

тификации бактерий данного вида при бактериологическом анализе клинического материала.

**Библиографический список**

1. Попова, А. В. Молекулярно-генетическая характеристика антибиотико-устойчивых штаммов *Acinetobacter baumannii* и оценка их чувствительности к бактериофагу AP22 / А. В. Попова, В. П. Мякина, М. Е. Платонов, Н. В. Воложанцев // Мол. генетика, микробиол., вирусол. – 2012. – № 4. – С. 18-22.
2. Dubrovin, E. V. Atomic force microscopy analysis of the *Acinetobacter baumannii* bacteriophage AP22 lytic cycle / E. V. Dubrovin, A. V. Popova, S. V. Kraevskiy, S. G. Ignatov, T. E. Ignatyuk, I. V. Yaminsky, N. V. Volozhantsev // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – N 10. – e47348.
3. Peleg, A. Y. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen / A. Y. Peleg, H. Seifert, D. L. Paterson // Clin. Microbiol. Rev. – 2008. – Vol. 21. – N 3. – P. 538-582.
4. Popova, A. V. Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii* / A. V. Popova, E. L. Zhilenkov, V. P. Myakinina, V. M. Krasnikova, N. V. Volozhantsev // FEMS Microbiol. Lett. – 2012. – Vol. 332. – N 1. – P. 40-46.
5. Towner, K. J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy / K. J. Towner // J. Hosp. Infect. – 2009. – Vol. 73. – N 4. – P. 355-363.
6. Yang, H. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii* / H. Yang, L. Liang, S. Lin, S. Jia // BMC Microbiology. – 2010. – Vol. 10. – P. 131.

**MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC ANALYSES OF PHAGE AP22 SPECIFICALLY INFECTING A WIDE RANGE OF *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS**

*Popova A.V., Myakinina V.P., Bogun A.G., Volozhantsev N.V.*

**Key words:** bacteriophage, *Acinetobacter baumannii*, genomic analysis.

*The research is devoted to the microbiological and molecular genetic analyses of lytic phage AP22 specifically infecting and lysing a wide spectrum of *Acinetobacter baumannii* clinical strains.*

УДК 619

**МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАГА vB\_EVOP\_G7C И РОДСТВЕННЫХ ЕМУ КОЛИФАГОВ С КЛЕТКАМИ *ESCHERICHIA COLI* НА РАННИХ СТАДИЯХ ИНФЕКЦИИ**

*Прохоров Н.С., Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Летаров А.В.  
ФГБУН «Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН»  
тел. +7 (499) 135 72 64; prokhoroff@gmail.com*

**Ключевые слова:** N4-подобные бактериофаги, колифаги, взаимодействие вирусов с клеткой, механизмы адсорбции бактериофагов, vB\_EcoP\_G7C

*Работа посвящена анализу механизмов взаимодействия индигенных N4-подобных колифагов, прежде всего vB\_EcoP\_G7C, выделенных из симбиотического сообщества лошадей,*

*с клетками E. coli на ранних стадиях инфекции. Было показано, что в этой группе реализуется нетипичный для Podoviridae механизм узнавания бактериальных клеток, при котором короткие хвостовые фибриллы фага, представленные продуктами двух разных генов, играют роль детерминант не только первичного, но и вторичного необратимого взаимодействия с бактериальными клетками.*

### **Введение**

Бактериофаги – самые распространенные органические самовоспроизводящиеся объекты на Земле. Оценки их численности в биосфере колеблются от  $10^{30}$  до  $10^{32}$  вирусных частиц, составляющих по крайней мере 108 отдельных видов. Легкость их изоляции и культивации в лабораторных условиях, сравнительно небольшие размеры геномов сделали их любимыми объектами исследований генетиков и молекулярных биологов еще в первой половине XX века. Однако к настоящему времени фокус исследований бактериофагов сместился от регуляции выражения генов и механизмов репликации вирусных геномов к поиску закономерностей взаимодействия вирусов с бактериальными клетками. Можно назвать две большие причины этой тенденции. С самого момента открытия бактериофаги рассматривались как многообещающие кандидаты для терапии бактериальных инфекции. Последующее открытие антибиотиков и развитие соответствующей индустрии, казалось, сняло этот вопрос с повестки дня. Однако темпы возникновения штаммов патогенных микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью заставляют вновь всерьез рассматривать возможность терапевтического применения бактериофагов. С другой стороны, бактериофаги представляют заметную угрозу для любого биотехнологического процесса, оперирующего большой биомассой прокариотических клеток, вызывая тотальный лизис бактерий в биотехнологических производствах. Обе проблемы самым непосредственным образом связаны с феноменом видовой и штаммовой специфичности бактериофагов, определяющей спектр инфицируемых микроорганизмов, и феноменом возникновения резистентных к инфекции форм бактерий.

### **Результаты и обсуждения**

В нашей лаборатории наряду с прочими микроорганизмами был изолирован ряд фагов, отнесенный к немногочисленному роду N4-подобных вирусов на основании наличия геномных последовательностей, гомологичных ряду последовательностей генома фага N4, в частности, уникальному среди бактериофагов гену вирионной ДНК-зависимой РНК-полимеразы [1]. Принадлежность изолятов к семейству Podoviridae дополнительно была показана с помощью электронной микроскопии. Один из этих фагов G7C был подвергнут полному геномному секвенированию (GenBank: HQ259105.1), геномы остальных фагов были секвенированы частично. Анализ полученных последовательностей подтвердил близкое родство выделенных фагов и N4 [2]. Так геном G7C воспроизводит характерные для рода консервативные аппараты репликации и транскрипции. В то же время модуль, по всей вероятности ответственный за взаимодействие вируса с бактериальными клетками, имеет довольно необычное для представителей Podoviridae устройство – две находящиеся в единой транскрипционной единице ОРС, аннотированные как ОРС66 и ОРС63.1, кодируют последовательности частично гомологичные мономерам белков хвостовых фибрилл бактериофагов Det7, Vi01 и phiSboM-AG3 из семейства Myoviridae. Область гомологии ограничена N-концевыми доменами белков. Это весьма необычно, так как принято считать, что N-концевые домены хвостовых фибрилл отвечают за прикрепление этих структур к вирусной частице, и должны быть консервативны в рамках семейства ввиду принципиальных отличий в структуре хвостов представителей Podoviridae и фагов с длинными хвостами. С-концевые и центральные домены предполагаемых белковых продуктов не имеют гомологов в белковых базах данных. Однако продукты обеих ОРС содер-

жат предсказанные разные по структуре и специфичности гидролитические домены.

Масс-спектрометрический анализ очищенных фаговых частиц подтвердил присутствие обоих белков в структуре вириона. Рекомбинантные белки grb6 и grb3.1, экспрессированные в *E. coli*, образуют растворимые гомомеры, устойчивые к действию денатурирующих агентов. Это свидетельствует в пользу предположения, что они представляют собой мономеры хвостовых фибрилл. Очищенный рекомбинантный белок grb3.1 специфически связывается с клетками штамма, чувствительного к G7C, но не связывается с клетками близких штаммов *E. coli*, устойчивых к инфекции этим фагом. Избыток экзогенного рекомбинантного grb3.1 в жидкой культуре чувствительного штамма полностью блокирует адсорбцию бактериофага на бактериальных клетках. В совокупности полученные данные позволяют предполагать, что продукт гена ORC63.1 связывается с клеточным рецептором, инициируя адсорбцию вирусной частицы.

Получить рекомбинантный grb6, пригодный для металлоафинной хроматографии *per se*, нам не удалось. Добавление олигогистидиновых последовательностей на N- и C-конец полипептида приводило к потере способности grb6 к тримеризации, что однозначно свидетельствовало о потере белком нативной конформации. Однако, эксперимент по проверке способности белков grb3.1 и grb6 к взаимодействию друг с другом увенчался успехом. При последовательном нанесении на металлоафинную колонку лизатов, содержащих grb3.1 с олигогистидиновой модификацией и интактный grb6, в элюате мы получили очищенный комплекс хвостовых фибрилл. Оценка молекулярной массы полученного комплекса методом гель-фильтрации показала, что в состав комплекса входит по одному тримеру grb3.1 и grb6.

Эксперимент по инкубации очищенного комплекса фибрилл grb3.1 и grb6 с бактериальными клетками разных штаммов показал специфический характер связывания комплекса. Комплекс связывался только со штаммом, чувствительным к инфекции фагом G7C. Кроме того, комплекс фибрилл grb3.1 и grb6, в отличие от очищенного рекомбинантного grb3.1, связывался с клетками необратимо. Следует отметить, что grb6 в отсутствие grb3.1 с клетками чувствительного штамма не взаимодействовал. Все это позволяет заключить, что grb3.1 представляет собой детерминанту первичного обратимого связывания бактериальных клеток, а grb6 отвечает за необратимую фазу взаимодействия. Кроме того, судя по тому, что комплекс успешно проходит первичные фазы взаимодействия и закрепляется на поверхности клетки, можно уверенно предполагать, что адсорбционный аппарат G7C и родственных ему фагов целиком представлен продуктами генов ORC66 и ORC63.1.

Интересно, что фаг G7C отличается не только примечательно узким спектром хозяев, но и высокой частотой возникновения устойчивых к нему клонов. Приблизительно 0.01% потомства любого случайного клона выращенного в жидкой культуре в отсутствие G7C выживает на агаре с высокой концентрацией бактериофага. Характер резистентности проверенных нами клонов был адсорбционный. Фаг G7C оказывался не способен даже обратимо взаимодействовать с такими клетками. Анализ клеточных стенок канонического чувствительного штамма и резистентных субклонов показал существенные отличия структуры липополисахаридов внешней мембраны. Примечательно, что один из выделенных нами N4-подобных бактериофагов Alt63, наиболее существенное отличие которого от G7C по результатам частичного секвенирования состоит в отсутствии гена ORC63.1 и нахождение в этом локусе фагового генома принципиально иной рамки считывания, оказывается способным преодолеть адаптации клонов, устойчивых к G7C. Так как фаги были изолированы из одной пробы, приведенные факты подтверждают предположение о наличии в природных популяциях с высокой плотностью микроорганизмов динамичных и сложных взаимодействий между коэволюционирующими штаммами бактерий и инфицирующими их бактериофагами.

В нашей работе мы планируем провести дальнейшее исследование структуры и механизмов функционирования адсорбционного аппарата этих необычных вирусов, что, весьма вероятно, приблизит нас к пониманию закономерностей взаимодействий бактериофагов и бактерий и механизмов возникновения форм бактерий, устойчивых к фаговой инфекции.

**Библиографический список**

1. Golomidova A, Kulikov E, Isaeva A, Manykin A, Letarov A. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions // Appl Environ Microbiol. 2007. Т. 73. №19. – С. 5975-81.
2. Kulikov E, Kropinski AM, Golomidova A, Lingohr E, Govorun V, Serebryakova M, Prokhorov N, Letarova M, Manykin A, Strotskaya A, Letarov A. Isolation and characterization of a novel indigenous intestinal N4-related coliphage vB\_EcoP\_G7C // Virology. 2012. Т. 426. №2. – С. 93-9.

**MECHANISMS OF INTERACTIONS OF VB\_ECOP\_G7C  
BACTERIOPHAGE AND ITS RELATIVES WITH ESCHERICHIA COLI  
AT EARLY STAGES OF INFECTION**

*Prokhorov N.S., Kulikov E.E., Golomidova A.K., Letarov A.V.*

**Key words:** *N4-related, coliphages, virus-host interactions, mechanisms of phage adsorption, vB\_EcoP\_G7C*

*This paper is devoted to analysis of mechanisms of interactions between indigenous intestinal N4-related bacteriophages, vB\_EcoP\_G7C mostly, and E. coli cells at early stages of phage infection. It was elucidated that phages of that group utilize very unusual among podoviruses mechanism of host recognition in which two types of short tail fibers serve sequentially as prime and second receptor recognition proteins ensuring irreversible binding of a virus particle to bacterial cell outer membrane.*

УДК 619:578

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ CITROBACTER**

*Пульчеровская Л.П., кандидат биологических наук, доцент,  
[pulcherovskaya.lidia@yandex.ru](mailto:pulcherovskaya.lidia@yandex.ru)*

*Ефрейторова Е.О., аспирант*

*Золотухин С. Н., доктор биологических наук, профессор,*

*Васильев Д. А., доктор биологических наук, профессор  
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»*

*432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1.*

**Ключевые слова:** *бактериофаги, негативные колонии, литическая активность, специфичность бактериофагов, бактерии рода Citrobacter.*

*Изученные фаги бактерий рода Citrobacter имели колонии четырех типов, характеризовались различным спектром литической активности и явились специфичными по отно-*