

На правах рукописи

ЛЕТАРОВ АНДРЕЙ ВИКТОРОВИЧ

**Эволюционная динамика белков адсорбционного
аппарата некоторых групп бактериофагов.**

03.02.02 – вирусология, 03.01.03 - молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в лаборатории вирусов микроорганизмов ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук» и на кафедре органической и биологической химии биолого-химического факультета ФГБОУ ВПО «Московский государственный педагогический университет».

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор

Кутузова Нина Михайловна

Официальные оппоненты:

Замятнин Андрей Александрович, доктор биологических наук, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ, НИИ молекулярной медицины, директор.

Синеокий Сергей Павлович, доктор биологических наук, Государственный научный центр РФ ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов («ГосНИИгенетика»), директор ВКПМ.

Алешкин Геннадий Иванович, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, лаборатория генетики бактерий, заведующий.

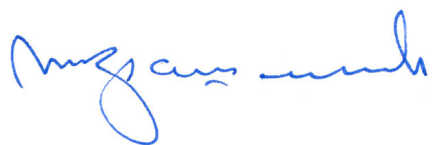
Ведущая организация: ФГБУН «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» Российской академии медицинских наук.

Защита состоится «___» _____ 2014 г. в 12 часов на заседании Совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр.12, биологический факультет, ауд. 389.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайте www.bio.msu.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,



кандидат биологических наук

И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В результате работ последних десятилетий (см. обзоры Weinbauer, 2004, Abedon 2009, Clookie et al. 2011) стало очевидным глобальное экологическое значение бактериофагов, являющихся, по-видимому, наиболее распространёнными биологическими объектами на Земле (Wommack and Colwell 2000). Адаптации популяций бактериофагов к меняющимся условиям различных местообитаний обычно происходят за счёт более или менее масштабных перестроек генома вируса. Примеры физиологических адаптаций (то есть адаптивных реакций на изменение условий среды, не связанных с перестройками генетического материала) у бактериофагов крайне немногочисленны (Follansbee et al, 1974, Shan et al, 2010), однако, подлинное экологическое значение таких адаптаций остаётся неизвестным. В то же время определённые перестройки генома в результате как мутаций, так и рекомбинационных событий, приводящие к увеличению пролиферативного успеха фаговой популяции, могут накапливаться достаточно быстро. Такая быстрая эволюция генома может служить признаком напряжённых конкурентных отношений между бактериофагами и их потенциальными хозяевами, стремящимися избавиться от давления фаговой инфекции (Red Queen dynamics; Weitz et al, 2005). Это позволяет судить об экологических взаимоотношениях фагов и их хозяев в системе на основании данных о перестройках в фаговых геномах, происходящих *in situ*. При этом требуется вычленить те генетические изменения, которые оказывают явный эффект на фенотипические признаки вирусов, важные с точки зрения адаптации к текущей экологической ситуации.

В настоящее время большая часть данных об экологии фагов получена из исследования водных экосистем. Однако, ряд природных микробных сообществ, в особенности сообществ с высокой плотностью жизни, с точки зрения экологии бактериофагов существенно отличаются, как от

водных экосистем, так и между собой. К числу таких сообществ относятся симбиотические экосистемы кишечника различных животных, которые являются одним из главных местообитаний *Escherichia coli* и ее фагов – объектов, послуживших источником большей части знаний о молекулярной биологии фаговой инфекции и молекулярных механизмах экологических адаптаций этих вирусов. Исследования экологии бактериофагов в средах организма животных и человека имеют также большое практическое значение в связи с тем, что бактериофаги являются перспективным средством антибактериальной терапии, на которое возлагаются большие надежды в связи с растущей антибиотикорезистентностью патогенных микроорганизмов (Abedon et al 2011, Burrowes et al, 2011)

В связи с этим согласованное исследование экологической динамики популяций колифагов и других бактериофагов в их естественной среде и молекулярных событий, отражающих их микроэволюцию *in situ*, послужит кратчайшим путём к пониманию как особенностей экологии соответствующих природных систем, так и молекулярных основ адаптации вирусов прокариот. Как это ни парадоксально, хотя вирулентные фаги энтеробактерий были одними из первых исследованных вирусов прокариот (d'Herelle 1921) и послужили классическими модельными объектами на этапе становления молекулярной биологии (см. Summers 2005), до настоящего времени не существует охарактеризованных природных микробных систем, доступных для систематического исследования, которые включали бы эти вирусы в качестве своих постоянных, автохтонных компонентов. Обнаружение и исследование подобных природных микробных сообществ означало бы создание модельной системы для исследования микроэволюции бактериофагов (и их адсорбционных аппаратов) в контексте реальных экологических процессов и взаимодействий. При этом необходимо особо подчеркнуть важность обнаружения «истинного» природного местообитания именно вирулентных колифагов, так как, в отличие от умеренных вирусов,

стабильность их поддержания в экосистеме критически зависит от адаптаций их адсорбционного аппарата.

Цель и задачи работы

Цель работы: исследовать процессы микроэволюции белков адсорбционного аппарата различных групп колифагов в природной среде.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) Исследовать полиморфизм белка воротничковых нитей (фибритина) на серии бактериофагов, родственных Т-чёрным.
- 2) Установить функциональное значение варибельного С-концевого домена для фолдинга молекулы фибритина, уточнить функцию фибритина в работе молекулярного сенсора вирионов Т-чёрных фагов, установить клеточную мишень, с которой он взаимодействует.
- 3) Определить значение механизмов, обуславливающих эволюционную пластичность фибритина и белков, взаимодействующих с ним в общем контексте динамики геномов группы Т-чёрных бактериофагов.
- 4) Найти природную микробную систему, способную служить модельным объектом для исследований адаптаций вирулентных колифагов, охарактеризовать структуру и динамику популяций колифагов и их хозяев в этой системе.
- 5) Исследовать полиморфизм белков адсорбционных аппаратов вирулентных колифагов, используя серии близкородственных и экологически связанных изолятов, полученных из охарактеризованной модельной экосистемы, и исследовать физиологические последствия обнаруженных генетических изменений.

Новизна исследования

До настоящего времени большинство работ, исследующих эволюционную пластичность белков адсорбционного аппарата колифагов, касались главным образом фибриллярных адгезинов бактериофагов, реже - адгезинов нефибриллярной природы, и почти не затрагивали другие компоненты адсорбционных аппаратов, не участвующих напрямую в процессе узнавания клеточных рецепторов. В частности, дополнительный комплект фибрилл Т-чётных бактериофагов – воротничковые нити – практически не исследовался с точки зрения эволюционной динамики. Кроме этого, выполненные ранее исследования были построены на использовании наборов коллекционных или природных изолятов, полученных из различных разрозненных источников (Sandmeier 1994, Nolan et al, 2006) или путём моделирования микроэволюционных процессов в лаборатории (Tetart et al, 1998).

В ходе нашей работы впервые строго доказана способность С-терминального домена (фолдона) фибритина фага Т4 к автономной тримеризации, и показана его роль в инициации фолдинга этой молекулы. Показано, что в пределах группы фагов, родственных Т-чётным, происходят модульные замены С-концевого участка фибритина с сохранением функции инициации фолдинга, что свидетельствует о том, что данные модули бифункциональны. Методами геномики впервые охарактеризованы основные закономерности эволюции геномов Т-чётных фагов.

Впервые показано, что кишечное микробное сообщество лошадей включает преимущественно вирулентные колифаги в качестве своего автохтонного компонента. Наличие выраженной временной динамики популяций фагов, а также ряд других свойств данного сообщества свидетельствует о значительном селективном давлении фаговой инфекции на микробные популяции. Впервые исследования экологической динамики популяций фагов и их хозяев в симбиотической микробной системе млекопитающих было осуществлено с разрешением на уровне бактериальных штаммов. Предложен

новый высокоразрешающий метод геномного ПЦР-фингерпринтинга колиформных бактерий, позволяющий дифференцировать близкородственные изоляты, обладающие разной чувствительностью к фагам. Показано, что уровень внутривидового разнообразия колиформных бактерий, существующий в этих экосистемах, достигает сотен одновременно присутствующих штаммов, значительно различающихся по чувствительности к присутствующим одновременно с ними колифагам. Впервые охарактеризованы перестройки геномов и генов белков адсорбционных аппаратов у близких изолятов кишечных колифагов, полученных из одного источника.

Научная и практическая значимость

Идентификация консервативной функции негомологичных С-концевых доменов фибритинов ряда бактериофагов в инициации фолдинга соответствующих белков определяет новый подход к интерпретации данных об эволюционной пластичности белков с учётом сохранения пути фолдинга. С-концевые домены различных гомологов фибритина представляют собой автономно тримеризующиеся модули, которые могут использоваться в практической инженерии белков для обеспечения корректной тримеризации и фолдинга различных фибриллярных доменов, организованных в параллельные тримерные суперспиральные структуры.

Полученные в работе данные свидетельствуют о значительном различии стратегий эволюции генома у различных групп бактериофагов и о существовании различных стратегий адаптации адсорбционных аппаратов, что необходимо учитывать при моделировании процессов, происходящих в природных микробных системах с участием бактериофагов, а также при создании методов управления специфичностью бактериофагов, в том числе для их терапевтического использования. Выявленные особенности эволюции геномов целесообразно также учитывать при

разработке систем молекулярного экспресс-типирования фагов, включаемых в терапевтические смеси, а также при интерпретации данных такого типирования.

Полученные в работе данные об особенностях экологических взаимоотношений бактериофагов и их хозяев в микробной системе кишечника лошади определяют, во-первых, удобную модельную систему природного микробного сообщества, содержащего вирулентные колифаги в качестве автохтонного компонента. Во-вторых, новую методологию исследования взаимодействия фаговых и бактериальных популяций с разрешением на уровне штаммов, основанную на согласованном применении методов молекулярного типирования бактерий и фагов, полученных из одних и тех же образцов. Полученные характеристики данной микробной системы позволяют сделать заключение о принципиальном отличии экологии бактериофагов в ней от микробных систем кишечника человека и ряда других млекопитающих, что является существенным вкладом в понимание видовой специфичности физиологических процессов у млекопитающих. Данные об особенностях биологических процессов в кишечнике лошади находят применение в области ветеринарной биологии при исследовании нарушений микробиоты кишечника лошадей при перегрузке углеводами, ведущих к возникновению асептического воспалительного заболевания копыт - ламинита. Эти результаты также могут быть востребованы при создании ветеринарных пробиотических препаратов. Разработанные в ходе исследований системы высокоразрешающего ПЦР-фингерпринтинга колиформных бактерий могут применяться в различных областях микробиологии и медицины.

Положения, выносимые на защиту

1. С-концевой домен (фолдон) фибритина бактериофага Т4 является автономно-тримеризующимся модулем, инициирующим фолдинг данного гомотримерного белка.

2. В группе бактериофагов, родственных Т-чѣтным, имели место сравнительно частые модульные замены С-концевой области фибритина белковыми последовательностями различного происхождения; при этом генетически неродственные фолдону фага Т4 белковые домены выполняют сходную функцию в инициации фолдинга молекулы, что приводит к сохранению общего пути фолдинга этих природных химерных молекул. Имеющиеся данные о филогенетических взаимоотношениях бактериофагов, обладающих различными типами С-концевых доменов фибритина позволяют предположить, что указанные модульные замены активно происходили в течение некоторого ограниченного периода эволюционной истории группы фагов, родственных Т-четным (гетерохронная эволюция).

3. Мишенью взаимодействия фибритина фага Т4 в процессе срабатывания молекулярного сенсора вирусной частицы является С-концевой домен пг 36. Взаимодействие фибритин – пг36 является первым этапом в двухстадийном процессе срабатывания молекулярного сенсора фага Т4.

4. Геномы бактериофагов, родственных Т-чѣтным, включают консервативную кор-область, гены которой эволюционируют преимущественно дивергентным путѣм, периферическую область, для которой характерна высокая частота обмена модулями генного и надгенного уровня, и промежуточную область, включающую ряд белков адсорбционного аппарата, для которых характерны перестановки модулей субгенного уровня.

5. Микробная экосистема кишечника лошади включает в качестве автохтонных компонентов значительное количество вирулентных бактериофагов, в том числе вирулентных колифагов, причѣм вирусные популяции оказывают, по-видимому, селективное давление на популяции бактерий.

6. Индивидуальные популяции *E.coli* и колиформных бактерий в кишечнике лошадей характеризуются

чрезвычайно высоким уровнем внутривидового разнообразия – до тысячи одновременно присутствующих генетически различимых штаммов, обладающих также различной чувствительностью к индигенным бактериофагам.

7. Наблюдаемые полиморфизмы белков адсорбционного аппарата у близкородственных экологически связанных изолятов индигенных колифагов лошадей свидетельствуют об активной селекции новых вариантов спектра хозяев у этих вирусов.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на конференциях: Viruses of Microbes (Брюссель, Бельгия 2012, Париж, Франция, 2010), Evergreen international phage biology meeting (Олимпия, США, 2011, 2009), Texas/Evergreen Phage/Virus Genomics and Ecology Meeting (Кингсвилль, США, 2006), Актуальные проблемы современной микробиологии (Москва, 2011, 2009) и др.

Публикации: По материалам диссертации опубликовано 23 печатные работы - 14 экспериментальных статей и 4 обзора в журналах, рекомендуемых ВАК РФ, 2 главы в монографиях и 3 статьи в сборниках материалов конференций.

Структура работы: Диссертация изложена на 208 страницах текста и включает 48 рисунков и 7 таблиц; состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, заключения, выводов и списка литературы, включающего 294 наименования)

Благодарности: Я благодарю научного консультанта проф. Н.М. Кутузову за помощь и внимание в процессе работы над диссертацией, проф. В.В. Месянжинова, Dr. Н.М. Krisch за плодотворные дискуссии на различных этапах работы. Я выражаю особую признательность всем сотрудникам моей лаборатории, принимавшим участие в исследованиях, и прочим соавторам публикаций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Для исследования путей фолдинга фибритина бактериофага Т4 и его гомологов, препараты соответствующих белков получали путём экспрессии с плазмид в клетках *E. coli* под контролем промоторов РНК-полимеразы фага Т7. Для очистки белков применяли дифференциальное высаливание, а также адсорбционную хроматографию на гидроксил-апатите. Кроме полноразмерных вариантов указанных белков в работе использовались их делеционные варианты, полученные общепринятыми методами белковой инженерии. Кроме того, были использованы химерные белки Wac P, представляющий собой вариант фибритина В, с С-концевым доменом (фолдоном), перенесённым на N-конец молекулы, а также белок W31, представляющий собой трансляционный фьюз С-концевого домена фибритина и «нагрузочной» последовательности пг 31 фага Т4, введённой для увеличения молекулярной массы конструкта и облегчения его анализа методом электрофореза (Рис.1).

Кроме того, в работе использовались ряд точечных мутантов фибритина В, полученных путём случайной модификации выбранных остатков в пределах С-концевого домена молекулы, выполненной с использованием вырожденного олигонуклеотида. Исследование нативности фибритина и его производных производили на основании следующих критериев:

- Растворимости белка, определяемой по распределению белка между фракциями осадка и супернатанта после разрушения экспрессирующих клеток и центрифугирования

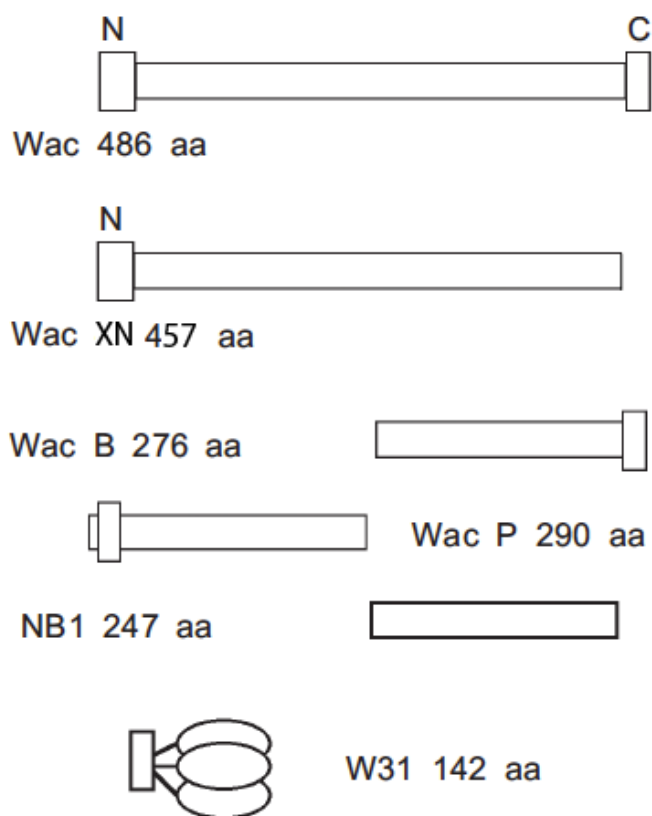


Рис. 1. Схематическая структура фибритина фага Т4, его делеционных мутантов и химерного белка W31, использованных в данной работе .

-способности образовывать ДСН – устойчивые олигомеры (тримеры), выявляемой путём загрузки на ДСН-ПААГ гель не денатурированного нагреванием образца.

- определения чувствительности белка к гидролизу трипсином

- определения элюирующей концентрации фосфатного буфера при хроматографии на гидроксилпатите.

В некоторых случаях также применяли спектроскопию кругового дихроизма (КД) и сканирующую калориметрию.

Определение последовательности фрагментов ДНК проводили автоматизированным методом Сэнгера с использованием флуоресцентно-меченных нуклеотидов. Определение полных последовательностей геномов

бактериофагов выполняли с использованием метода пиросеквенирования.

Для выделения бактерий и бактериофагов из фекалий лошади использовали общепринятые микробиологические методы с незначительными модификациями.

Определение бактерий производили с помощью MALDI-TOF спектроскопии тотальных клеточных экстрактов с помощью прибора Biotyper (Bruker Daltonics, США), в соответствии с рекомендациями производителя, а также с помощью определения последовательности генов 16S рРНК.

Дифференциацию штаммов колиформных бактерий производили с помощью разработанной нами системы высокоразрешающего геномного ПЦР-фингерпринтинга (Исаева с соавт. 2010, Golomidova et al. 2007).

Определение групповой принадлежности изолятов бактериофагов проводили на основе морфологии вирусных частиц в сочетании с определением последовательности случайных фрагментов геномов. Для ряда групп бактериофагов (Т5-подобные, Т4-подобные, N4-подобные) использовалась также ПЦР-амплификация различных участков генома.

Выделение некультивируемого вирусного сообщества фекалий лошади производили путём экстракции буферным раствором с последующим дифференциальным центрифугированием. Нами был предложен приём осаждения бактериофагов на поверхность фреона-113 сквозь слой 40% раствора глицерина, позволяющий избежать повреждения фаговых частиц (Куликов с соавт, 2007).

Исследование морфологии фаговых частиц проводили с помощью трансмиссионной электронной микроскопии в сочетании с негативным контрастированием уранил-ацетатом или молибдатом аммония по общепринятым методикам (Ackermann 2007).

Статистическая обработка результатов проводилась в случае, если различие между данными было менее 3-кратного среднеквадратичного отклонения. Вычисление уровней разнообразия сообществ производили с использованием

критерия Chao1 (Chao 1984) и его ошибки, рассчитанных с использованием программы EstimateS (<http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>).

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование фибритина фага T4 и его гомологов

Адсорбционный аппарат фага T4 представляет собой сложную молекулярную машину, включающую более 40 различных белков (Leiman et al. 2010). Функция распознавания рецепторов клетки хозяина выполняется двумя наборами фибриллярных адгезинов, включающими 6 длинных хвостовых фибрилл (ДХФ), образованных белками пг 34, 35, 36 и 37 (у других т-чётных фагов также пг 38), и 6 коротких хвостовых фибрилл (пг 12). Адсорбция фага начинается с обратимого связывания ДХФ с их рецепторами, которое служит сигналом для перестройки структуры базальной пластинки хвоста фага, приводящей к развёртыванию коротких фибрилл, необратимо фиксирующих фаг на поверхности клетки, сокращению чехла хвоста и эжекции ДНК в клетку хозяина.

Фибритин (пг wac) бактериофага T4 – это белок, формирующий третий комплект фибрилл вириона Т-чётных фагов - воротничок и воротничковые нити (см. Рис 8). Функция этих фибрилл в процессе сборки вирионов в инфицированных клетках состоит в облегчении присоединения длинных хвостовых фибрилл фага (Kellenberger et al. 1996), а после выхода фага из клеток они являются компонентом молекулярного сенсора окружающей среды, удерживающего фибриллы в неактивном, сложенном вдоль фагового хвоста положении (Follansbee et al. 1974). Этим достигается подавление адсорбции в условиях, неблагоприятных для инфекции (низкие температуры, низкие значения pH и др.). Мутанты фага, лишённые фибритина, сохраняют жизнеспособность в лабораторных условиях.

Установление роли С-концевого домена фибритина фага T4 в инициации фолдинга данного белка.

Ранее было установлено, что фибритин представляет собой тримерную фибриллу, организованную в структуру параллельного сегментированного α -спирального coiled coil (Efimov et al. 1994, Sobolev 1993), фланкированную N- и С-концевыми глобулярными доменами, имеющими протяжённость в 50 и 28 а.к. соответственно. Было также показано, что делеционный мутант, лишённый 18 С-концевых остатков не способен к корректному фолдингу в условиях экспрессии в *E.coli*, в то время как различные N-делетированные мутанты собирались корректно (Efimov et al. 1994). Однако, структуры coiled coil характеризуются способностью к автономной олигомеризации и часто входят в состав доменов, иницирующих олигомеризацию и/или фолдинг гомоолигомерных белков. Поэтому истинная роль С-концевого домена нуждалась в экспериментальном уточнении: либо это действительно домен иницирующий тримеризацию и последующий фолдинг фибриллярной части по принципу застёжки – молнии, либо же его функция состоит в стабилизации структуры, формирование которой иницируется сегментами coiled coil.

В ходе наших экспериментов мы получили ряд точечных мутантов по ключевым аминокислотным остаткам, вовлечённым в межцепочечные взаимодействия в С-концевом домене фибритина В. Эти мутантные белки хорошо экспрессировались, однако обладали несколько необычными свойствами. При разрушении экспрессирующей культуры путём обработки лизоцимом с последующим многократным замораживанием-оттаиванием (в присутствии ДНКазы) белок обнаруживался в осадке, однако после ультразвуковой дезинтеграции клеток он оказывался полностью растворим, что указывало на способность белков образовывать лабильные агрегаты. При этом мутантные белки не образовывали ДСН-устойчивых олигомеров, высаливались при низких концентрациях сульфата аммония (22-25% насыщения) и

полностью гидролизировались при обработке трипсином (к которому нативный фибритин В дикого типа полностью устойчив из-за своей плотной третичной структуры). Исследования этих белков с помощью КД-спектроскопии показали увеличение содержания неупорядоченных и бета-структурных участков (30-40% α -структуры, 20-30 % α -структуры и 20-30% неупорядоченной по сравнению с альфа-структурным фибритином, содержащим более 70% α -спиралей).

Термограммы мутантных белков выявляют похожую форму кривой плавления, отличающуюся от таковой фибритина В1. Выявляется 3 калориметрических пика, очертания 2-х из них размыты, что свидетельствует о низкой кооперативности плавления. Однако, последний пик, соответствующий переходу при 52,6° С , напротив, характеризуется высокой кооперативностью и по температуре перехода близок к одному из пиков фибритина В

Таким образом, свойства мутантов Wac В, с инактивированным С-концевым доменом значительно отличались от С-делетированного мутанта полноразмерного пг was, образующего при экспрессии плотные нерастворимые тела включения. Свойства данных белков были аналогичны ожидаемым свойствам метастабильного интермедиата фолдинга, близкого к модели «расплавленной глобулы» (Бычкова и Птицын 1993). Существование такого интермедиата с необходимостью следует из гипотезы инициации фолдинга С-концевым доменом, так как в этом случае процесс должен происходить полностью пост-трансляционно. В то же время, интермедиат фолдинга фибритина не может в полной мере соответствовать модели «расплавленной глобулы» поскольку последняя требует, чтобы топология такой глобулы приближалась к нативной, что, очевидно, невозможно в случае олигомерного фибриллярного белка, четвертичная структура которого не отделима от третичной. Очевидно, что глобулярный интермедиат фолдинга

фибритина должен перестраиваться в фибриллярную конформацию непосредственно в процессе фолдинга.

Исходя из модели стабилизации интермедиата за счёт инактивации С-концевого фолдона, можно предположить, что мутант белка Wac B с полностью делектированным С-концевым доменом, точные границы которого можно установить по характеру гептадной периодичности (Efimov et al. 1994) и по данным рентгеновской кристаллографии (Strelkov et al. 1998), должен обладать сходными свойствами. Нами был получен соответствующий делеционный вариант, названный NB1.

Данный белок обладал свойствами, аналогичными вышеописанным мутантам (Рис 2).

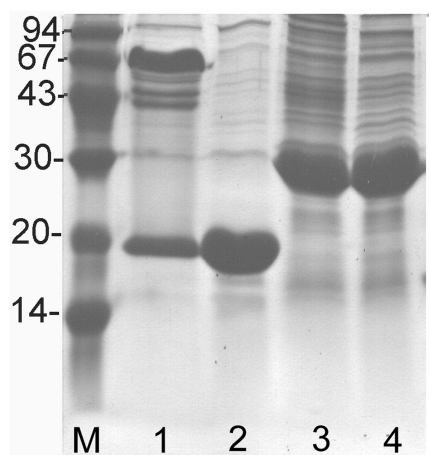


Рис. 2. Электрофорез в ДСН-ПААГ частично очищенных препаратов белков NB1 и W31 (см. текст ниже) Дорожки: 1 негретый образец W31; 2-образец W31, денатурированный нагреванием, дорожки 3 и 4 негретый и прогретый образцы белка NB1 соответственно; М – маркер молекулярных масс.

Избыток белка NB1 не препятствовал спонтанной ренатурации Wac B после термоденатурации и не замедлял её

Для исследования способности фолдона фибритина к автономной тримеризации вне присутствия coiled coil сегментов нами был сконструирован химерный белок W31 (Рис. 1, 2). Этот белок оказался растворимым и способным образовывать ДСН-устойчивые тримеры (Рис. 2). Добавление

белка W31 препятствовало ренатурации Was В при отжиге (Рис. 3)

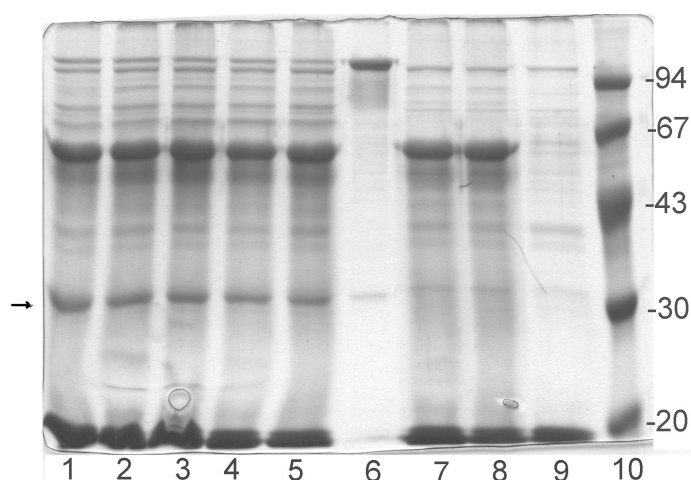


Рис. 3. Ренатурация фибритина В в присутствии избытка W31. Дорожки 1 - 5 соответствуют временам ренатурации 1, 2, 3, 5 и 10 мин соответственно; 6 - ренатурация фибритина В в течение 10 мин; 7 - ренатурация химерного белка W31 без фибритина В в течение 10 мин; 8 - непрогретый образец W31; 9 - прогретый образец W31. Стрелкой отмечена полоса мономерной формы фибритина В. Полоса в дорожках 1 - 5, 7, 8 и 9, идущая незначительно ниже тримера фибритина В, очевидно, является примесью в препарате W31.

Аналогичный эффект наблюдался и в присутствии белка Was Р (см. рис.1)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что фолдинг фибритина бактериофага Т4 инициируется тримеризацией С-концевого домена и протекает пост-трансляционно, что неизбежно требует существования метастабильного глобулярного интермедиата фолдинга, способного перестраиваться в фибриллярную конформацию в процессе объединения трёх полипептидных цепей в общую третично-четвертичную структуру.

Исследования особенностей эволюции гомологов фибритина у бактериофагов, родственных Т-чётным

Участки фибритина с ДХФ, исходя из геометрических соотношений элементов фаговой частицы (см. рис. 8) локализованы в С-концевой области фибритина и в районе «колена» ДХФ. Таким образом, можно было предположить, что С-концевой участок (не обязательно строго соответствующий фолдону) молекулы должен быть высоко консервативен, так как его модульная замена потребовала бы 1) согласованного изменения участка взаимодействия на ДХФ и 2) способности нового С-концевого домена обеспечивать фолдинг молекулы фибритина. Однако, к моменту начала этого этапа работы были известны последовательности генов *was* лишь для нескольких очень близкородственных фагу Т4 вирусов (Шнейдер, 1997). Поэтому для проверки сделанного нами предположения мы определили нуклеотидные последовательности гомологов фибритина у ряда бактериофагов, дистантно – родственных Т-чётным (относящимся к группам псевдо-Т-чётных и шизо-Т-чётных в терминологии, предложенной Tetart et al., 2001). Соответствующие участки геномов были амплифицированы с помощью ПЦР с использованием различных стратегий (в настоящее время последовательности некоторых из этих фрагментов объединены в базах данных с полными последовательностями соответствующих геномов).

В результате этих работ нами было показано, что при исследовании значительно удалённых друг от друга вирусов мы практически всегда обнаруживаем модульные замены С-концевого сегмента фибритина. С учётом вариантов, последовательности которых опубликованы позже, всего обнаружено 8 типов С-концевых доменов фибритина (Рис 4.)

В то же время, N-концевой домен, обеспечивающий взаимодействие с вирусной частицей, оказался высоко консервативным. Последовательности фибриллярной coiled-coil части молекулы сильно дивергировали, сохраняя, однако,

характерную гептадную периодичность гидрофобных аминокислотных остатков.

Для уточнения роли этих «альтернативных» С-концевых доменов нами были сконструированы несколько экспрессионных векторов. Нами были проведены исследования для получения соответствующих фибритинов и их делеционных мутантов в клетках *E.coli* и исследования свойств этих белков.

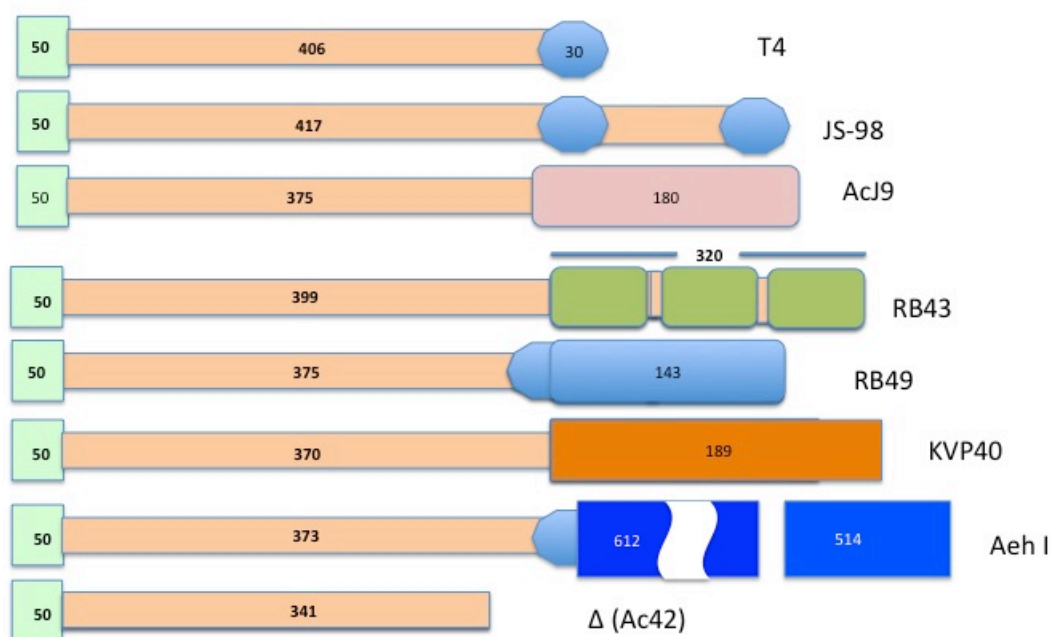


Рис 4. Доменная организация фибритинов бактериофагов родственных Т-чётным. У фага RB42 показаны три повтора иммуноглобулин-подобных доменов в С-концевом сегменте пг was. В геноме фага AehI имеются две дополнительные рамки считывания между геном was и геном 12, отсутствующие у других фагов, принесённые, по-видимому, вместе с С-концевым сегментом фибритина из другого генетического окружения.

Наиболее детально был исследован фибритин фага RB49. Полноразмерный белок Was RB49 (RBW) хорошо экспрессировался и мог быть легко очищен на гидроксил-апатите. Содержание элементов вторичной структуры, оцененное по данным КД-спектроскопии, устойчивость к обработке трипсином и способность к образованию ДСН-

устойчивых олигомеров свидетельствуют о том, что рекомбинантный белок корректно сворачивается в нативную структуру. Белок RBW-C, представляющий собой N-делетированный вариант, содержащий последние три предсказанные сегмента coiled coil и C-концевой домен, также растворим и образует ДСН-устойчивые олигомеры, в то время как C-делетированный RBW-N, лишённый большей части этого домена, образовывал тела включения, не содержащие ДСН-устойчивых олигомеров.

В отличие от фибритина фага T4, фибритин фага RB49 не способен к спонтанной ренатурации, однако, он может быть денатурирован 6М мочевиной и ренатурирован методом резкого разбавления с последующим концентрированием. К-ренатурация белков RBW и RBW-C сопровождается образованием двух дополнительных типов ДСН-устойчивых олигомеров (гетеротримеров) с электрофоретической подвижностью между RBW и RBW-C, что подтверждает тримерную организацию этих белков.

Мы также экспериментально подтвердили способность C-концевого домена фибритина фага RB42 к автономной тримеризации.

Фолдинг фибритина Aeh I, содержащего весьма протяжённый «альтернативный» C-концевой домен, оказался зависим от продукта дополнительной рамки считывания (белка W1), расположенной сразу за геном was в геноме этого вируса (у других фагов сразу за геном was следует ген 13). Для получения нативного пг was потребовалось обеспечить коэкспрессию этих двух белков в клетках и проводить наработку белка при температуре 20°C

Таким образом, в этом случае специфический шаперон представляет собой часть генетического модуля, включающего C-концевой домен фибритина, что позволяет сохранить способность белка к тримеризации.

Интересно, что фибритин фага PC42, лишённый фолдона, экспрессируется в виде тел включения. Плохой рост фага PC42

не позволил нам установить, присутствует ли этот белок в составе его частиц.

Таким образом, в процессе эволюции фагов, родственных Т-чётным, происходят сравнительно частые модульные замены С-концевого сегмента фибритина доменами, обладающими способностью к тримеризации. Очевидно, что эти замены также обеспечивают фагам определённое селективное преимущество. Функциональный смысл этих событий в настоящее время неизвестен. С-концевой домен фибритина Aeh I имеет сходство аминокислотной последовательности с адгезинами бактериофагов. Наличие специфического шаперона, кодируемого в непосредственно прилегающей рамке считывания, также характерно для фаговых фибрилл. Возможно, что функция воротничковых нитей у этого бактериофага изменилась, и они взаимодействуют с какими-то рецепторами на поверхности клеток – хозяев, увеличивая скорость адсорбции или расширяя спектр хозяев фага. Функцию дополнительного связывания какого-то лиганда можно предположить также для фибритина фага RB42, содержащего 3 повтора иммуноглобулин-подобных доменов на мономер. Белки с такими доменами достаточно широко распространены в структуре бактериофагов (Fraser 2006), и при этом всегда экспонированы на поверхность вирионов. К сожалению, наши попытки обнаружить лиганды для «альтернативных» доменов фибритина пока не увенчались успехом.

Как было отмечено выше, участок взаимодействия ДХФ с фибритином расположен в районе перегиба («колена») ДХФ, который у Т-чётных фагов сформирован дистальной С-концевой частью пг 34 (проксимальная половинка фибриллы) и белками пг35 и пг36, формирующими проксимальную часть дистальной половинки фибрилл. Анализ полиморфизмов этих участков у различных Т-чётных и дистантно-родственного им бактериофага RB49 позволил предположить, что за взаимодействие с фибритином отвечает С-концевой домен пг36, отграниченный от предшествующей части молекулы консервативной последовательностью GDTMTG. У многих

фагов из групп псевдо-Т-чётных и шизо-Т-чётных обнаружена несколько иная организация данного локуса: вместо генов 36 и 37, формирующих дистантную половинку фибриллы, обнаружены две неидентичные копии гена белка, имеющего N-концевой домен, гомологичный N-концу пг 36, а С-концевую область – сходную с пг37 Т-чётных фагов. Эти участки разделены центральной областью, имеющей мало сходство с белками Т-чётных фагов. Такая организация локуса ДХФ у фагов данной группы была обнаружена нами впервые. Интересно, что дупликация генов хвостовых фибрилл обнаружена нами также у Т5-подобных фагов, хотя сам фаг Т5 несёт единственный ген этого белка.

Исходя из предположительно идентифицированного на основании эволюционных данных участка взаимодействия ДХФ с фибритином нами был проведён направленный мутагенез гена 36 у фага Т4 с помощью рекомбинации с плазмидой, несущей искусственно сконструированный участок данного гена с заменами аминокислотных остатков (N194Y:P195S и S197W). Полученные фаги тестировались на способность адсорбироваться в присутствии ПЭГ (признак, использованный Follansbee et al, 1974, для обнаружения мутации, приведшей к открытию функции гена *wac*). Было обнаружено, что эти мутанты обладают частичной резистентностью к ПЭГ (растут при 5% ПЭГ 6000, но ингибируются 6,4% этого вещества). В то время как по данным Follansbee et al (1974) их мутант по фибритину обладал полной устойчивостью к ПЭГ в концентрации 6,4%. Однако, анализ свойств делеционного мутанта по гену *wac*, созданного методами генной инженерии без отбора в присутствии ПЭГ (любезно предоставлен В.В. Месянжиновым) также обнаружил фенотип частичной устойчивости. По-видимому, в работе (Follansbee et al, 1974) был отобран множественный мутант, что было не замечено авторами. В результате анализа этих данных и ранее опубликованных результатов (Follansbee et al. 1974, Brenner et al. 1962, Kostuchenko et al. 2004) нами была предложена

двустадийная модель срабатывания молекулярного сенсора фага Т4 (Рис 5.)

Исследование распространённости механизмов модульного обмена в эволюции геномов бактериофагов группы Т-чётных

Эти работы проводились в рамках участия в проекте определения полных последовательностей геномов фагов, родственных Т-чётных, организованном группами Н.М. Krisch (LMGM CNRS, Франция) и J. Karam (Университет Tulane, США), а также в рамках совместного проекта с группой N.H. Mann (Великобритания) по секвенированию генома цианофага, родственного Т4.

В результате анализа полученных геномных последовательностей было установлено, что большинство этих фагов имеет весьма консервативные кор-области генома, включающие гены морфогенетических белков (за исключением адгезинов, фибритина и внутренних белков капсида IP), а также белков репликации ДНК. В кор-регионах нами обнаружено крайне мало делеций или инсерций генов или белковых доменов, что свидетельствует о преимущественно дивергентной эволюции этой части генома. Это позволяет говорить о естественности филогении данной группы фагов, построенной на основе последовательностей главного белка капсида (Tetart et al. 2001) и других белках кор-региона.

Кор области генома начинают размываться только у самых отдалённых ветвей данной группы, как у экзо-Т-чётных (первый представитель которых, цианофаг Spm-2, был охарактеризован с нашим участием). Пластичные регионы содержат гены модификации ДНК, а также большое число рамок считывания с неизвестными функциями, активно заменяемыми у разных фагов вследствие латерального переноса генов.

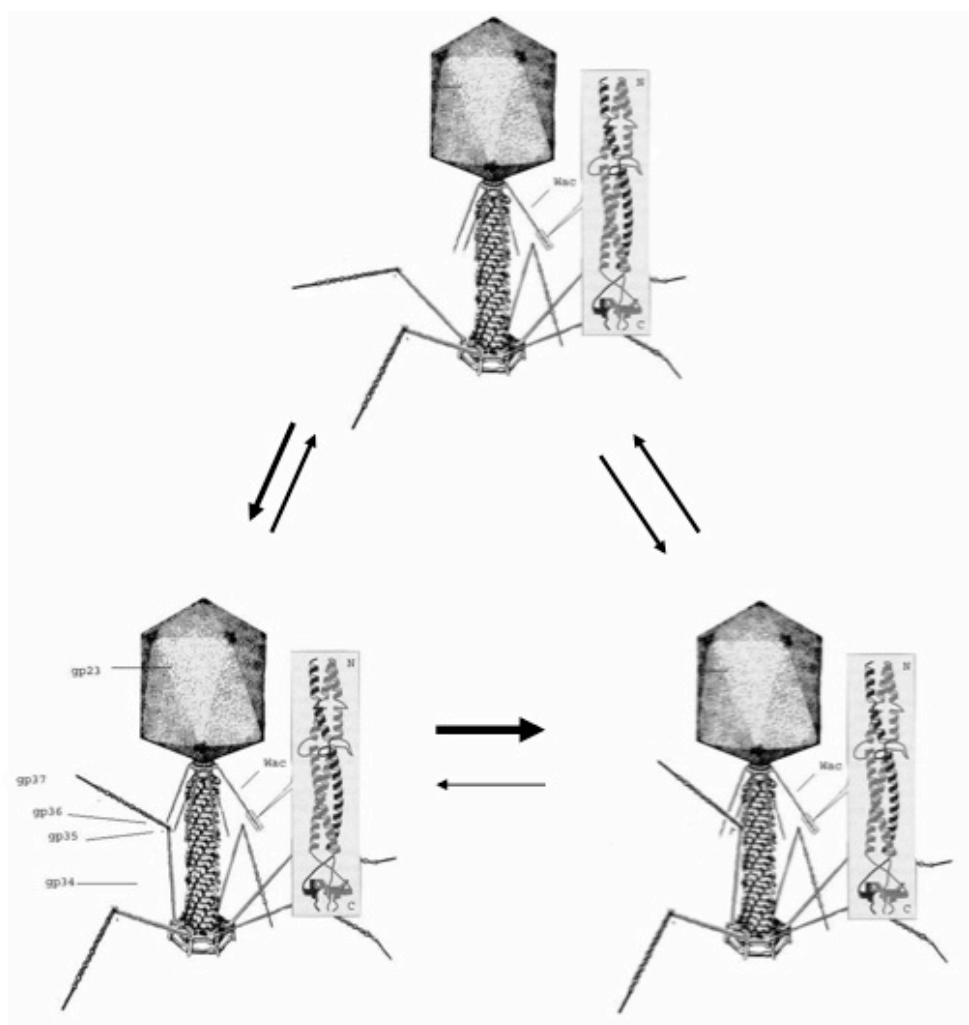


Рис. 5 Двухстадийная модель работы молекулярного сенсора фага Т4. ДХФ сначала «захватывается» фибритином в районе С-концевой части пг 36, а затем приводится в контакт с сократимым чехлом, где и фиксируется, обеспечивая блокировку инфекции. Последняя реакция может также осуществляться и напрямую, минуя взаимодействие фибритин-ДХФ, что объясняет частичную устойчивость к ПЭГ исследованных в работе мутантов фага.

Отдельное положение занимают часть белков адсорбционного аппарата и фибритин. При рассмотрении геномов фагов, не слишком отдалённых в филогенетическом отношении от Т-чётных, N- концевые домены этих белков, обеспечивающих присоединение этих молекул к другим

белками вирусной частицы, можно было бы отнести к кор-региону, поскольку они не только сохраняют консервативную последовательность, но и обнаруживаются в сходных позициях относительно других генов. В настоящее время, однако, описаны ряд представителей этой группы фагов (такие как Spm-2, CBA120), имеющие полностью иные наборы фибриллярных адгезинов и лишённые гомологов фибритина. Таким образом, данную группу генов можно отнести к периферической области кор-региона, в которой преобладают модульные перестановки, захватывающие отдельные белковые домены.

Вопрос о том, применимо ли выявление модульных перестановок доменов фибритина у фагов, родственных T-чёрным, как индикаторов динамики сообщества в реальном масштабе времени, не вполне ясен. Несмотря на специально предпринятые поиски, нам не удалось обнаружить двух близко родственных фагов этой группы, у которых С-концевой домен фибритина существенно различался бы (за исключением фагов JS98C3 и JS98, различие фибритинов которых сводится к делеции (или инсерции) повторяющихся аминокислотных мотивов между двумя мотивами, сходными с фолдом фибритина T4). Более того, анализ имеющихся к моменту написания автореферата последовательностей гомологов фибритина позволяет выявить несколько основных типов организации этого белка, отличающихся структурой С-концевого домена, в частности: типы T4, RB49, RB43, Aeh I, JS98, KVP40 и Δ - фибритины, лишённые фолдона, как у фага PC42; Рис. 4). При этом наличие фибритина того или иного типа хорошо коррелирует с филогенией главного капсидного белка gp23 этих фагов (Рис.6). Таким образом, можно предположить, что активные модульные перестановки в данном локусе имели место в течение определённого периода эволюции данной группы, после чего по непонятным причинам стали значительно более редкими событиями.

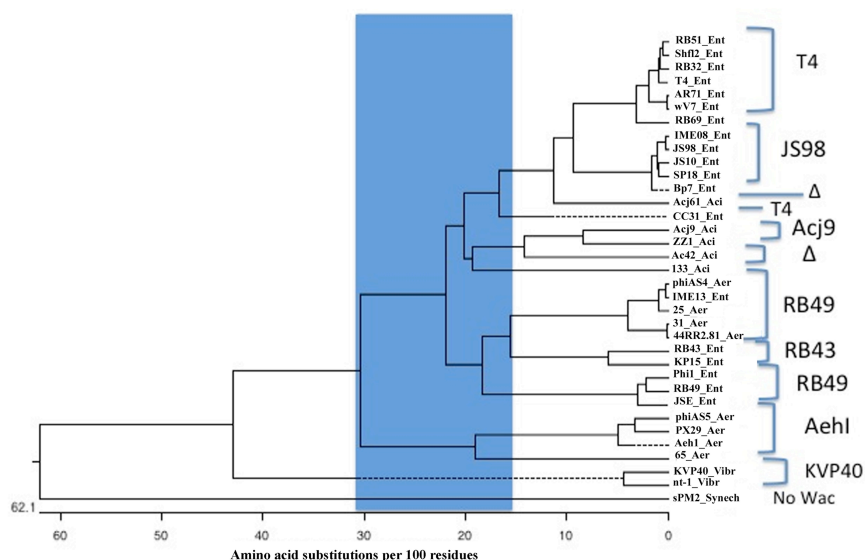


Рис. 6. Распределение типов С-концевых доменов фибритина в различных филогенетических группах (филогения по последовательности пг 23) бактериофагов, родственных Т-чётным. Темный прямоугольник соответствует предполагаемому периоду активных модульных перестановок этих доменов.

Таким образом, для того, чтобы охарактеризовать геномные полиморфизмы, отражающие современные процессы адаптации фагов и могущие служить признаком интенсивной динамики (Red Queen dynamics) определённых природных сообществ, необходимо решить следующие задачи: 1) найти природную экосистему, в которой происходит активное размножение фагов в литическом цикле при достаточно высокой плотности популяций хозяев. При этом предпочтительно, чтобы в эту систему входили вирулентные колифаги - наиболее удобные объекты для молекулярно-биологического анализа; 2) получить серии близкородственных и экологически связанных изолятов фагов и 3) охарактеризовать геномные полиморфизмы у этих вирусов и исследовать их значение для физиологии жизненного цикла соответствующих фагов.

Исследование экологии колифагов в природном микробном сообществе

Ряд механизмов микроэволюционных адаптаций бактериофагов, описанных нами на примере группы фагов, родственных Т-чёрным, позволяет предположить, что подобные механизмы могут обеспечивать адаптацию фаговых популяций в природных микробных сообществах *in situ*, в масштабах времени, сопоставимых с характерными периодами массообмена в этих сообществах. Однако, до настоящего времени не существует хорошо разработанных и охарактеризованных модельных природных сообществ, которые бы включали вирулентные фаги (особенно желательны – вирулентные колифаги) в качестве своих автохтонных компонентов, в которых реализовывалась бы интенсивная динамика взаимных адаптаций фаговых и бактериальных популяций и которые были бы достаточно стабильны и доступны для исследования.

Поскольку, в отличие от вирулентных колифагов, местообитание их хозяев – *E.coli* и иных колиформных бактерий хорошо известно – это кишечные микробные сообщества животных, мы поставили задачу поиска вида млекопитающих, экология кишечника которого соответствовала бы вышеописанным критериям.

Анализ данных о физиологии кишечника различных животных позволил предположить, что наиболее перспективным объектом является домашняя лошадь. Нами были предприняты исследования разнообразия вирусоподобных фаговых частиц, а также динамики популяций колифагов, определяемых на лабораторных тест-культурах с целью подтвердить наличие в экосистеме кишечника лошади высокой активности вирулентных колифагов и признаков активной взаимной адаптации этих вирусов и их хозяев по типу Red Queen dynamics.

Мы исследовали морфологическое разнообразие вирусных частиц в некультивируемом сообществе,

экстрагированном из фекалий лошади. Было обнаружено, что подавляющее большинство вирусоподобных частиц представляет собой частицы хвостатых бактериофагов, характеризующиеся значительным разнообразием по морфологии. Считая одним морфологическим типом частицы, у не отличимые по наблюдаемым признакам, включая размеры структурных элементов, мы выделили 69 различных морфологических типов, присутствующих одновременно в фекалиях одного животного. Некоторые из них представлены на Рис. 7.

Наиболее представленный морфологический тип (S18) составлял около 10% всех вирусных частиц. Обращает на себя внимание наличие многочисленных крупных фаговых частиц (S2, S18, M3, M5, M7, M18 на Рис. 9), которые с высокой вероятностью принадлежат вирулентным фагам. Кроме этого, интересно присутствие большого числа морфотипов сифовирусов с очень длинными (> 300 нм) хвостами, которые сравнительно немногочисленны среди культивируемых бактериофагов.

Возможно, такая организация вириона обеспечивает преимущества в вязкой среде, позволяя сканировать большее пространство в поисках клеточных рецепторов за счёт вращательных тепловых движений частицы.

Таким образом, морфологический спектр фаговых частиц с учётом времени массообмена в системе свидетельствует, что вирулентные фаги активно размножаются в кишечнике лошади, что даёт основание предполагать активную адаптацию вирусных и бактериальных популяций (Red Queen dynamics).

Осуществление мониторинга индивидуальных популяций фагов в некультивируемом сообществе прямыми методами технически весьма затруднительно. Кроме того, для экологии этих вирусов и их хозяев существенное значение имеет штаммовая специфичность инфекции. Поэтому важную часть информации о характере экологической динамики фагов можно получить только с помощью культуральных методов.

Мониторинг численности колифагов, способных расти на лабораторных штаммах *E.coli*, и сопряжённый мониторинг числа колиформных бактерий в фекалиях лошадей мы проводили в течение 14-18 сут., причём образцы отбирали каждые 2 суток (Рис. 8).

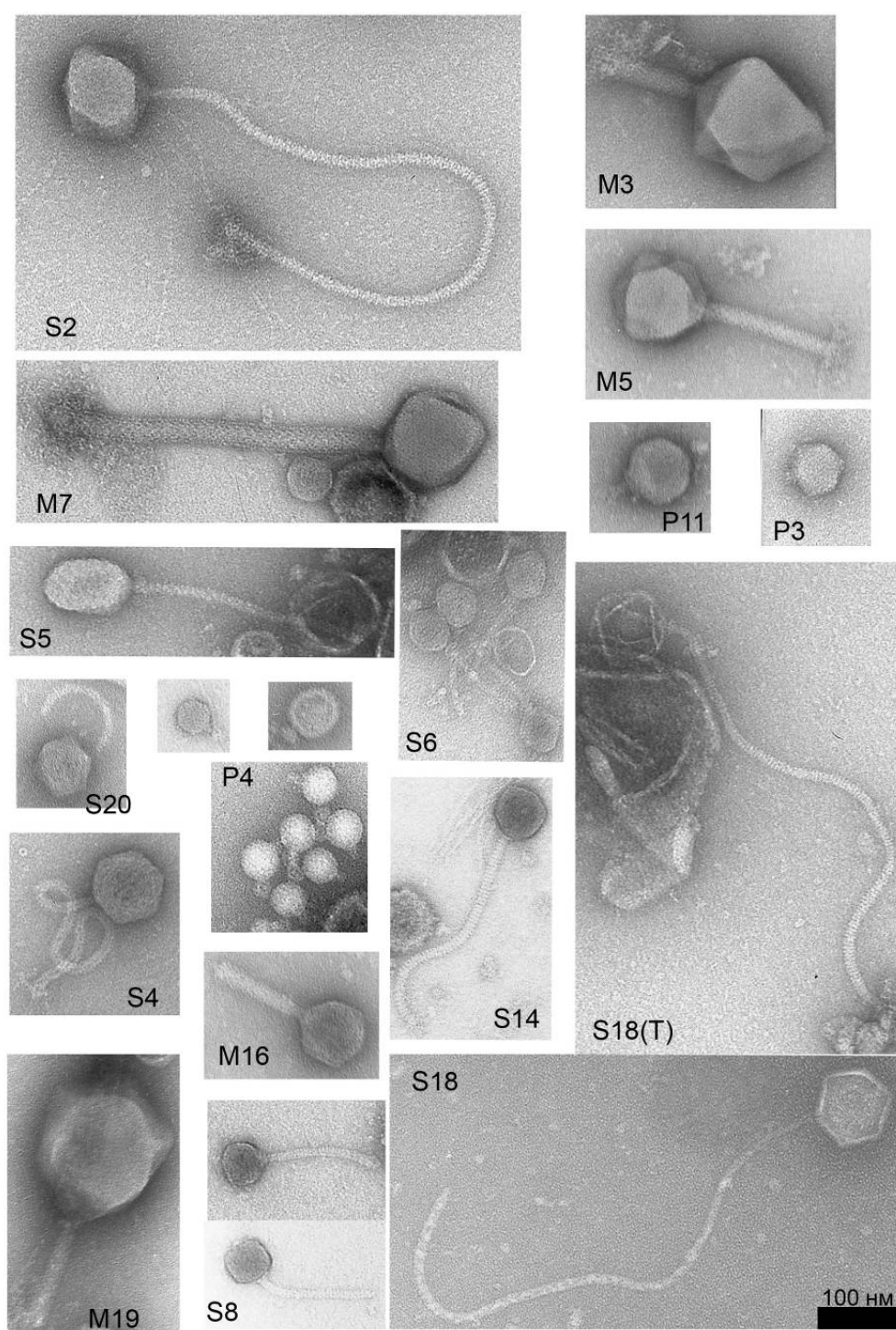


Рис. 7. Морфологическое разнообразие вирусных частиц в некультивируемом вирусном сообществе лошади. S-Siphoviridae, М – Myoviridae, Р – Podoviridae

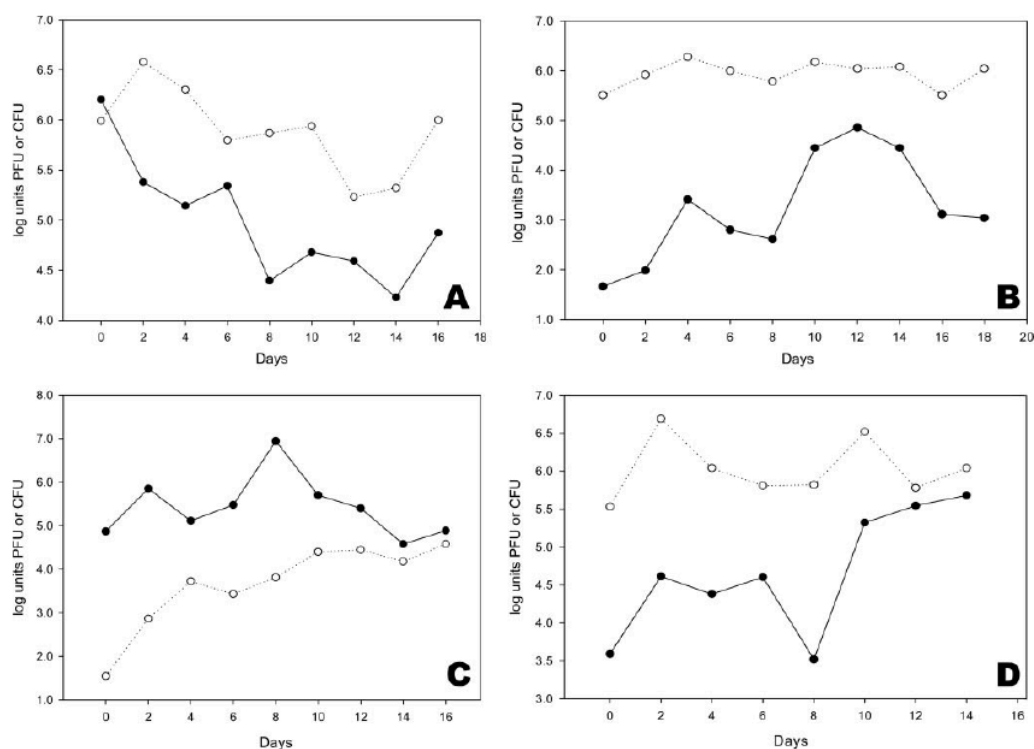


Рис. 8. Динамика численности колифагов, определяемых на индикаторном штамме E.coli S600 (тёмные кружки) и колиформных бактерий на среде LTA (светлые кружки) у 4 лошадей, обозначенных А, В, С и D (Golomidova et al. 2007)

Обращает на себя внимание выраженная динамика численности фагов – в данном эксперименте до 3 порядков величины - при значительно меньших колебаниях численности потенциальных хозяев.

Штаммовая специфичность бактериофагов может приводить к тому, что лишь определённая фракция индивидуальной популяции E.coli каждого животного способна поддерживать рост фагов, титруемых на используемом индикаторном штамме.

Для исследования уровня внутривидовой гетерогенности популяций колиформных бактерий необходимо было найти производительный и высокоразрешающий метод дифференциации штаммов. Высокие требования к разрешающей способности определяются тем, что многие весьма близкие в генетическом отношении изоляты бактерий имеют значительные отличия по чувствительности к бактериофагам, присутствующим в тех же сообществах.

Для решения этой задачи нами был предложен новый метод геномного ПЦР-фингерпринтинга, основанный на амплификации фрагментов ДНК, расположенных между копиями мобильного генетического элемента IS1 и/или последовательностями, сходными с его терминальными повторами (Рис. 9), которые широко распространены в геномах *E. coli* и близких к ней энтеробактерий.

В дальнейшем эта методика была нами усовершенствована и на ее основе были разработаны сходные методы с использованием других мобильных элементов в качестве мишеней.

С помощью этого метода оказалось возможным быстро дифференцировать получаемые изоляты с достаточным разрешением. Изоляты, имеющие идентичные IS1 профили, не отличались по чувствительности к фагам, тогда как изоляты, имеющие различные профили, как правило, различались и по способности поддерживать рост тех или иных фагов.



Рис. 9. Принцип геномного ПЦР-фингерпринтинга с использованием праймера, гибридизующегося с терминальными повторами инсерционного элемента IS1 и сходными с ними участками ДНК.

Данное утверждение сделано только относительно природных изолятов, поскольку отбираемые в лаборатории фагоустойчивые мутанты имеют слишком малые генетические различия, не детектируемые методами фингерпринта.

Уровень штаммового разнообразия, обнаруженный у животных, использованный для эксперимента по мониторингу (см. Рис. 10) оказался чрезвычайно высок и составлял около 1000 одновременно присутствующих штаммов (680 – 1500, $p < 0,05$, статистический критерий Chao1) в каждом образце фекалий (Рис.10).

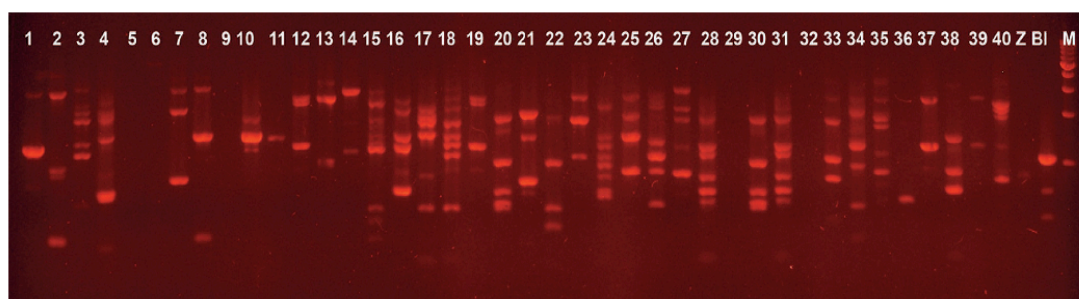


Рис. 10. IS1 фингерпринтинг изолятов колиформных бактерий, полученных из двух образцов фекалий лошадей. Дорожки 1-20 – образец №1, дорожки 21-40 – образец №2, Z и BI – штаммы E.coli Z85 и BL21. M – маркер.

Параллельно нами проводились исследования разнообразия колифагов, выделяемых как на лабораторных штаммах E.coli, так и на культурах полевых изолятов, полученных от тех же животных.

Разнообразие бактериофагов, выделяемых от каждого животного на определённом штамме как правило было весьма ограничено. В большинстве случаев при RFLP типировании лизатов, выращенных непосредственно из первичных бляшек, удавалось обнаружить 1 – 2 различных типа профилей. Однако, при посеве одного и того же материала на разные тест культуры, в том числе и на изоляты, полученные из того же самого образца, практически во всех случаях получали различающиеся линии бактериофагов, часто относящиеся к

различным группам. Всего нами были идентифицированы около различных 30 колифагов, относящиеся к следующим группам (определяемым как сходные с нижеперечисленными представителями): T4; T5; N4; φEco32; rv5; Felix01, группа фагов K1 капсульных штаммов E.coli, фаг Cd1 Caulobacter. Для 5 фагов определены полные последовательности геномов.

Обращает на себя внимание, что все идентифицированные нами колифаги относятся к известным группам вирулентных фагов. Ни одного изолята, относящегося к умеренным бактериофагам, выделено не было. Интересно также отметить, что в ряде случаев нам удавалось получить серию близкородственных изолятов, выделяемых от одного животного или от животных, содержащихся на той же конюшни. Так, например, получены 6 изолятов T5-подобных фагов, 5 N4 – подобных фагов и другие. Во всех случаях изоляты данных серий различались по способности размножаться на некоторых сопутствующих им штаммах, а также имели более или менее выраженные различия рестрикционных профилей ДНК.

По-видимому, одновременное присутствие очень близких, но различающихся по спектру хозяев вирусов отражает быструю динамику геномов в процессе адаптации (микроэволюции) *in situ*.

Опираясь на полученные нами полные последовательности геномов, мы охарактеризовали подробнее полиморфизмы, обнаруженные в области генов белков аппарата адсорбции у N4- подобных и у T5 -подобных изолятов.

Базовым геномом для исследования N4- подобных фагов послужил ранее выделенный нами бактериофаг G7C. В целом геном этого вируса обнаруживает значительное сходство с геномом колифага N4, уровень идентичности аминокислотных последовательностей составляет в среднем 60-80%. Однако, в области ранних генов у этих фагов имеются существенные отличия, несмотря на которые все ранние гены, функция которых связана с переключением фаз транскрипции, сохраняются и в геноме фага G7C. Наиболее сильно геном фага

G7C отличается от N4 в области генов белков адсорбции. Его адсорбционный аппарат представлен только 2 белками: пг 63.1 и пг 66.

При этом лишь N-концевой домен пг66 имеет гомологию с соответствующим белком фага N4. И пг 63.1, и пг 66 имеют участки гомологии с адгезинами фагов Det7 и CBA120 - миовирусов, белки адсорбции которых подобны хвостовым шипам подовирусов (Kutter et al. 2011, Walter et al, 2008), что позволяет предполагать химерное происхождение их геномов.

Эти участки расположены на N-конце пг 63.1 и ниже N4-подобного домена пг 66. Подобная организация заставляет предположить, что пг 66 служит интерфейсом для присоединения пг 63.1 и для соединения этого комплекса с одним из N4 подобных белков вириона G7C посредством N-концевого домена пг 66 (Рис 11.) Интересно, что пг 65 фага N4 является жизненно важным для узнавания рецептора (McPartland and Rothman-Denes, 2009). Какой из белков G7C функционально замещает его, неизвестно.

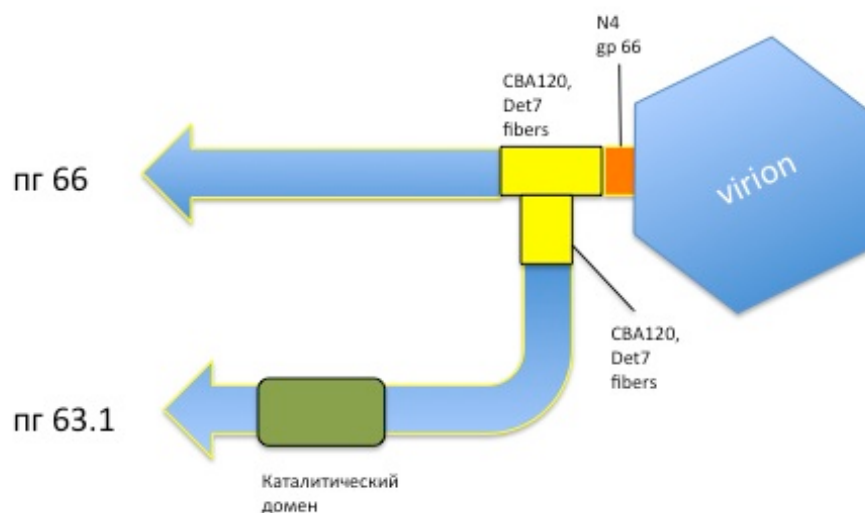


Рис. 11. Схема предполагаемого соединения фибрилл фага G7C с вирионом. Отмечены участки гомологии аминокислотных последовательностей с пг 66 фага N4 и с фибриллярными белками фагов Det7 и CBA 120.

Методами биоинформатики в последовательности белка пг 63.1 предсказывается наличие каталитического гидролазного (липазного или эстеразного) домена.

Гетерологичная экспрессия этих белков в клетках *E.coli* позволила получить в препаративном количестве пг 63.1 и исследовать его взаимодействие с клетками *E.coli*. Было установлено, что этот белок транзиторно связывается с поверхностью клеток штамма *E.coli* 4s, хозяина фага G7C, но через несколько минут диссоциирует от них. Однако при добавлении свежей порции клеток цикл связывания – диссоциации повторяется (Рис. 12).

Связывания не наблюдали, если использовали клетки других штаммов *E. coli*, не чувствительных к фагу G7C или клетки резистентного мутанта 4sR. Таким образом, можно заключить, что пг 63.1 действительно обладает каталитической активностью, необратимо модифицирующий один из рецепторов фага на поверхности клеток.

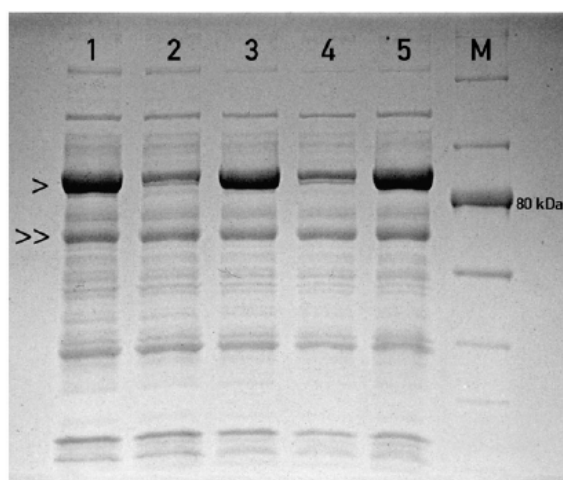


Рис. 12. Транзиторное связывание пг 63.1 фага G7C с клетками *E.coli* 4s.

Дорожки: 1 - лизат клеток, экспрессирующих пг 63.1 (отмечен >) с добавлением бычьего сывороточного альбумина (>>) в качестве внутреннего контроля. 2 – тот же лизат через 1 мин после добавления 10^9 клеток и центрифугирования. 3 – то же через 15 мин. 4-5 – повторный цикл связывания – диссоциации при добавлении свежих клеток. М – маркер.

Генетическими методами в исходном лизате фага G7C нами обнаружен иной, близкородственный G7C бактериофаг, названный ALT, у которого модуль адсорбции заменён на два гена, подобных пг 63.1 и пг 66 G7C, но сильно отличающихся по последовательности аминокислот. Каталитические домены в белках ALT не обнаруживаются. Ген 66-alt не имеет участка гомологии с пг 66 фага N4, что позволяет предположить, что у фага ALT имеются отличия в одном из белков вириона. Нами была создана ПЦР-система, позволяющая детектировать фаг ALT. С ее помощью из исходного (первичного) лизата G7C был выделен бактериофаг, обладающий пг 63.1-alt, но его пг 66 не отличался от пг 66 G7C. Этот фаг был назван ALT63. Спектр хозяев ALT63 отличается от фага G7C, в частности, он образует бляшки на некоторых культурах 4sR, отобранных на устойчивость к фагу G7C. Секвенирование ряда фрагментов генома ALT63 общей протяженностью около 5 т.п.н. выявило 100% идентичность их с G7C, что свидетельствует о том, что один из этих фагов возник из другого в результате очень недавнего рекомбинационного события. Нами выделены от животного, послужившего источником фага G7C, также другие близкородственные, но имеющие определённые отличия вирусы, персистировавшие не менее 3 лет. Таким образом, нами охарактеризованы геномные полиморфизмы адсорбционного аппарата у N4-подобных фагов, заключающиеся в полной замене всего модуля адсорбции на гетерологичный, а также в модульной замене отдельных генов в пределах одного типа данных модулей (фаги G7C-ALT63-ALT).

Исследование адсорбционных аппаратов у фагов, родственных T5 было выполнено на двух изолятах, неотличимых по рестрикционным профилям, но различающимся по спектру хозяев. Геномы этих фагов – DT57C и DT57-1/2, были полностью секвенированы и аннотированы. Последовательности большинства генов этих вирусов имеют высокую степень сходства с фагом T5 на нуклеотидном уровне, однако области адсорбции существенно отличаются. Рецептор-

узнающие белки Hrs этих вирусов идентичны между собой и гомологичны белку Hrs T5-подобного фага BF23. Рецептор-блокирующий липопротейн Ipr у наших фагов оказался идентичен таковому фага BF23 и, будучи проэкспрессирован с плазмиды, обеспечивал устойчивость клеток к нашим изолятам и фагу BF23, но не к T5.

Регион хвостовых фибрилл DT57C и DT57-1/2 содержит два гена ltf, в отличие от фагов T5 и BF23. Оба гена имеют регионы негомологии между фагами DT57C и DT57-1/2, однако только в гене ltf-2 этот участок расположен в С-концевой области белка, отвечающей за взаимодействие с рецептором. При инфекции фагом DT57-1/2 клеток, содержащих плазмиду с участком ltf-2 фага DT57C приводила к появлению в потомстве рекомбинантных фагов, имеющих спектр хозяев, характерный для DT57C. Рекомбинация с геном ltf-1 не приводила к изменению спектра хозяев. Таким образом, одной из детерминант хозяйской специфичности, необходимой для роста наших фаговых изолятов по меньшей мере на некоторых штаммах хозяев. Интересно, что хвостовые фибриллы фага T5 считают несущественными для жизнеспособности в лабораторных условиях. Также как и в случае с N4- подобными изолятами, мы наблюдаем результат недавнего рекомбинационного события у очень близких изолятов, полученных от одного и того же животного.

В результате проведённых исследований нами охарактеризованы процессы перестановок генетических модулей различного уровня в адсорбционных аппаратах бактериофагов, родственных T-чёрным. Впервые детально исследован вопрос об эволюции фагового фибриллярного coiled coil белка и соотношения процесса обмена модулей доменного уровня с консервативным путём фолдинга белка. Для целей исследования процессов адаптации вирулентных бактериофагов *in situ* нами найдена и охарактеризована удобная модельная система – симбиотический микробоценоз кишечника лошади. Эта система в настоящий момент является

уникальным примером природного микробного сообщества, которое стабильно, доступно для исследования, содержит в качестве автохтонных компонентов вирулентные бактериофаги, находящиеся в процессе активной адаптации, и является в то же время естественным местообитанием *E.coli* и ее вирулентных фагов. Исследования серий близкородственных и экологически связанных – то есть полученных от одного или от нескольких, содержащихся вместе животных, позволили выявить недавние события перемещения генетических модулей разного уровня, отражающие динамику геномов этих вирусов *in situ*.

ВЫВОДЫ

- 1) Установлен путь фолдинга фибритина бактериофага Т4, инициируемый тримеризацией С-концевого домена (фолдона).
- 2) Описаны модульные замены С-концевых областей фибритина у фагов, родственных Т-четным, при которых функция инициации фолдинга переходит к новым доменам, приобретенным вследствие латерального переноса. Получены данные, свидетельствующие в пользу гипотезы о том, что упомянутые модульные перестановки происходили в пределах ограниченного по времени периода в эволюции фагов, родственных Т-четным (гетерохронная эволюция).
- 3) Гены фибритина и других белков адсорбционного аппарата Т-чётных фагов по характеру эволюционной изменчивости занимают промежуточное положение между кор-областью и пластичной областью генома.
- 4) Установлено, что в процессе работы молекулярного сенсора бактериофага Т4 происходит взаимодействие С-концевого домена пг36, входящего в состав длинных хвостовых фибрилл, с С-концевой областью фибритина. Предложена двухстадийная модель перехода ДХФ из активного в неактивное состояние.

- 5) Микробное сообщество кишечника лошади представляет собой природную экосистему, включающую в качестве своих индигенных компонентов вирулентные колифаги и их хозяев, в которой происходит активная взаимная адаптация фаговых и бактериальных популяций.
- 6) Предложены новые системы геномного ПЦР-фингерпринтинга колиформных энтеробактерий, обеспечивающие дифференциацию штаммов с высоким разрешением. С помощью этих систем продемонстрирован высокий уровень внутривидового разнообразия индивидуальных популяций колиформных бактерий в кишечнике лошади.
- 7) В сериях близкородственных и экологически связанных изолятов N4-подобных и T5-подобных колифагов, охарактеризованы модульные перестановки на геномном уровне, приводящие к изменению спектра хозяев фагов. Эти полиморфизмы вызваны недавними рекомбинационными событиями и отражают процессы экологической адаптации бактериофагов *in situ*.
- 8) У колифагов различных семейств, обладающих различной архитектурой адсорбционного аппарата, превалируют сходные механизмы адаптации адгезинов в процессе микроэволюции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Letarov A.V., Krisch H.M. The episodic evolution of fibrin: traces of ancient global environmental alterations may remain in the genomes of T4-like phages. // *Ecol Evol.* 2013. V. 3. P. 3628-3635. doi: 10.1002/ece3.730.
2. Miernikiewicz P., Dąbrowska K., Piotrowicz A., Owczarek B., Wojas-Turek J., Kicielińska J., Rossowska J., Pajtasz-Piasecka E., Hodyra K., Macegoniuk K., Rzewucka K., Kopciuch A., Majka T., Letarov A., Kulikov E., Maciejewski H., Górski A. T4 phage and its

head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production. // PLoS One. 2013. 8(8):e71036. doi: 10.1371/journal.pone.0071036.

3. Летарова М.А., Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Прохоров Н.С., Кутузова Н.М., Стрелкова Д.М., Бакумова А.Д. Летаров А.В. Метастабильные ассоциации, формируемые в системе фаг - хозяин, выделенной из фекалий лошади. //Вестник УГСХА. 2013. Т. 3. № 23. С. 57-61.

4. Kulikov E., Kropinski A.M., Golomidova A., Lingohr E., Govorun V., Serebryakova M., Prokhorov N., Letarova M., Manykin A., Strotskaya A. and Letarov A. Isolation and characterization of a novel indigenous intestinal N4-related coliphage vB_EcoP_G7C.// Virology. V. 426. P. 93-99.

5. Letarova, M., Strelkova, D., Nevolina, S., Letarov, A. A test for the "physiological phagemia" hypothesis-natural intestinal coliphages do not penetrate to the blood in horses. // Folia Microbiol (Praha) V. 57. P. 81-88.

6. Clokie, M.R.J., Millard A.D., Letarov A.V., Heaphy S. Phages in nature. // Bacteriophage. 2011. V.1. P. 31-45.

7. Летаров А.В., Голомидова А.К., Тарасян К.К. Экологические основы рациональной фаговой терапии. // Acta naturae. 2010. Т. 1. №2. 66-79.

8. Исаева А.С., Куликов Е.Е., Тарасян К.К., Летаров А.В. Новый метод высокоразрешающего геномного ПЦР-фингерпринтинга энтеробактерий. Acta naturae, 2010. Т.1. №2. 82-87.

9. Letarov A. and Kulikov E. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. // J. Appl. Microbiol. 2009. V. 107. P. 1-13.

10. Golomidova A., Kulikov E., Isaeva A., Manykin A. and Letarov A. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions. //Appl. Environ. Microbiol. 2007. V.73. P. 5975-5981.

11. Латыпов О.Р., Голомидова А.К., Летаров А.В. «Характеристика продукта гена *was* бактериофага JS98C3, близкородственного фагу JS98» // Ученые записки Казанского государственного университета Т.149. Кн.4. С. 1-11.

12. Куликов Е.Е., Исаева А.С., Роткина А.С., Манькин А.А. и Летаров А.В. Биоразнообразие и динамика бактериофагов в фекалиях лошадей. // Микробиология. 2007. Т.76. С.271-278
13. Comeau A.M., Bertrand C., Letarov A., Tetart F. and Krisch H.M. Modular architecture of the T4 phage superfamily: A conserved core genome and a plastic periphery.// Virology. 2007. V. 362. P. 384-396.
14. Letarov A., Manival X., Desplats C. and Krisch H.M. gpwac of the T4-type bacteriophages: structure, function, and evolution of a segmented coiled-coil protein that controls viral infectivity. // J. Bacteriol. 2005. V.187. P. 1055-1066.
15. Mann N.H., Clokie M.R., Millard A., Cook A., Wilson W.H., Wheatley P.J., Letarov A. and Krisch H.M. The genome of S-PM2, a "photosynthetic" T4-type 288bacteriophage that infects marine *Synechococcus* strains. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 3188-3200.
16. Boudko S.P., Londer Y.Y., Letarov A.V., Sernova N.V., Engel J., and Mesyanzhinov V.V. Domain organization, folding and stability of bacteriophage T4 fibritin, a segmented coiled-coil protein. //Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 833-841.
17. Летаров А.В., Лондер Ю.Я., Будько С.П. и Месянжинов В.В. Карбокси-концевой домен иницирует тримеризацию фибритина бактериофага Т4. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 817-823
18. Летаров А.В. Реконструкция возможных путей возникновения и морфологической эволюции бактериофагов. // Генетика. 1998. Т. 34. С. 1461-1469.

Избранные публикации в других изданиях

19. Letarov A. Bacteriophages as a part of the human microbiome. // in Bacteriophages in Health and Disease (Hyman and Abedon eds). 2012. CAB International Press.
20. Летарова М.А., Стрелкова Д.А., Бакумова А.Д., Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Прохоров Н.С., Кутузова Н.М., Летаров А.В. Псевдолизогенные ассоциации вирулентного бактериофага G7C

и шамма-хозяина *E. coli* 4s. // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Международной научно-практической конференции. 2013. Ульяновск Т.2. С. 140 -144.

21. 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. Предварительный анализ генома нового колифага phiKT, близкородственного фагу *Caulobacter crescentus* Cd1. // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Международной научно-практической конференции. 2013. Ульяновск Т.1 с. 54 – 59

22. Прохоров Н.С., Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Летаров А.В. Механизмы взаимодействия фага *vb_EcoP_G7C* и родственных ему колифагов с клетками *Escherichia coli* на ранних стадиях инфекции. // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Международной научно-практической конференции. 2013. Ульяновск Т. 1. С. 195 – 198.

Летаров А.В. Эволюционная динамика, фолдинг и функция некоторых фибриллярных белков бактериофагов, родственных Т-чётным фагам энтеробактерий. // Труды ИНМИ им. С.Н. Виноградского РАН. 2004. Вып. XII. Москва. С. 269-288.