяет ожидать, что локус *ltf* может быть генетически нестабильным из-за частых рекомбинаций между этими повторами. Эта нестабильность должна быть особенно выражена у фага DT57C, так как уровень гомологии между двумя генами LTF у него выше.

Мы предположили, что с высокой вероятностью у фагов могут возникать супрессорные мутации, стабилизирующие LTF, которые состоят из химерного белка LtfA-LtfB, возникающего в результате делеций. Для доказательства 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.

LTFB_7C	179	NGTWGVYSDTE-NEWLALPVEQGGTG-----VNNREALWDVVRPQGSTPLAGDPV	227
		+ Y+ E+ LA Q T +R A W VRP GSTPLAGDPV	
LTFA_7C	505	D-IATTYTKVEVDSALADAKTQSDTDYLLKANLSDLADRAAWLNVVRPIGSTPLAGDPV	563
LTFB_7C	228	GDYDAVTKRWVENKINTGTVGPTMNGVMNYGVGDFHLRDSRAYIQPYEVVSDGQLLNRAD	287
		GDYDAVTKRWVENKINTGTVGPTMNGVMNYGVGDFHLRDSRAYIQPYEVVSDGQLLNRAD	
LTFA_7C	564	GDYDAVTKRWVENKINTGTVGPTMNGVMNYGVGDFHLRDSRAYIQPYEVVSDGQLLNRAD	623
LTFB_7C	288	WPELWAYAQLMSPISDATWLANPVRGKYSTGDGTTFRVPRDRNGVQPGSIFGLFCRGGD	347
		WPELWAYAQLMSPISDA WLA+P +RG+YS GDG+TFRVPRDRNGVQ GSI LF RGDG	
LTFA_7C	624	WPELWAYAQLMSPISDADWLADPTKRGQYSLGDGSTFRVPRDRNGVQTSISALFGRGGD	683
LTFB_7C	348	QSGNDGYIYESGAPNITG---RVELHGGGSASITNGESGAFHGSGGADSQYRTPSNLTV	404
		G S G I +S APNITG R+ G+ N +GAF + ++Y+ S ++	
LTFA_7C	684	GASSTGGTILDSAAPNITGSGFGRLLVYASTGTIYEANTGTGAFSAVL-SQAKYKRLSEISA	742
LTFB_7C	405	SSG-AVSYGI-INLDASRVSAIYGRVTVELRPNNFMGVVWIRASGGFVAANTSWSVINGD	462
		+ G A +Y AS S +YGR TE+RP F GVWVIRASGGFVAANTSWSVINGD	
LTFA_7C	743	ADGTAATYPSGFEPFASNSPPVYGRGSTEVRPKAFTGVVWIRASGGFVAANTSWSVINGD	802
LTFB_7C	463	ATRPANGTIAQGGNIFSLYKISGANEAASFARADIGGNYSARISVTNSTQRSANLDF	522
		ATRPA+GT A GG I S Y ++G EA+ S+ RA IG + AR++V N+T R+A DF	
LTFA_7C	803	ATRPADGTADGGEIISRYNVNGVREAQMSWRIRAQIGAEHYARLNVYNATANR+TAVYDF	862
LTFB_7C	523	DETGKLTIPNSIVNSVNSD---FDGVCWADSADKVRWRMGINDASGNFKLQSYDASGA	578
		++ G + N ++ SD W GIN S + + G+	
LTFA_7C	863	NDLGTFSAENLHSGKAIYSDGNLTIQNGWP-----GINFKSNRYNTPATQIGGS	912
LTFB_7C	579	YRDTVVEIPGAGTGGVWARDITIRPTFDGPVKSFVLHNAKDSVPAGNFRMTWDSVNINS	638
		T++E+ G TDG N++	
LTFA_7C	913	---TIIEVSG-----TDG-----NVSG	926
LTFB_7C	639	NQIYKYFEKNGTG-ITINWPSSGGVLALQGT [^] GRDFKKDIVNADVTEAVARIEQMRMVN	697
		+ + GN G I +++P++GG +ALQGT [^] G ++KKD+ +AD EA+ RI R+VN	
LTFA_7C	927	VNLIRRRRQDGNQAGQIIVSFPTTGGATIALQGT [^] GIEYKKDVTDADAQEAMDRINGQRLVN	986
LTFB_7C	698	VYKDDVQERVRFGIIAEEAEAIAPQYIKHREETYDVEVDPETNAIIGGKTRDRPSVDVN	757
		+VYKDD QERVRFG+IAEEAE IAPQYIKH + +Y+ +D E N IG KTRDRPSVDVN	
LTFA_7C	987	FVYKDDQERVRFGVIAEEAEELIAPQYIKHNQVSYEDILDEEGNK-IGEKTRDRPSVDVN	1045
LTFB_7C	758	PIVMDLMGCVQYLNKQIEDLKAIEIAALKA 786	
		PIVMDLMGCVQ LN +I L+A IA L++	
LTFA_7C	1046	PIVMDLMGCVQALNAKIAALEARIAELES 1074	

Рис. 9. Выравнивание последовательностей белков LtfA (*ltfA*) и LtfB (*ltfB*) бактериофага DT57C. Цветом выделен участок, контролирующей специфичность рецептор-узнающего домена по данным анализа рекомбинантов по гену *ltfA*. Знак "^" обозначает участок протеолитического процессинга.

Секвенирование локуса *ltf* показало делецию большого участка от 71916 до 74004 п. н. (координаты даны по исходной последовательности DT571/2), что приводит к объединению аминокислотных остатков 1-663 белка LtfA и аминокислотных остатков 288-767 LtfB в единую полипептидную цепь (Рис. 5). Во 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, которая, как предполагалось выше, формирует участок присоединения фибриллы LtfB. Таким образом, можно предположить, что дублирование этого небольшого участка аминокислотной последовательности компенсирует дестабилизирующий эффект вакантного сайта присоединения белка LtfB, что приводит к стабилизации химерной фибриллы с рецептор-узнающим участком из белка LtfB. Независимо от механизма стабилизации фибриллы, фенотип фага DT571/2-ABF полностью соответствует заключениям о специфичности белков LtfA и LtfB.

Заключение

Важным следствием из предложенной модели инфекции T5-подобными бактериофагами является то, что связывание с первичным рецептором (в случае вирусов DT57C и DT571/2 с O-антигеном) – это единственная функция LTF. При этом никаких ограничений на способ этого взаимодействия не накладывается. Ингибирование адсорбции фага очищенными ЛПС, наблюдаемое в экспериментах, было незначительным (в отличие от результатов Heller K. и Braun V. (1979)). Низкое сродство к первичному рецептору может указывать на то, что проникновение фага к его вторичному рецептору при первоначальном взаимодействии с клеткой является быстрым процессом, и слишком длительное удерживание вириона на поверхности клетки-хозяина, опосредуемое только LTF, не является необходимым для успешной инфекции. Это создаёт возможность простой искусственной манипуляции спектром хозяев T5-подобных бактериофагов, в частности для использования их в качестве агентов фаговой терапии нового поколения.

Полученные в работе 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 распространены у различных бактериофагов, включая профаги в штаммах с известными типами O-антигена, так и использовать гетерологичные рецептор-связывающие домены из фибриллярных адгезинов любых бактериофагов.

Самопроизвольная конверсия двухгенного локуса *ltf* в моногенный, происходящая с высокой частотой в лабораторных условиях, 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 этого локуса у T5-подобных бактериофагов. По-видимому, это давление

связано с тем, что высокое внутривидовое разнообразие популяции *E. coli* в кишечнике лошадей (Golomidova et al., 2007; Исаева с соавт., 2010) уменьшает долю клеток, восприимчивых к инфекции, и делает адаптивным для вируса расширение спектра хозяев за счет одновременной экспрессии двух разных рецептор-узнающих белков.

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 BtuB.
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 работ, опубликованных по материалам диссертации

Экспериментальные статьи

1. **Golomidova A.K.**, Kulikov E.E., Isaeva A.S., Manykin A.A., Letarov A.V. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions // *Appl Environ Microbiol.* – 2007. – V. 73. – № 19. – P. 5975-5981.
2. Летаров А.В., **Голомидова А.К.**, Тарасян К.К. Экологические основы рациональной фаговой терапии // *Acta naturae.* – 2010. – Т. 2. – №1. – С. 66-79.
3. **Golomidova A.K.**, Kulikov E.E., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R.C., Ksenzenko V.N., Tarasyan K.K., Letarov A.V. Complete genome sequences of T5-related *Escherichia coli* bacteriophages DT57C and DT571/2 isolated from horse feces // *Arch Virol.* – 2015. – V. 160. – № 12. – P. 3133-3137.
4. 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.**, Letarov A.V. Variations in O-antigen biosynthesis and O-acetylation associated with altered phage sensitivity in *Escherichia coli* 4S // *J Bacteriol.* – 2015. – V. 197. – № 5. – P. 905-912.
5. Zdrovenko E.L., **Golomidova A.K.**, Prokhorov N.S., Shashkov A.S., Wang L., Letarov A.V., Knirel Y.A. Structure of the O-polysaccharide of *Escherichia coli* O87 // *Carbohydr Res.* – 2015. – V. 412. – P. 15-18.
6. **Golomidova A.K.**, Kulikov E.E., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R.C., Knirel Y.A., Kostryukova E.S., Tarasyan K.K., Letarov A.V. Branched lateral tail fiber organization in T5- like bacteriophages DT57C and DT571/2 is revealed by genetic and functional analysis // *Viruses.* – 2016. – V. 8. – № 1. – E26.
7. Zdrovenko E.L., Wang Y., Shashkov A.S., Chen T., Ovchinnikova O.G., Liu B., **Golomidova A.K.**, Babenko V.V., Letarov A.V., Knirel Y. A. 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).* – 2018. – V. 83. – № 5. – P. 534-541.

Тезисы конференций

1. Letarov A.V., **Golomidova A.K.**, Isaeva A.S., Kulikov E.E., Manykin A.A. How many coliphages can ride the same horse? 17th Evergreen International Phage Biology Meeting – August 12-17, 2007. Evergreen State College, WA, USA, p.82.
2. **Golomidova A.K.**, Isaeva A.S., Kulikov E.E., Manykin A.A., Letarov A.V. A case report of antibiotic-induced dysbacteriosis in horse: the effect on coliform bacteria diversity. 17th Evergreen International Phage Biology Meeting – August 12-17, 2007. Evergreen State College, WA, USA, p.29.
3. **Голомидова А.К.**, Тарасян К.К., Прохоров Н.С., Летарова М.А., Летаров А.В. Разнообразие колифагов в микробном сообществе кишечника лошадей. VII международная молодежная школа-конференция "Актуальные аспекты современной микробиологии". Москва, 24-26 октябрь 2011г., с.13-15.
4. **Golomidova A.K.**, Tarasyan K.K., Kulikov E.E., Letarov A.V. Host range determinants in two T5-related coliphages isolated from horse feces. *Viruses of microbes III*, July 16-20, 2012, Royal military academy, Brussels, Belgium, p. 4.
5. Letarov A.V., **Golomidova A.K.**, Prokhorov N.S., Letarova M.A., Kulikov E.E., Manykin A.A., Isaeva A.S., Tarasyan K.K. The virome of the horse gut – a highly dynamic community dominated by virulent bacteriophages. *Viruses of microbes III*, July 16-20, 2012, Royal military academy, Brussels, Belgium, p. 132.
6. Letarov A.V., **Golomidova A.K.**, Prokhorov N.S., Kostryukova E.S., Letarova M.A. The genome dynamics of the N4- and T5-related coliphages in the horse intestinal ecosystem. *Viruses of microbes III*, July 14-18, 2014, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zurich, Switzerland, p. 243-244.

7. **Голомидова А.К.**, Прохоров Н.С., Куликов Е.Е., Летаров А.В. Организация адсорбционного аппарата двух близкородственных T5-подобных бактериофагов. Вторая научно-практическая конференция с международным участием “Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности”, Санкт-Петербург, 21-24 сентября 2014 г., с. 76.
8. Таланкина О.Н., **Голомидова А.К.**, Летаров А.В. Исследование воздействия бактериофагов на резидентные бактериальные популяции в кишечнике млекопитающих. Вторая научно-практическая конференция с международным участием “Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности”, Санкт-Петербург, 21-24 сентября 2014 г., с. 113-114.
9. Letarov A.V., **Golomidova A.K.**, Kulikov E.E., Guerrero-Ferreira R.C., Knirel Y. A. Genetic analysis of the adsorption devices in two T5-like bacteriophages. IVrd Symposium on Phages in interaction. Leuven, September 29th, 2015, p. 25.
10. Letarov A.V., **Golomidova A.K.**, Babenko V.V., Knirel Y.A., Kulikov E.E., Letarova M.A., Kostrukova E.S., Zdrovenko E., Prokhorov N.S., Belousoff R., Strelkova D. Enterobacterial O-antigens as a non-specific shield limiting phage infection. “100th Celebration of Bacteriophage Research”, Institut Pasteur, France, Paris 2017, p. 101.
11. **Golomidova A.K.**, Kulikov E.E., Belalov I.S., Letarov A.V. Looking for a novel T5-like phage receptor proteins. Viruses of microbes V, July 09-13, 2018, The University of Wrocław (UWr), Wrocław, Poland, p. 208.
12. **Golomidova A.K.**, Kulikov E.E., Belalov I.S., Letarov A.V. Gosty9 – a T5-like phage with a novel receptor specificity. Четвертая научно-практическая конференция с международным участием “Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности”, Нижний Новгород, 24-26 сентября 2018 г., с. 14.