

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМА НОВОГО КОЛИФАГА *PHIKT*, БЛИЗКОРОДСТВЕННОГО ФАГУ *CAULOBACTER CRESCENTUS CD1*

Куликов Е. Е. *, Тарасян К. К. *, Голомидова А. К. *, Прохоров Н. С. *,
Исаева А. С. *, Строцкая А. В. *, Татарский Е. В. *, Летарова М. А. *,
Кутузова Н. М. **, Клунова С. М. **, Летаров А. В. *

* ФГБУН «Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН», 113719,
г. Москва, пр. 60-летия Октября, 7/2, тел. +7(499)135-21-39, inmi@inmi.host.ru
** ФГБОУ ВПО «Московский государственный педагогический университет»,
119991, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1/1, тел. +7(499)245-03-10, biochem_trgu@mail.ru

Автор для корреспонденции Летаров А. В., letarov@gmail.com

Ключевые слова: геном бактериофага, *Caulobacter crescentus*, *Escherichia coli*, *phiKT*

Приведены результаты предварительного анализа генома нового вирулентного бактериофага *phiKT*, выделенного из фекалий лошади, и активного против кишечной палочки *Escherichia coli*. Показано, что новый фаг имеет высокое сходство ряда генов обмена нуклеиновых кислот и структурных генов с ранее описанным фагом *phiCD1*, инфицирующим подвижные формы значительно отдалённой от *E. coli* свободноживущей олиготрофной водной альфа-протеобактерии *Caulobacter crescentus*. Полученный результат показывает возможность значительного изменения спектра активности бактериофагов определённых групп путём модификации генов, лежащих вне «корового» участка генома фага, ответственного за репликацию вирусного генома, взаимодействие с макромолекулами клетки-хозяина, и структуру вирусной частицы.

Введение

В 2010 году сотрудниками лаборатории вирусов микроорганизмов ИНМИ РАН из фекалий лошади был выделен новый бактериофаг *phiKT*, обладающий типичной для подовирусов морфологией (типа фага T7), и проявляющий литическую активность против достаточно узкого спектра штаммов кишечной палочки *Escherichia coli*, выделенных параллельно из тех же образцов фекалий (штаммы 53 и 30/70) в рамках получения коллекции штаммов бактерий, обладающих различной устойчивостью к природным изолятам колифагов.

Материалы и методы

Свежие фекалии лошади, отобранные стерильно, разводили в соотношении 1+4 (масса/масса) фаговым раствором (200 mM NaCl, 100 мг/л азида натрия, 1 мл/л Tween 20), и инкубировали 1 час на ротаторе (120 оборотов в минуту). Полученные экстракты осветляли фильтрованием через марлю, и осветлённые препараты фильтровали через бактериальный фильтр (Acrodisc, 0.22 мкм) с префильтром. Аликвоту осветлённого препарата высевали на селективную для энтеробактерий среду LTA (Lauryl-tryptose agar), содержащую 0.1 г лаурилсульфата натрия на литр, полученные колонии дополнительно идентифицировали на способность утилизировать лактозу на индикаторной среде Эндо. Полученные колонии микробов отсеивали, и тестировали на чувствительность изолированных штаммов к бактериофагам из отфильтрованных стерильных экстрактов методом посева по Грациа. Отдельные бляшки фагов перекачивали на газоны штамма *E. coli*, на которых было проведено первичное выделение, и затем получали жидкие фаговые лизаты этих же штаммов. После скрининга лизатов на гомогенность морфологии вирионов методом трансмиссионной электронной микроскопии прово-

дили препаративное ультрацентрифугирование фагов (ротор Beckman SW28, 1 час при 100000 g). Осадки фагов использовали для выделения ДНК фенольным методом [10]. Выделенную ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции, и оценивали примерную длину генома фага. Секвенирование проводили методом пиросиквенса на приборе FLX Roche (Roche Biosciences). Анализ последовательностей вели с помощью программного пакета Lasergene DNASTar.

Результаты и обсуждение

Выделенный бактериофаг phiKT отличается типичной для подовирусов морфологией [9]. Диаметр его капсида составляет около 55 нм (рис. 1), что позволило оценить размер его генома как примерно 40 т. п. н. (по сходству с бактериофагом T7 [2]), и считать геном линейным и состоящим из дцДНК. При суммировании длин фрагментов генома, полученных гидролизом рестриктазами EcoRV и SspI, это предположение было подтверждено. При секвенировании геномной ДНК была получена последовательность длиной 42608 п. н. Посредством компьютерной симуляции положений сайтов гидролиза рестриктазами было определено ориентировочное местоположение физических концов генома, при этом результаты практического рестрикционного анализа полностью совпали с предсказанными по последовательности результатами. Полученная нуклеотидная последовательность была депонирована в GenBank под номером NC_015920.

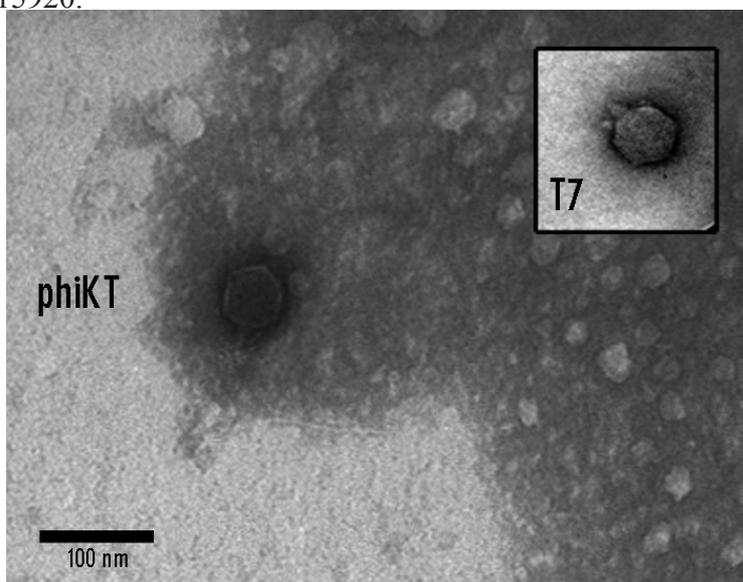


Рис. 1 - Бактериофаг phiKT и бактериофаг T7 для сравнения (трансмиссионная электронная микроскопия, x40000, контрастирование молибдатом аммония, масштаб – 100 нм).

Дальнейший биоинформатический анализ позволил установить тонкую структуру генома бактериофага phiKT (рис. 2).

Всего нами была обнаружена 31 открытая рамка считывания (см. аннотацию, GenBank NC_015920), причём необычным оказалось то, что все эти рамки находились только в прямой ориентации относительно начала генома.

Методом сравнения с базами последовательностей регуляторных элементов (программы BPPROM (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) и PPP (http://bioinformatics.biol.rug.nl/websoftware/ppp/ppp_start.php)) нами были предсказаны сайт связывания сигма-А субъединицы РНК-полимеразы E. coli в самом начале генома (координаты 96-126), промоторный участок (1924-1964), и сайт связывания регуляторного бел-

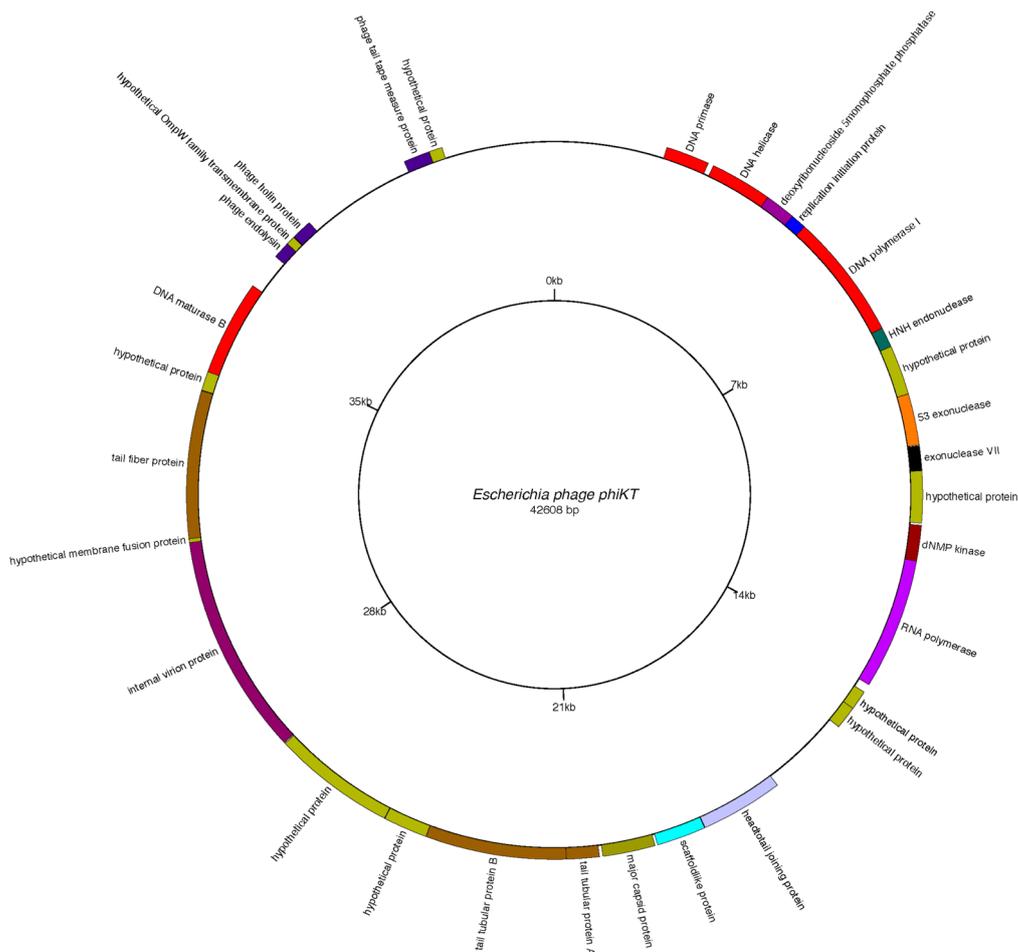


Рис. 2 - Карта генома бактериофага phiKT

ка *fis* (1950-1957), находящийся в зоне промотора. Таким образом, можно сказать, что начальная фаза экспрессии генома фага *phiKT* скорее всего целиком зависит от клеточных факторов и ферментов. Ранние гены фага представлены модулем обмена нуклеиновых кислот, и кодируют ферменты и белки, необходимые фагу для переключения синтетических процессов клетки на репликацию фагового генома – праймазу, хеликазу, ДНК-фосфатазу, белок инициации репликации, ДНК-зависимую ДНК-полимеразу, набор эндо- и экзонуклеаз, dNMP-киназу, ДНК-зависимую РНК-полимеразу, и несколько белков с неустановленной функцией. Этот модуль, занимающий в геномной карте позиции с 2105 по 15330 (31% размера генома), заканчивается достаточно длинным спейсерным участком (15330-16895, 1565 п. н.), лишённым открытых рамок считывания. В этом участке, однако, нам удаётся предсказать существование второго промоторного участка (позиции 16401-16450, программа NNPP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)), предположительно ассоциированного с экспрессией второго геномного модуля (координаты 16895-36093, 43% генома). Этот модуль содержит гены фаговых белков, необходимых для построения вириона (head-tail белок, scaffold-белок, основной белок капсида, белки трубки хвоста (А и В), внутренний белок вириона, белок слияния мембран, белок хвостовой фибриллы), и для упаковки генома фага в капсид (белок ДНК-матураза В). Этот модуль, равно как и предыдущий, обращает на себя внимание высокой плотностью генов – в нём практически отсутствуют межгенные участки, что дополнительно свидетельствует о наиболее вероятной транскрипции этого модуля как единого целого фаговой РНК-полимеразой, кодируемой в первом модуле [1]. Дополнительным подтверждением этой гипотезы можно считать ис-

чезновение чувствительности фаговой инфекции к блокированию клеточной РНК-полимеразы *E. coli* рифампицином, начиная с 10 минуты инфекции (данные не приведены).

Непосредственно за этим модулем следует короткий (36093-36780, 687 п. н.) спейсер, в котором не удаётся предсказать промоторных и регуляторных элементов. Далее располагаются поздние гены, кодирующие белки, ассоциированные с лизисом клетки хозяина (эндотелин, трансмембранный белок, холин). Интересно то, что уже за геном холина – ближе к физическому концу генома фага – обнаруживаются ещё две рамки считывания, также прямые, и кодирующие белок неизвестной функции и белок, сходный с белком-рулеткой (tape measure protein) фагов семейства *Siphoviridae*. Роль второго белка у лямбда-подобных вирусов состоит в инициации полимеризации хвоста фага, и определении его физической длины [7]. Для установления функции данного белка в физиологии фага phiKT необходим протеомный анализ зрелого вириона. До получения данных о белках, входящих в структуру зрелой вирусной частицы, остаётся только догадываться о роли гомолога белка, необходимого сифовирусам, для фактически лишённого хвоста подовируса.

При анализе последовательностей открытых рамок считывания генома фага phiKT методом транслирующего поиска гомологий BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) была выявлена очень высокая степень гомологии ряда важнейших генов (хеликазы, ДНК-полимеразы, 5'-3' экзонуклеазы, РНК-полимеразы, всех структурных белков) и генов с неустановленными

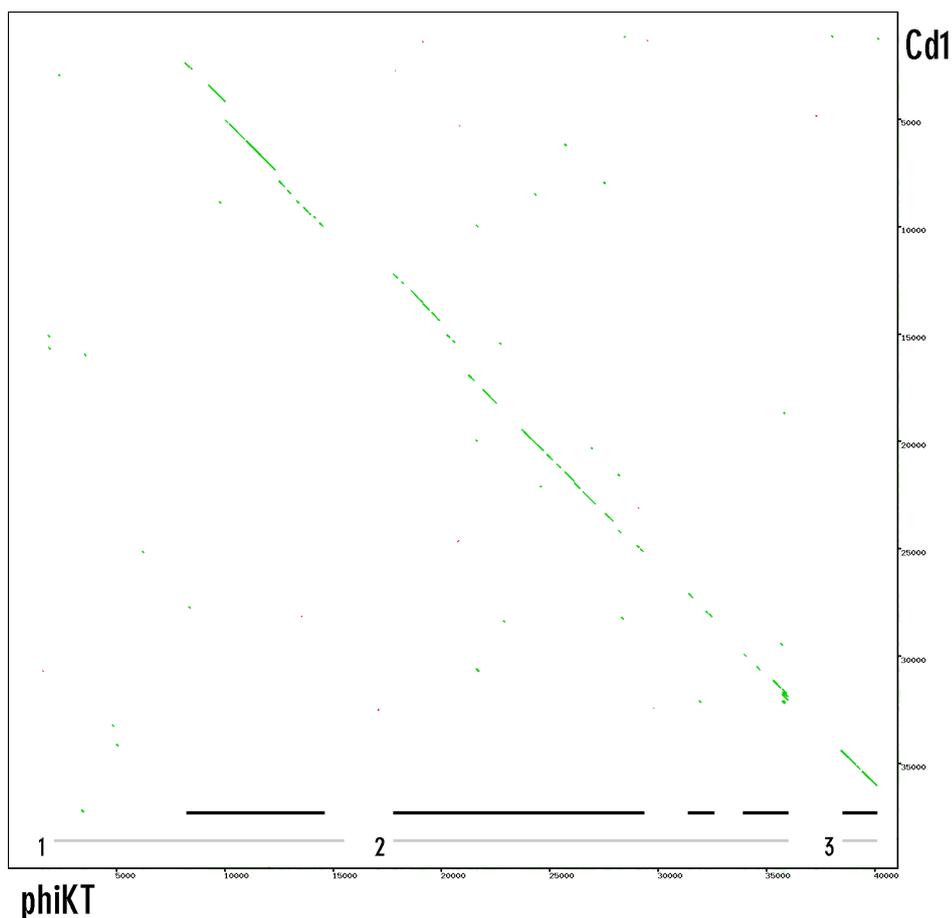


Рис. 3 - Dot-plot матрица геномов фагов phiKT и Cd1. Координаты соответствуют геномным координатам. Внизу цифрами и серыми линиями указаны примерные границы модулей генома, чёрными отрезками над ними – зоны максимальной нуклеотидной гомологии.

функциями (ORF 7, 14) с генами морфологически сходного с фагом T7 бактериофага Cd1, специфичного против очень филогенетически удалённой от *E. coli* бактерии *Caulobacter crescentus* (GenBank GU393987) [6; 8]. Этот микроорганизм относится к группе альфа-протеобактерий, и отличается от кишечной палочки не только олиготрофным образом жизни в пресных водах, но и двухстадийным жизненным циклом – наличием свободно плавающей формы, снабжённой жгутиками, и прикреплённой формы [5]. Репликация генома происходит только в прикреплённой форме, а фаг Cd1 активен только против подвижной формы бактерии [4]. Таким образом, биология этого вида бактерий настолько отличается от биологии *E. coli*, что было бы странно, если бы бактериофаги этих бактерий были бы сходны.

Для выяснения уровня ДНК-гомологии между геномами бактериофагов phiKT и Cd1 использовали метод множественного локального попарного выравнивания (программа YASS, <http://bioinfo.lifl.fr/yass/index.php>).

Полученный график dot-plot (рис. 3) однозначно показывает существование значительных по своей протяжённости непрерывных участков высокой гомологии этих геномов на нуклеотидном уровне. Более того, эти участки гомологии полностью совпадают с ранее обозначенными нами границами геномных модулей – раннего, среднего и позднего.

Сам факт того, что бактериофаги, имеющие настолько различных хозяев, способны иметь весьма высокую структурную и функциональную гомологию на уровне генома, оказывается весьма неожиданным. Даже предварительные грубые оценки геномов бактерий и их фагов по GC-составу (61.21%GC у фага Cd1 и 67.2%GC у его хозяина *Caulobacter crescentus* CB15 против 51.59%GC у фага phiKT и 50.79%GC у *Escherichia coli* K12) могут указывать на продолжительную и раздельную коэволюцию геномов этих объектов [3]. Вероятной причиной возникновения двух крайне сходных фагов, способных инфицировать столь разные бактерии, можно назвать специализацию некоторого исходного бактериофага, закреплённую посредством отбора на дистантных группах организмов. Тщательный сравнительный анализ пары фагов phiKT-Cd1 способен пролить свет на механизмы, позволяющие коровому набору белков бактериофага одинаково хорошо и сходно выполнять свои функции в различных объектах, принципиально отличающихся по биологии клетки.

Библиографический список

1. Amemiya K., Shapiro L. In vitro transcription of the early region of Caulobacter phage phi Cd1 deoxyribonucleic acid by host RNA polymerase // *Biochemistry*. 1982. Т. 21. № 19. — С. 4707-13.
2. Dunn J.J., Studier F.W. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements // *J Mol Biol*. 1983. Т. 166. № 4. — С. 477-535.
3. Gibbs A., Primrose S. A correlation between the genome compositions of bacteriophages and their hosts // *Intervirology*. 1976. Т. 7. № 6. — С. 351-5.
4. Jollick J.D. Differential phage sensitivity of cell types in Caulobacter // *J Gen Virol*. 1972. Т. 16. № 3. — С. 405-7.
5. Laub M.T., Shapiro L., McAdams H.H. Systems biology of Caulobacter // *Annu Rev Genet*. 2007. Т. 41. — С. 429-41.
6. Raboy B., Shapiro L., Amemiya K. Physical map of Caulobacter crescentus bacteriophage phi Cd1 DNA // *J Virol*. 1980. Т. 34. № 2. — С. 542-9.
7. Sanger F., Coulson A.R., Hong G.F., Hill D.F., Petersen G.B. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA // *J Mol Biol*. 1982. Т. 162. № 4. — С. 729-73.
8. West D., Lagenaur C., Agabian N. Isolation and characterization of Caulobacter crescentus bacteriophage phi Cd1 // *J Virol*. 1976. Т. 17. № 2. — С. 568-75.

9. Calendar R. The bacteriophages. 2nd — Oxford ; New York : Oxford University Press, 2006. — xiii, 746 p.

10. Kutter E., Sulakvelidze A. Bacteriophages : biology and applications. — Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. — 510 p.

A NOVEL COLIPHAGE PHIKT, CLOSELY RELATED TO CAULOBACTER PHAGE CD1: GENOME ANNOUNCEMENT

Kulikov, E. E., Tarasyan K. K., Golomidova, A. K., Prokhorov, N. S., Isaeva, A. S., Strotskaya A. V., Tatarsky, E. V., Letarova, M. A., Kutuzova, N. M., Klunova, S. M., Letarov A. V.

Keywords: *bacteriophage genome, Caulobacter crescentus, Escherichia coli, phiKT*

A preliminary analysis of genome structure of the novel coliphage phiKT, isolated from horse feces, was performed. It has a very strong genetic affinity with Caulobacter phage Cd1, including high nucleotide homology of nearly all of its structural protein genes and nucleic acid metabolism genes. This is a very unusual finding, showing the ability of some phages to adapt to the host bacteria of different phylogenetic classes by changes of some of the genes outside of the core region of phage genome.

УДК 578.81

ТРАНСДУКЦИЯ ПЛАЗМИД БАКТЕРИОФАГАМИ Т4-ТИПА (ОБЗОР)

*Зимин А.А., кандидат биологических наук
ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К.Скрябина РАН
zimin@ibpm.pushchino.ru*

Ключевые слова: *бактериофаги Т4-типа, горизонтальный перенос генетической информации, фаговая трансдукция*

Для изучения трансдукции плазмид бактериофагами Т4-типа были проведены следующие эксперименты. Была исследована трансдукция в природных условиях – в кишечнике лабораторного животного – мыши. Было проведено изучение трансдукции плазмид в отсутствие селекции антибиотиком и изучение трансдукция низкокопийных плазмид.

Работа была поддержана грантами РФФИ: №07-04-01563а, №08-04-10149-к, №08-04-99111офи_р, №09-04-90824-моб_ст, 13-04-00991-а.

Введение. Бактериофаг Т4 дикого типа не способен осуществлять трансдукцию, так как содержит гидроксиметилцитозин вместо цитозина в своей ДНК и его геном кодирует ферменты, которые разрушают цитозиновую ДНК бактерии. Для мутантов бактериофага Т4, со-