

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт
микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской Академии Наук»

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Московский педагогический государственный
университет»

На правах рукописи

Летаров Андрей Викторович

**ЭВОЛЮЦИОННАЯ ДИНАМИКА БЕЛКОВ АДСОРБЦИОННОГО
АППАРАТА НЕКОТОРЫХ ГРУПП БАКТЕРИОФАГОВ**

специальности 03.01.06 - вирусология и 03.01.03 - молекулярная биология

диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант
д-р биол. наук, профессор Н.М. Кутузова

Москва 2014

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.к. – аминокислота (аминокислотный остаток)

Б.О.Е. – бляшкообразующая единица

К.О.Е. – колониеобразующая единица

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН - додецилсульфат натрия

ДХФ – длинная хвостовая фибрилла

ИПТГ - изопропил-1-тио-β-галактозид

КДа –килодальтон

MALDI-TOF (масс-спектрокопия) – Matrix assisted laser desorption-ionization – time of flow (времяпролётная масс-спектрокопия с лазерной десорбцией-ионизацией с помощью матрикса)

п.н. - пара нуклеотидов

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов

ПААГ - полиакриламидный гель

пг - продукт гена

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПЭГ - полиэтиленгликоль

Трис – трис-гидроксиметиламинометан

ФМСФ - фенилметилсульфонилфлюорид

ЭДТА - этилендиаминтетраацетат натрия.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. ВВЕДЕНИЕ.....	7
I.1 Актуальность темы.....	7
I.2 Цель и задачи работы.....	9
I.3 Новизна исследования.....	9
I.4 Научная и практическая значимость.....	10
I.5 Положения, выносимые на защиту.....	11
II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
II.1 Бактериофаги и их разнообразие	13
II.1. 1 Классификация бактериофагов....	13
II. 1.2 Разнообразие жизненных циклов бактериофагов	14
II.2 Основные механизмы эволюции бактериофагов	16
II.3 Экология бактериофагов - общие принципы	20
II.3.1 Основные принципы экологии бактериофагов в природных микробных сообществах	20
II.4 Экология бактериофагов в симбиотических микробных сообществах человека и животных	31
II.4.1. Количество и разнообразие бактериофагов в микрофлоре животных	32
II.4.2 Экология культивируемых бактериофагов.....	39
II.4.3 Взаимодействия фаг-клетка – экологически значимые особенности	49
II. 4.4 Прямое взаимодействие фаговых частиц с тканями и клетками макроорганизма	50
II.5. Бактериофаг Т4. Семейство Т4-подобных бактериофагов.....	56
II.5.1 Общая характеристика группы	56
II.5.2 Фибритины Т4-подобных бактериофагов	61
II.6. Фолдинг белка	65
II.6.1 Общие закономерности фолдинга	65
II.6.2 Формирование структуры coiled coil	70
II.7. Особенности олигомеризации и фолдинга фибритина фага Т4	74

II.7.1 С-концевой домен (фолдон) и инициация фолдинга фибритина ..	75
III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	78
III.1 Плазмиды, штаммы бактерий и бактериофагов и их культивирование	78
III.2 Выделение бактериофагов и колиформных бактерий	80
III.3 Создание библиотек случайных клонов геномов бактериофагов, клонирование и выделение плазмидной ДНК	81
III.4 ПЦР, олигонуклеотидные праймеры и секвенирование.....	82
III.5. ПЦР-фингерпринтинг энтеробактерий	84
III.6 Электронная микроскопия	85
III.7. Экспрессия белков и анализ на растворимость	85
III.8 Ограниченный протеолиз	87
III.9 Предсказание вторичной и третичной структуры белковых доменов	87
III.10 Получение мутантов фага Т4 по гену 36.....	87
III.11 Тестирование ингибирующего действия ПЭГ на адсорбцию фага Т4 и его мутантов	88
III.12. Дифференциальная сканирующая калориметрия	88
III.13 Солюбилизация тел включения и рефолдинг белка in vitro.	89
III.14 Выделение и очистка некультивируемого вирусного сообщества фекалий.	89
IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	91
IV.1 Установление роли С-концевого домена фибритина фага Т4 в инициации фолдинга данного белка	91
IV.1.1. Исходные предпосылки и методический подход	91
IV.1.2 Неспособность последовательности coiled coil участка фибритина инициировать тримеризацию и фолдинг.	93

IV.1.3 Доказательство способности С-концевого домена к независимой тримеризации	95
IV.1.4 Поиск мутаций, стабилизирующих мономерный интермедиат фолдинга	100
IV.1.5 Реконструкция пути фолдинга фибритина фага T4	106
IV.2. Исследование эволюционной пластичности генов фибритина у бактериофагов, родственных T-четным	107
IV.2.1. Определение последовательностей генов фибритина у псевдо-T-чётных и шизо-T-чётных бактериофагов	108
IV.2.1. Особенности эволюции генов фибритина.	109
IV.2.2 Экспрессия и физико-химическая характеристика гомологов фибритина фага T4	120
IV.2.3 Пластичность генов дистальной части ДХФ - потенциальной мишени связывания пг was	130
IV.2.4 Генетический анализ взаимодействия фибритин – ДХФ	132
IV.2.5 Анализ эволюционной пластичности фибритина в контексте эволюции геномов бактериофагов, родственных T-чётным	135
IV.3 Исследование экологии и микроэволюции колифагов в природном микробном сообществе	139
IV.3.1. Выбор модельного микробного сообщества	139
IV.3.1. Анализ морфологического разнообразия вирусоподобных частиц в фекалиях лошадей	141
IV.3.2. Анализ временной динамики популяций колифагов в фекалиях лошадей культуральными методами	147
IV.3.3. Разработка метода высокоразрешающей дифференциации штаммов колиформных бактерий и анализ внутривидовой гетерогенности их популяций у лошадей	149
IV.3.4 Оценка уровней внутривидового разнообразия колиформных бактерий в индивидуальных микробиомах лошадей	158

IV.3.5 Исследование разнообразия колифагов в индивидуальных микробиомах лошадей	159
IV.4 Исследование полиморфизмов генов адсорбционного аппарата у экологически связанных изолятов колифагов.....	167
IV.4.1 Модульные перестановки генного уровня в адсорбционном аппарате изолятов N4-подобных бактериофагов	169
IV.4.2 Модульные перестановки субгенного уровня в адсорбционном аппарате изолятов T5-подобных бактериофагов.	174
IV.5. Заключение	179
V. ВЫВОДЫ	182
VI ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	184
VII СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	187

I. ВВЕДЕНИЕ

I.1 Актуальность темы

В результате работ последних десятилетий (см. обзоры Weinbauer, 2004, Abedon 2009, Clokie 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, Jia 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 считается признаком напряжённых конкурентных отношений между бактериофагами и их потенциальными хозяевами, стремящимися избавиться от давления фаговой инфекции (Red Queen dynamics; Weitz et al, 2005).

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 большую практическую значимость в связи с тем, что они являются перспективным средством антибактериальной терапии, на которое возлагаются большие надежды в связи с

растущей антибиотикорезистентностью патогенных микроорганизмов (Abedon and Thomas-Abedon 2010, 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. 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,). 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 адсорбционного аппарата.

I.2 Цель и задачи работы

Цель работы: исследовать процессы микроэволюции белков адсорбционного аппарата бактериофагов 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-чётным.
- 2) Установить функциональное значение варибельного С-концевого домена для фолдинга молекулы фибритина, уточнить функцию фибритина в работе молекулярного сенсора вирионов Т-чётных фагов, установить 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-чётных 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 (полученных из одного источника) изолятов.

I.3 Новизна исследования

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 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 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.

I.4 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 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.

I.5 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-чётным, 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-чѐтным включают консервативную кор-область, гены которой эволюционируют преимущественно дивергентным путѐм, 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, причѐм 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.

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

II.1 Бактериофаги и их разнообразие.

История изучения вирусов прокариот, открытых в 1915 г. Ф. Туортом (Twort 1915) и в 1917 Ф. д'Эрелем (d'Herelle 1917, см также d'Herelle 1921) насчитывает уже почти 100 лет. К настоящему времени охарактеризовано 5 500 изолятов различных фагов и вирусов архей (Ackermann, 2007, 2012), а также опубликовано значительно число работ, посвящённых исследованию разнообразия некультивируемых вирусов бактерий в природных и техногенных сообществах с помощью методов метагеномики (Abedon 2009), а также иных технологий (см. ниже, разд II.3 – II.4).

Несколько десятков из тысяч выделенных в течение столетия фагов стали модельными объектами молекулярной биологии и вирусологии, детальное изучение которых заложило основы наших представлений о структуре этих вирусов, их биологии, включая основные механизмы взаимодействия с хозяевами (см. обзор Summers 2005).

II.1. 1 Классификация бактериофагов

Разработка естественной классификации бактериофагов встречается с рядом существенных проблем, обусловленных сложностью установления филогенетических взаимоотношений этих объектов, особенно с учётом исключительного вклада процессов обмена генетическими модулями в их эволюцию. Детальный анализ проблем систематики фагов приведён в работе (Ackermann, 2005).

В 1966 году при Международном Комитете по Номенклатуре Вирусов (International Committee for Nomenclature of Viruses - ICNV), был создан подкомитет Вирусов Бактерий. ICNV стал Международным Комитетом по Таксономии Вирусов в 1973 году (Matthews, 1983). Встречи ICTV проводились на каждом Международном конгрессе по вирусологии. Комитет выпустил несколько докладов, содержащих новые решения по классификации вирусов.

По мере описания новых вирусов прокариот при необходимости вводили новые рода и семейства бактериофагов. Таксономический статус родов, принятых во время встречи в Мехико, был повышен до семейств, в дальнейшем Комитетом были добавлены еще семь новых семейств фагов (Ackermann 2005). Заметным шагом

вперед было принятие многофакторного понятия вида, означавшего, что вид определяется набором свойств, некоторые из которых могут и отсутствовать в отдельном представителе таксона (Van Regenmortel, 2000). Наконец, в 1998 году, во время Конгресса по вирусологии в Сиднее (Австралия), хвостатые фаги получили ранг отдельного порядка и название Caudovirales (Ackermann, 1999), кроме того, были утверждены 15 родов хвостатых фагов (Ackermann, 1999; Ackermann, 2005). Хотя в таксономии вирусов основное значение имеют тип геномной нуклеиновой кислоты, структура вирусной частицы и сходство нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, другие признаки также могут быть использованы для классификации. Система ICTV не является ни иерархической, ни филогенетической, поэтому таксономические структуры выше уровня семейства (отряды и типы) еще не определены для большинства вирусов (Van Regenmortel et al., 2000, Ackerman 2005). Прикладная таксономия ICTV предназначена главным образом для объединения вирусов в низшие таксоны (то есть, отряды, семейства и роды). Названия отрядов, семейств и родов в основном отражают характерные свойства входящих в таксон вирусов и обычно получают из латинских или греческих корней в сочетании с окончанием -virales, -viridae, и -virus, соответственно. У большинства родов полиэдрических, нитчатых, и плеоморфных фагов есть латинизированные названия (Ackermann, 2005).

В настоящее время выделяют 10 семейств фагов зубактерий (число семейств вирусов архей быстро растёт и точно установить его сложно) однако 7 семейств, не относящихся к порядку Caudovirales (Tectiviridae, Corcticoviridae, Plasmaviridae, Inoviridae, Microviridae, Leviviridae и Cystoviridae) в сумме составляют около 5% известных изолятов бактериофагов (Ackermann, 1999), и их роль в экологии большинства природных сообществ, по-видимому, незначительна. В дальнейшем, в пределах данной работы, мы будем понимать под термином “бактериофаг” вирус, относящийся к хвостатым фагам, то есть к порядку Caudovirales, если иное не указано специально. Вирусы архей в диссертации не обсуждаются.

II. 1.2 Разнообразие жизненных циклов бактериофагов.

В целом вирусам прокариот свойственно широкое разнообразие вариантов жизненных циклов (Weinbauer, 2004, Guttman et al. 2005), которые кратко охарактеризованы в Табл. 1.

Табл. 1. Типы жизненных циклов бактериофагов

Тип жизненного цикла	Краткое описание	Каким группам фагов свойственен
Литический цикл	При инфекции в клетку-хозяина попадает НК вируса, или, в случае днРНК фагов - нуклеокапсид. Потомство вируса формируется внутриклеточно и высвобождается путём лизиса клетки, опосредуемого вирусными белками. Фаги, способные к размножению только в литическом цикле, называют вирулентными .	Caudovirales, а также сем. Tectiviridae, Corcticoviridae, Microviridae, Leviviridae и Cystoviridae
Лизогенный цикл	После инфекции в части клеток (для хвостатых фагов 10^{-7} - 10^{-1}) вместо размножения фага происходит установление состояния профага, при котором вирусный геном не экспрессируется, а реплицируется вместе с клеткой - хозяином либо интегрируясь в ее хромосому, либо, реже, в виде экстрахромосомного элемента. Фаги, способные к установлению состояния профага, называют умеренными . Клетки, несущие профаг, называют лизогенными . При т.н. индукции профага происходит активация экспрессии вируса и его размножение по литическому пути или по типу хронической инфекции. В большинстве случаев умеренные фаги могут также размножаться в литическом цикле без лизогенизации хозяина.	Все семейства днДНК и онДНК содержащих фагов.

Тип жизненного цикла	Краткое описание	Каким группам фагов свойственен
Хроническая инфекция	В инфицированной клетке происходит репликация НК вируса, но окончательное формирование вирионов происходит в момент их выхода из клетки, который не сопровождается лизисом. Во многих случаях заражённые клетки продолжают делиться, хоть и с пониженной скоростью, продуцируя вирусные частицы	Inoviridae Plasmaviridae
Псевдолизогения	<p>Термин имеет множество значений в современной литературе:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Гипотетический вариант развития инфекции хвостатых фагов, при котором клетка, инфицированная фагом, продолжает делиться, одновременно с репликацией вируса, при этом часть потомства лизируется, высвобождая фаг - То же, но при задержке репликации вируса. В этом случае часть потомства клетки (в отличие от лизогении) оказывается незараженным. - Вариант развития смешанной культуры хозяина и вирулентного фага, при котором, по тем или иным причинам, часть клеток физически или физиологически защищены от инфекции и делятся, в то время как другая часть инфицируется фагом. Псевдолизогенные культуры могут иногда оставаться стабильными в течение множества пассажей. 	Caudovirales, а также возможно и другим семействам фагов, способных реплицироваться в литическом цикле.

II.2 Основные механизмы эволюции бактериофагов

Современные представления о механизмах эволюции бактериофагов рассмотрены в ряде недавних обзоров (Brussow and Kutter 2005a, Petrov et al. 2010, Abedon 2009).

Существующие гипотезы о структуре родственных взаимоотношений между бактериофагами, основанные на данных сравнительной геномики, в основном

сводятся к двум точкам зрения. Первая основана на фразе «All world's phage» (Hendrix, 2002) – то есть, вся геномная ДНК хвостатых фагов представляет собой огромного общий генетический пул, и отдельные геномы современных вирусов являются мозаичным сочетанием фрагментов различного происхождения (Hendrix et al., 1999). Согласно этой модели, горизонтальный дрейф генов полностью доминирует над вертикальной эволюцией, маскируя ее, что делает невозможным построение единого филогенетического древа бактериофагов (Lawrence et al., 2002). В соответствии с этой концепцией, филогения фагов может быть представлена лишь в виде ретикулярных моделей, отражающих процессы дрейфа генетических модулей. Эта идея является существенно улучшенной версией классической теории модульной эволюции, предложенной более 30 лет тому назад Botstein et al (1980) в результате исследования методами электронной микроскопии гетеродуплексов геномной ДНК ряда родственных бактериофагов и генетического анализа лямбдоидных колифагов (Botstein, 1980; Casjens et al., 1992). По-видимому, эта концепция в значительной мере близка к реальности в случае умеренных фагов широкого спектра хозяев (Brussow and Kutter 2005a). Действительно, наблюдаемые родственные связи между фагами грамположительных и грамотрицательных бактерий могут быть объяснены с помощью горизонтального переноса генов, имевшего место в отдаленном прошлом. В рамках теории модульной эволюции предполагается, что в геномах большинства фагов функционально связанные гены и соответствующие сигнальные последовательности, управляющие их экспрессией, часто локализованы вместе, составляя генетические модули, которые могут быть переданы в другое генетическое окружение с сохранением функции (Летаров 1998, Brussow and Kutter 2005a). Генетические модули могут иметь различные размеры, от больших групп генов, кодирующих, например, морфогенез головок или хвостов у некоторых лямбдоидных фагов, до отдельных генов (часто снабженных собственными промоторами и терминаторами; так называемых “моронов” (Hendrix et al. 2000), а также отдельных белковых доменов (см. Sandmejer et al. 1996)

Вторая точка зрения основана на предположении, что, несмотря на значительный горизонтальный дрейф, вертикальная дивергентная эволюция играет ключевую роль в формировании геномов многих групп фагов. Это дает возможность выполнить достаточно глубокие филогенетические реконструкции и интерпретировать ряд

современных особенностей различных бактериофагов. Так, хотя между геномами крупных вирулентных фагов, относящихся к разным родам, обнаружено относительно мало сходства, одной филогенетической группы (рода или близких родов) обладают набором гомологичных генов и сходством генетических карт (Brussow and Kutter, 2005, Abedon 2009). Например фаги, относящиеся к широко распространенной и очень многочисленной группе Т4-подобных фагов, несомненно, родственны, точно так же как и Т7-подобные фаги, что подтверждается сравнением их полных геномов и отдельных генов (Tetart et al, 2001, Comeau et al, 2008, Krich et al., 2008). Несомненная вертикальная передача большинства генов этих двух различных и сложных молекулярных машин позволяет использовать эти группы бактериофагов в качестве модельных объектов для исследования филогенетических взаимоотношений и эволюционных процессов у вирулентных фагов.

Две описанные выше точки зрения в основном отражают различный баланс между горизонтальным и вертикальным элементами эволюции геномов бактериофагов, который, по-видимому, существенно отличается между умеренными фагами и «профессиональными» вирулентными фагами (Brussow and Kutter 2005a). Однако, у дистантно – родственных крупных вирулентных фагов, принадлежащих к одному роду, сходство капсидных и репликативных белков составляет около 30% идентичных аминокислотных остатков. При этом общее число сходных генов также уменьшается, так что геномы этих вирусов кажутся все более мозаичными. Например, сравнивая геномы колифага Т4 и вибриофага KVP40 или колифага RB49, нельзя найти сходства в их ранних генах или генах промежуточной группы транскрипции. Многие из этих «несущественных» генов, которые могут быть экспериментально инактивированы без видимого уменьшения приспособленности фага в лабораторных условиях, являются общими для близкородственных вирусов и, вероятно, играют важную роль в формировании быстрой адаптации к новым экологическим нишам и быстро изменяющимся физиологическим условиям. Таким образом, необходимо учитывать, что вертикальные эволюционные связи обычно прослеживаются не для всех последовательностей фагового генома (который на самом деле является мозаикой из сегментов ДНК с различной эволюционной историей). Такие связи являются более очевидными для некоторого «ядра» генома («core genome») каждой группы (рода) бактериофагов (Abrescia et al. 2010, Brussow and Kutter 2005a).

Баланс между горизонтальным и вертикальным наследованием проявляется по-разному у умеренных и вирулентных групп фагов (Krupovic et al 2011). Умеренные фаги имеют, очевидно, больше возможностей для обмена генами путем рекомбинаций между профагами и другими инфицирующими фагами, а также хозяйскими генами, в том числе и при перемещении в новых хозяев в результате конъюгации или трансдукции. Вирулентные фаги могут рекомбинировать только в процессе литической инфекции, в цитоплазме бактерии, с такими мишенями, как геном другого фага, инфицирующего ту же клетку, гомологичные последовательности ДНК в резидентных профагах внутри хромосомы хозяина или гомологичные последовательности ДНК хромосомы или плазмид. В силу очень древнего происхождения и дивергенции основных групп фагов (Hendix et al. 2003) накопление точечных мутаций может полностью размыть сходство нуклеотидных последовательностей между белками достаточно отдалённо родственными вирусом (исключая случаи когда между отдалёнными вирусами относительно недавно произошёл горизонтальный перенос генов). Однако сходство последовательностей белков или карт расположения генов часто легко выявляется при сравнении геномов сильно дивергировавших фагов даже если нет явного сходства нуклеотидных последовательностей ДНК. Отметим, что из-за вырожденности генетического кода, особенно в третьей позиции кодона, сходство последовательности аминокислот прослеживается значительно дольше, чем его можно заметить при сравнении последовательностей ДНК. Для более удалённых друг от друга фагов дополнительная информация об их родстве может быть получена из данных структурных исследований отдельных белков. Тем не менее, даже при использовании современных методов сравнения последовательностей белков, большинство продуктов генов фага T4 не обнаруживает достоверной гомологии с генами других фагов, не принадлежащих к группе T4-подобных (Miller et al., 2003). Большие эукариотические вирусы, как, например, бакуло-, иридо-, фикоидно-, покс- и герпесвирусы, обладают при этом некоторыми белками, несомненно родственными белкам фагов, наряду с уникальными для каждого семейства белками и особенностями организации геномов. Патрик Фортер предположил (Brussow and Kutter 2005a), что некоторые из этих древних вирусных белков могут отражать большой исходный генофонд вирусов, паразитировавших на последнем общем предшественнике клеточных организмов (LUCA – last unknown common ancestor). По его мнению наличие нескольких семейств

ДНК-полимераз и даже использование ДНК как генетического материала вместо РНК, могло быть впервые достигнуто у неких ранних вирусов и только позже было адаптировано к нуждам клеточного хозяина. Действительно, имеются данные, свидетельствующие в пользу того, что белки, ответственные за репликацию ДНК, возникали независимо друг от друга несколько раз (Leipe et al., 1999). С развитием современных методов структурной биологии глубинные взаимосвязи между вирусами, инфицирующими хозяев, принадлежащих различным доменам жизни, становятся все более очевидными (Krupovich and Bamford 2011)

II.3 Экология бактериофагов - общие принципы

Несмотря на то, что многие из пионерских работ Феликса д'Эреля, одного из открывателей (наравне с Фредериком Туортом) бактериофагов и первого исследователя этой группы вирусов, носили явно экологический характер (Brussow and Kutter 2005b, см. также d'Herelle 1921), по ряду исторических причин (никаких принципиальных технических препятствий этому не существовало) исследования экологического значения фагов в наземных и водных экосистемах не были широко развернуты вплоть до 90-х годов 20 века.

В результате ряда пионерских исследований конца 80-х -90х годов было установлено, что бактериофаги численно преобладают над бактериями в водных, а также в некоторых наземных экосистемах, вносят значительный вклад в смертность бактериальных клеток и являются в целом крайне существенным экологическим фактором в большинстве природных микробных сообществ (см. обзоры Weinbauer 2004, Brussow and Kutter 2005b, Abedon 2009, Thurber 2009, Clokie et al. 2011).

II.3.1 Основные принципы экологии бактериофагов в природных микробных сообществах.

В 1989 году Bergh et al. (1989) опубликовали в журнале Nature короткую статью об обнаружении более 10^7 фагоподобных частиц в миллилитре морской воды, отобранной в прибрежных районах и в открытом океане, и даже в 20 раз более высоких концентраций в образцах воды субальпийских озер. Две независимые статьи, опубликованные в Nature в следующем году, подтвердили эти открытия и представили экспериментальные доказательства того, что эти вирусы ограничивают продуктивность цианобактерий, основных первичных продуцентов органического

вещества в океане (Suttle, 1990; Fuhrman et al. 2003). В морских отложениях были обнаружены даже более высокие концентрации фагов, чем в водном массиве над ними. Danovaro и Serresi (2000) обнаружили до 10^9 фаговых частиц на мл в морских отложениях (см также Breitbart et al 2012 и ссылки в этой работе). В наземных экосистемах гораздо труднее получить данные, поддающиеся однозначной интерпретации; данные электронной микроскопии позволяют предположить, что концентрация вирусов на грамм в почве (Ashelford et al., 2003) составляет порядка 10^7 . В целом, становится общепризнанным утверждение, что бактериофаги являются самой многочисленной формой жизни на земле; общая численность их, согласно приблизительным расчетам, составляет от 10^{30} до 10^{32} (Weinbauer 2004, Brussow and Kutter 2005b, Breitbart 2012) Большая часть количественных данных получена для морских местообитаний, где интенсивное перемешивание делает возможным отбор проб с хорошей репрезентативностью. Однако же многие принципы и гипотезы, похоже, применимы и к другим средам. В частности, большое количество различных фагов было обнаружено в экстремальных средах обитания.

Оказалось возможным оценить средний урожай фагов на одну инфицированную клетку *in situ* (Borsheim, 1993), что позволило разработать модель для приблизительного расчёта скорости размножения вирусов в данной среде обитания и уровне вирус-зависимой смертности бактериального планктона; такие расчеты не были ранее возможны для естественных условий. Численность фагового потомства в природе в большинстве случаев меньше, чем в эксперименте единичного цикла роста в лабораторных условиях, что, вероятно, отражает меньшие размеры бактерий в естественных условиях обитания (Robertson and Button, 1989; Weinbauer and Peduzzi, 1994, Brussow and Kutter 2005b, Weinbauer 2004). Определение численности фагового потомства *in situ* производилось путем подсчета видимых вирусных частиц в зараженных бактериальных клетках с помощью электронного микроскопа (Brussow and Kutter 2005b; Weinbauer et al., 2004 и ссылки в этих работах). В качестве альтернативы производился подсчет соотношения продукции вирусных частиц *in situ* к скорости их распада (Suttle and Chan, 1994). Предполагая, что концентрация фага остается относительно стабильной в течение некоторого (короткого) отрезка времени, можно сделать вывод, что уровни продукции и распада фагов должны быть равны. Методы количественной оценки скорости распада вирусных частиц весьма важны и для других областей экологии микроорганизмов и вирусов, так, они характеризуют

устойчивость вируса к воздействию внешней среды в конкретной экосистеме, требуются для оценки загрязнения воды вирусами, поиска источника загрязнения, борьбы персистенцией фага в промышленных установках и т.д..

II.3.1.1. Взаимодействия бактериальных и фаговых популяций в природных микробных сообществах

Как обсуждается в работе (Brussow and Kutter 2005b) литический жизненный цикл фага имеет как минимум 4 ключевых этапа, которые крайне важны с точки зрения экологии:

1. Внеклеточный поиск хозяина, который ограничен уровнем диффузии и поэтому зависит от концентрации хозяев;

2. Адсорбция фага, которая включает обратимое связывание фага, необратимое присоединение и перенос вирусного генома в клетку-хозяина. Этот процесс обычно происходит очень быстро вслед за столкновением фаговой частицы с чувствительной к фагу бактерией;

3. Стадия внутриклеточного развития фага, во время которой физиология хозяина подвергается реструктуризации, фаговый геном реплицируется и собираются новые фаговые частицы;

4. Лизис клетки и освобождение фагового потомства

Для умеренных фагов должен быть учтен период лизогении, во время которого фаг интегрирован в геном хозяина и реплицируется вместе с ним или синхронно, как плазида, а гены, ответственные за литический рост, не экспрессируются вплоть до индукции бактериофага

Стадии от момента адсорбции до лизиса клетки-хозяина обычно проходят достаточно быстро. Таким образом, большую часть времени фаг находится в одном из следующих состояний:

1. Свободная вирусная частица во время “поиска” клетки хозяина;

2. Секвестрирован в некотором пространстве, где нет потенциального хозяина, например, связан с относительно инертной частицей;

3. Активно инфицирует бактерию, что ведет к лизису последней либо к секреции фаговых частиц (в случае нитчатых и некоторых иных фагов);

4. Существует в виде профага (очевидно, это состояние возможно только у умеренных фагов).

5. Существует в виде стабильного инфекционного центра, представляющего собой зараженную клетку, в которой развитие инфекции задерживается по каким-то физиологическим причинам (например, в случае инфекции рядом фагов клеток, находящихся в стационарной фазе или при упаковке фагового генома в спору сопрообразующего хозяина).

В первых двух состояниях фаг может быть инактивирован путем повреждения капсида или генома, но иногда способен и оставаться активным в течение многих лет, в зависимости от условий окружающей среды. Фаза литической инфекции обычно длится от нескольких минут до одного дня, хотя существуют условия, которые называют гибернацией, при которых фаговый геном остается внутри голодающей клетки без нанесения ей сильного ущерба вплоть до поступления питательных веществ, позволяющих клетке возобновить активный рост. Для вирулентных фагов типа T4 это сильно отличается от лизогении, хотя в данном случае позднее фаговый геном берет верх и единственный возможный исход – это гибель клетки, сопровождаемая выходом фагового потомства, если питательные вещества становятся доступными, как обсуждается в разделе 2.4; колоний лизогенных бактерий из таких клеток не формируется.

Наше понимание процесса фаговой инфекции сформировано в основном на основании лабораторных экспериментов, в которых исследователь смешивает один штамм фага с одним бактериальным штаммом в концентрации примерно 10^8 клеток на миллилитр. В природных экосистемах, как, например, в прибрежных водах, бактериальный планктон обычно достигает концентрации в 10^6 клеток/мл и популяция обычно состоит из 100 различных видов бактерий, что означает понижение концентрации в среднем до 10^4 клеток/мл для каждого хозяина по отдельности (Murray and Jackson, 1992). Очевидно, что этого уровня достаточно для размножения фага, покрывающего его убыль в естественных условиях. Но все же репликация фага крайне чувствительна к эффективной концентрации клеток. Лабораторные эксперименты с T4, фагами *Bacillus* и *Staphylococcus*, показали, что размножения фагов не происходит до тех пор, пока концентрация хозяев не достигнет 10^4 клеток/мл (Wiggins and Alexander, 1985). Подробнее вопрос о механизме возникновения пороговых концентраций. В реальных природных экосистемах (в том числе, и в

организме животного) пороговое значение концентрации хозяев, необходимое для роста фага (MT) можно определить как такое, при котором за время полувыведения фага $t_{1/2}$ минус длительность латентного периода t_{lat} , будет адсорбироваться количество фага, обеспечивающее продукцию потомства, равного половине исходной популяции то есть такое значение концентрации клеток C , при котором $P_{(t_{1/2}-t_{lat})} = 0,5P_0/Y$, где Y – урожай фага на одну инфицированную клетку в данных условиях (с учётом гибели части инфицированных клеток до освобождения потомства фагов). При превышении этого порогового уровня $C > MT$ скорость продукции фага будет превышать скорость его вывода и разрушения, следовательно количество его в системе будет увеличиваться (Летаров с соавт, 2010).

Существует также пороговое значение концентрации фага C_{phage} , при которой происходит подавление роста бактериальной популяции (Cairns et al. 2009). При этом значении C_{phage} (ИТ) половина бактерий окажется инфицирована за время, равное среднему времени генерации (при условии, что в течение этого периода времени концентрация фага остаётся неизменной). Для быстро растущих бактериальных культур в лаборатории подавление роста происходит при концентрации фага около 10^7 (Cairns et al. 2009, Kasman et al. 2002) БОЕ \times мл $^{-1}$. Эта величина не имеет особенного значения в лабораторной практике так как *in vitro* $C \gg MT$, а скорость разрушения фаговых частиц пренебрежимо мала, поэтому вирусы быстро накапливаются, вызывая практически полный лизис культуры.

Зависимость скорости роста фага от плотности популяции хозяина, особенно при низких значениях последней, приводит к тому, что наиболее успешные (в плане пролиферации) популяции микроорганизмов в большей степени подвергаются давлению фаговой инфекции, по сравнению с минорными. Этот экологический механизм получил название “Kill the winner” (см. Weinbauer 2004 и ссылки в этой работе). Следует понимать, что гипотеза “Kill the winner” не требует обязательного резкого коллапса лидирующих популяций под влиянием фаговой инфекции. В реальности такое событие может произойти лишь в случае, если происходит очень значительное накопление (разрастание) одного вида или штамма, как, например, при цианобактериальном цветении воды. В более обычных ситуациях увеличение вклада фагов в смертность лидирующей популяции с одной стороны ограничивает ее дальнейшую пролиферацию (без обязательного резкого снижения актуальной численности) и в то же время перераспределяет органическое вещество, стимулируя

рост минорных компонентов экосистемы (последнее имеет большую важность для водных экосистем).

В результате в водных системах вирус-индуцированный лизис части биомассы является важным источником растворимого органического вещества (Рис 1) и существенно стимулирует метаболическую активность и увеличивает биологическое разнообразие прокариот (Weinbauer 2004, Breitbart 2012).

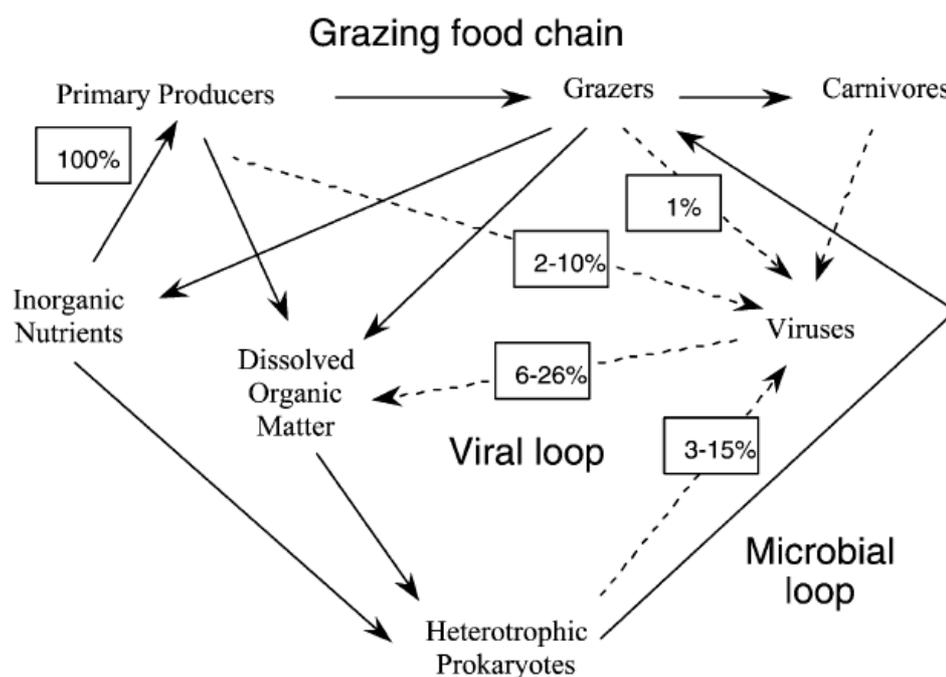


Рис. 1. Модель вирус-индуцированных потоков органического углерода в пищевой цепи пелагической водной экосистемы (из работы Weinbauer 2004). Пунктиром показаны вирус-индуцированные потоки углерода. Цифры даны только для этих потоков, причём за 100% принята общая первичная продукция органического вещества в системе. Таким образом, от 6 до 26% первичной продукции поступает в пул растворенного органического вещества благодаря вирусному лизису различных микроорганизмов.

Подобные теоретические выкладки, связанные с репродукцией вирулентных фагов при низкой концентрации хозяев, приводят к гипотезе, что в океане умеренные фаги должны превзойти численностью вирулентных, поскольку продуктивность умеренных фагов не зависит от концентрации хозяйских организмов. Было выдвинуто предположение, что лизогения становится предпочтительной стратегией, когда концентрация клеток падает ниже уровня, необходимого для поддержания концентрации фагов благодаря размножению в литическом цикле (Stewart and Levin, 1984). Очевидно, что в случаях, где адсорбция фагов подавляется какими либо

факторами (см. ниже), хотя номинальная численность хозяев достаточно высока, можно сделать сходное предположение. По-видимому, подобная ситуация имеет место в кишечных микробных сообществах ряда млекопитающих (подробнее эта проблема рассматривается в разделе II.4).

Лизогенные популяции бактерий также имеют преимущество в конкуренции с нелизогенными представителями того же вида благодаря лизогенной конверсии полезными генами, кодируемыми многими умеренными фагами. Некоторые из них являются относительно универсальными, такие как факторы иммунитета и факторы исключения суперинфекции. Также некоторые профаги несут гены, делающие лизогенных представителей хозяев конкурентоспособными в особых экологических ситуациях, например, белки устойчивости к сыворотке как *pg* *bor* фага λ . У лизогенных штаммов патогенных бактерий многие факторы вирулентности кодируются профагами. Даже лабораторные штаммы фагов, такие как P1, P2, λ и Mu приводят к повышению метаболической активности лизогенов и более быстрому и долгому росту по сравнению с нелизогенными культурами (Edlin et al., 1975; Lin et al., 1977).

И действительно, два исследования морских микробных сообществ обнаружили до 40% клеток, откликающихся на индукцию митомицином C; похожее частота лизогенных штаммов была обнаружена среди изолятов *Pseudomonas*, полученных из озер (Brussow and Kutter 2005b и ссылки в этой работе). Имеется тенденция к превалированию лизогенных популяций в олиготрофных условиях (Jiang and Paul 1994; 1997). Такое наблюдение соответствует теории о том, что лизогения доминирует при низкой концентрации медленно растущих организмов. С другой стороны, имеются данные, противоречащие этому предположению. Работы с водой из эстуариев показали сезонное развитие лизогенов с максимальной численностью в летнее время, когда превалируют эвтрофные условия, и минимальной численностью в зимние месяцы, когда клетки находятся в состоянии минимальной жизнедеятельности (Cochran and Paul, 1998). Существуют и другие факты, противоречащие предположению о преобладании лизогенного цикла в условиях олиготрофных экосистем. Во-первых, самопроизвольная индукция профагов обычно низка (от 10^{-2} до 10^{-5} на клетку за одно поколение) (Stewart and Levin, 1984). Поэтому за счет этого процесса можно объяснить не более 1% общей концентрации фагов в океане (Jiang, 1997). Во-вторых, обширные исследования фагов в Северном море показали, что

только 10% всех фаговых изолятов являются умеренными (Moebus, 1983).

Подводя итог, отметим, что при высокой распространенности и активности вирулентных фагов в природных экосистемах численность любой конкретной пары фаг – хозяин постоянно колеблется в любых естественных условиях. Таким образом, выраженная временная динамика определенных популяций фагов и их хозяев может служить признаком активности литического цикла в данных экологических условиях. Наиболее быстро фаги размножаются в многочисленных и быстрорастущих в данных условиях и в данное время популяциях бактерий, предотвращая чрезмерный расцвет какого-либо одного вида бактерий – эффект, известный как “kill the winner” механизм (Weinbauer 2004 и ссылки в этой работе).

II. 3.1.2. Козволюция фагов и их хозяев - динамика Черной королевы

Еще ранние эксперименты с *E. coli* и соответствующими фагами показали, что под воздействием фаговой инфекции легко отбираются фагоустойчивые бактериальные штаммы. Поэтому сосуществование в среде фагов и чувствительных к ним бактерий было несколько неожиданным. В ходе дальнейших исследований продемонстрировано, что во многих экологических системах может происходить коэволюция фагов и их хозяев, в ходе которой бактерии и их фаги вовлечены в непрерывный цикл развития и преодоления устойчивости к инфекционным агентам путем мутационной изменчивости. Взаимоотношения такого типа принято называть бесконечным арм-реслингом или динамикой Черной королевы (Red Queen dynamics) (Weitz et al. 2005). Теоретически это соревнование асимметрично, поскольку мутации, инактивирующие рецепторы бактерии, происходят проще, чем мутации белков адсорбции фага, обеспечивающие новую специфичность (Lenski and Levin 1985). Однако устойчивость, возникающая благодаря случайным мутациям имеет в большинстве физиологическую цену, выражающуюся в уменьшении скорости роста или иной приспособленности хозяина по сравнению с исходным фагочувствительным вариантом (Bohannan and Lenski 2000). Поэтому при снижении давления фаговой инфекции исходные фагочувствительные формы получают селективное преимущество. Кроме того, в природных условиях типов фагов часто гораздо больше, чем бактерий, поэтому фаги в состоянии компенсировать различие в скорости адаптации. Развитие фагоустойчивой цианобактерии было продемонстрировано и в полевых условиях (Waterbury and Vaoloi

1993). Во многих работах термины «чувствительный» и «устойчивый» используются как абсолютные понятия. В природе же можно увидеть массу случаев, когда данный фаг инфицирует данную бактерию, но с низкой эффективностью; это также может привести к совместному выживанию фага и бактерии. Например, в тестировании около 100 фагов на различных хозяевах было идентифицировано 10, которые инфицировали *E. coli* O157; однако для большей их части эффективность инфекции составляла только 10^{-4} (Kutter личное сообщение, наши неопубликованные данные). Только RB69 эффективно размножился как на O157, так и на B или K12. Помимо уменьшенной эффективности посева (которая часто преодолевается уже во втором пассаже) часто наблюдается отбор штаммов, на которых адсорбция данного фага происходит значительно медленнее, что приводит к возрастанию пороговой численности хозяев, необходимой для эффективного размножения вируса.

II. 3.1.3. Роль физиологического состояния хозяина

Во многих природных экосистемах нормальное состояние бактерий соответствует по степени обеспеченности субстратами состоянию бактерии в лабораторной культуре, находящейся в стационарной фазе (Kolter et al., 1993). При переходе в стационарную фазу, которая способствует долгому выживанию в неблагоприятной среде, бактерии претерпевают ряд физиологических изменений (Navarro et al, 2010), которые опосредованы новым сигма-фактором σ^S (RpoS в случае *E. coli*), который контролирует как минимум 30 генов, экспрессирующихся во время голода и при переходе в стационарную фазу (Battesti 2011). RpoS-мутанты гораздо хуже выживают в смоделированных в лаборатории условиях углеродного или азотного голодания и не могут выработать защиты против осмотического, окислительного или теплового шока. В лабораторных условиях большинство фагов не могут продуктивно инфицировать бактерий, находящихся в стационарной фазе. Эта модель, однако противоречит данным о значительной концентрации фагов наблюдаемой в океанической воде. Это что иллюстрирует, что наши знания часто недостаточны для успешного перенесения результатов лабораторных экспериментов на процессы, идущие в естественных экосистемах.

Необходимо учитывать также, что наши представления о физиологии фаговой инфекции основаны на изучении лишь ограниченного числа модельных систем «фаг –

хозяин». Woods (1976) обнаружил, что некоторые фаги *Pseudomonas* способны инфицировать голодающие клетки, содержащиеся в течение 40 дней в естественных речных условиях. При этом латентный период удлинен и выход фага значительно уменьшен по сравнению с ростом на культуре, находящейся в логарифмической фазе роста. Schrader с коллегами (1997) показали, что колифаг T7 и три фага *Pseudomonas*, могли реплицироваться в голодающих в клетках, которые вошли в стационарную фазу. Фаг ACQ мог даже инфицировать *P. aeruginosa*, находившуюся в состоянии голодания в течение 5 лет; латентный период при этом в несколько раз удлиняется, а численность потомства падает вне зависимости, было ли голодание коротким или долгим. Для T7 латентный период также удлиняется в несколько раз, но интересно, что численность потомства увеличивается примерно от 50 до 450, если хозяин голодал в течение 24 часов. T4 не может давать потомство в клетках, находящихся в стационарной фазе. Однако, T4 способен такие клетки инфицировать и долго персистировать в них, причем пока в клетке присутствует сигма-фактор стационарной фазы, инфекционный процесс останавливается на ранней стадии. В то время как обычно T4 в течение минуты блокирует все процессы транскрипции и трансляции генов хозяина, в этих голодающих клетках он формирует стабильный «инфекционный центр» и входит в «спящий режим» (Kutter E. личное сообщение); когда поступают питательные вещества, спячка фага заканчивается и он блокирует весь дальнейший синтез белка хозяина и начинает синтез своего потомства. Этот феномен мог бы объяснить персистенцию многих вирулентных фагов в популяциях нерастущих клеток.

II. 3.1.4 Особенности экологии фагов в биоплёнках

Большинство исследований процесса фаговой инфекции проводится с бактериями в суспензионной жидкой культуре, хотя большинство бактерий в природных местообитаниях формируют сложные сообщества на границах раздела сред, например между твердой поверхностью и водной средой или жидкостью и воздухом. Эти сообщества принято называть биопленками (см. обзор Николаев и Плакунов 2007). Биопленки широко распространены повсюду: их можно обнаружить на камнях в реке, в трубах, на промышленном оборудовании и медицинских имплантатах, на стенках толстого кишечника, в виде зубного налета, в легких у больных муковисцидозом. Микроорганизмы претерпевают глубокие фенотипические

изменения во время перехода от свободно-плавающего планктонного состояния к прикрепленному росту в биопленках (O'Toole et al., 2000, Николаев и Плакунов, 2007). По причине физиологических изменений, их низкой скорости роста и того, что клетки погружены в обширный экзополисахаридный матрикс с гетерогенным пространственным распределением, они, как минимум, в 10 раз более устойчивы к антибиотикам и другим антимикробным воздействиям, чем клетки, пребывающие в состоянии планктона (Kaplan 2011, Bridier et al. 2011 и ссылки в этих работах).

Были выполнены исследования фаговой инфекции в мультивидовых биопленках, включающих бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter agglomerans* и *Staphylococcus aureus*. Дулиттл и коллеги (Doolittle et al., 1995; 1996) продемонстрировали литическую инфекцию *E. coli* в биопленке бактериофагом T4 и использовали флуоресцентные пробы для того, чтобы проследить за взаимодействиями фага внутри биопленки. Хьюджес с коллегами (Hughes et al, 1998), показали, что фаг *E. agglomerans* SF153b обладает полисахарид-деполимеразой, которая может разрушать биопленки путем деградации экзополисахарида (ЭПС) даже в том случае, если мутация фага блокирует инфицирование и лизис хозяина. Фермент, эндогликангидролаза, был частично очищен и охарактеризован. Было доказано, что он может работать самостоятельно и специфичен к ЭПС рода *Enterobacter*; он не воздействует на похожие биопленки, сформированные *Serratia*. Как продемонстрировали Hanlon et al. (2001), соответствующие фаги могут диффундировать через алгинатные гели и быть причиной двукратного уменьшения числа бактерий в 20-дневной биопленке *P. aeruginosa*, уменьшая вязкость до 40% несмотря на наличие ЭПС. В работе Silankorva et al. 2010 показана возможность эффективного подавления смешанной биопленки *P. aeruginosa* и *S. aureus* с помощью специально подобранных фаговых препаратов.

В то же время для многих систем фаг-хозяин характерно длительное стабильное сосуществование фагов и чувствительных бактерий в биопленках, в то время как в суспензионной культуре происходит быстрое вытеснение фагочувствительных клеток устойчивыми мутантами (Kau et al. 2011). Возможно, что стратегия адаптации фагов к жизни в условиях биопленок может кардинально отличаться от адаптаций к условиям суспензионных популяций с низкой плотностью хозяев. Так, Gallet et al. (2009) показали, что при росте в среде, затрудняющей диффузию и содержащей значительное количество клеток хозяина, для вируса выгоднее иметь сниженную скорость

адсорбции. Таким образом, потеря некоторых адгезинов может иметь прямое приспособительное значение в некоторых условиях.

Растет интерес к естественной роли бактериофагов в модуляции развития биопленок и, в особенности, к потенциальной возможности использования бактериофагов для контроля образования биопленок в различных условиях. Adams и Park (1956) первыми предложили использовать фаговые полисахарид-деполимеразы для разрушения матрикса биопленок.

В работе (Rice et al. 2009, см также ссылки в этой работе) показано, что в процессе развития биопленок *P. aeruginosa* важную роль играет индукция нитчатого профага, вызывающая гибель части клеток и способствующая формированию зрелой структуры биопленки, имеющей водные каналы. Высвобождение ДНК из лизированных клеток также способствует образованию плотного межклеточного матрикса биопленки.

II.4 Экология бактериофагов в симбиотических микробных сообществах человека и животных.

Хотя исследования бактериофагов как естественного компонента микрофлоры организма человека и животных были начаты еще д'Эрелем (d'Herrelle 1921) и несмотря на очевидную практическую значимость этой проблемы, данная область привлекала очень мало внимания исследователей до самого последнего времени. Лишь только в последние годы благодаря серии исследований (в основном выполненных методами метагеномики - см. ниже) стали формироваться современные концепции экологии бактериофагов в составе микрофлоры тела млекопитающих. Состояние наших знаний по данному вопросу детально проанализировано в наших недавних обзорах (Letarov and Kulikov 2009, Летаров с соавт. 2010), которые, по-видимому, явились первыми детальными обзорами литературы в этой области исследований. Эти работы послужили основой при написании этого раздела.

Тело человека или животного представляет собой сложный макрокосм, включающий несколько взаимосвязанных экологических систем, локализованных в различных органах и участках тела, которые заселены более или менее плотными сообществами микроорганизмов, включающих в том числе и бактериофаги.

Роль бактериофагов в микрофлоре тела человека и животных в последнее время

принято признавать «существенной», однако детальная информация по этому вопросу в большинстве случаев отсутствует. Присутствие бактериофагов в микрофлоре животных и человека впервые продемонстрировал первооткрыватель этих вирусов Феликс д'Эрель, обнаруживший фагов энтеробактерий в фекалиях нескольких видов животных и человека (d'Hérelle, 1921). Тем не менее, ни качественные ни тем более количественные описания и модели взаимоотношений популяций фагов и бактерий в симбиотических микробных системах пока не разработаны ни для одного вида животных. Понимание особенностей эколого – физиологических взаимоотношений в тройственной системе «бактерии - фаги – макроорганизм» должно служить теоретической основой для управления этой системой, в том числе и путём внесения экзогенных фаговых препаратов, предназначенных для элиминации нежелательных бактериальных популяций.

Целью этого раздела обзора является анализ современных представлений об экологии вирусов бактерий в симбиотических микробных системах человека и животных, а также краткое рассмотрение основных теоретических принципов, лежащих в основе терапевтического применения фаговых препаратов.

II.4.1. Количество и разнообразие бактериофагов в микрофлоре животных

Наиболее многочисленны работы, посвящённые исследованию бактериофагов в желудочно-кишечном тракте млекопитающих, включая толстый кишечник (и фекалии), а также микрофлору рубцов жвачных и преджелудков сумчатых животных (см. ниже). Напротив, присутствие свободных фаговых частиц не было до сих пор зафиксировано на коже каких – либо видов животных, а в дыхательных путях и в лёгких их присутствие связано, по-видимому, с пассивным попаданием из воздуха (Willner et al., 2009). Однако, в некоторых патологических состояниях, таких как муковисцидоз, в лёгочном отделяемом обнаруживали фаги к одновременно присутствующим бактериям, включая *Pseudomonas aeruginosa* (Brokhurst et al. 2005, Willner et al., 2009; Willner and Furlan, 2010).

По не вполне понятным причинам Hitch et al (2004) не удалось зафиксировать в частицы бактериофагов полости рта. В то же время прямыми микроскопическими методами большое количество фагоподобных частиц было обнаружено в зубном налёте (Brady et al., 1977), что позволило даже предположить, что они играют

существенную структурную роль в матриксе этой структуры (выражаясь современными терминами - биопленки). Присутствие фагов в слюне человека было также подтверждено методами метагеномики в недавних исследованиях (Al-Jarbou 2012, Willner et al. 2011, Pride et al 2011), но при этом вопрос об экологическом значении фаговой инфекции в этом экотопе остается открытым (подробнее см. обзор Letarov 2012, а также раздел 4.2.5.)

Поскольку симбиотические сообщества желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) животных и человека включают до нескольких сотен видов (и, соответственно до тысяч штаммов) бактерий и архей, каждый из которых потенциально подвержен фаговой инфекции, подавляющее большинство фагов, населяющих среды организма невозможно исследовать культуральными методами. Однако, с применением прямых методов исследования, таких как выделение и очистка некультивируемых вирусных сообществ из содержимого различных отделов ЖКТ и их исследование методами световой и электронной микроскопии, электрофоретического разделения, а также метагеномики позволяют оценить представленность и уровень разнообразия фагов в соответствующих микробных сообществах. Среди беспозвоночных животных экологию естественных бактериофагов исследовали (Comeau et al., 2005 и ссылки в этой работе), при этом основное внимание уделялось вибриофагам. Как это ни удивительно, кишечные микробные системы термитов, а также дождевых червей, которые активно изучались микробиологами, не вызвали до сих пор интереса исследователей, специализирующихся в области экологии бактериофагов. Нам также не известно ни одной работы, демонстрирующей присутствие фагов в микрофлоре рептилий или амфибий. Соответственно, в этом обзоре мы останавливаемся главным образом на вирусном компоненте микрофлоры тела млекопитающих и, отчасти, птиц.

II.4.1.2 Количество фагов и вирусов

Некультивируемые вирусные сообщества различных природных и техногенных местообитаний стали важным объектом экологии бактериофагов в последние десятилетия 20 века. Ещё в ранних работах с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) было показано, что подавляющее большинство присутствующих в таких образцах вирусоподобных частиц принадлежит хвостатым бактериофагам. В симбиотических микробных сообществах это было продемонстрировано для рубцовой системы овец и крупного рогатого скота (КРС) (Hoogenraad et al., 1967; Paynter et al.

1970, Ritchie et al. 1970), рубца северных оленей (Tarakanov, 1971b), преджелудков австралийских сумчатых (Klieve, 1991), толстого кишечника и фекалий лошадей (Alexander et al., 1970), и человеческих фекалий (Flewett et al. 1974).

Было предпринято несколько попыток оценить концентрацию вирусных частиц в подобных системах. Paynter et al. (1969) используя ТЭМ, оценили количество вирусоподобных частиц (VLP) в рубце КРС 5×10^7 VLP мл⁻¹ рубцовой жидкости. Позднее Ritchie et al. (1970) сообщали о 10^9 VLP мл⁻¹ в рубцовой жидкости овец и КРС. По их данным количество VLP превосходило количество бактериальных клеток в 10-20 раз. Klieve и Bauchop (1988), используя иную методику подготовки препаратов для ТЭМ, обнаружили $10^7 - 10^8$ VLP мл⁻¹ в рубцовой жидкости тех же видов животных. Klieve и Swain (1993) использовали метод электрофореза ДНК в пульсирующем поле (ПФГЭ) для разделения тотальной геномной ДНК, экстрагированной из препаратов некультивируемого вирусного сообщества рубца овец. С помощью лазерной денситометрии они оценили светимость различных зон геля и рассчитали общую концентрацию VLP 1.4×10^{10} VLP мл⁻¹. Недавно очень высокие концентрации VLP были обнаружены на поверхности слизистой оболочки кишечника человека - 10^8 VLP на 1 образец биопсии у здоровых людей и до 4×10^9 VLP на образец у пациентов, страдающих болезнью Крона (Lepage et al., 2008).

В фекалиях лошадей, судя по выходу ДНК, экстрагированной из препаратов тотального вирусного сообщества (Cann et al., 2005), мы можем оценить концентрацию фаговых частиц как $10^{10} - 10^{11}$ частиц на г⁻¹ фекалий. Однако, на ультратонких срезах лошадиных фекалий, изученных нами с помощью ТЭМ мы не смогли визуализировать ожидаемое по этим оценкам количество фаговых частиц (наши неопубликованные данные). В работе Breitbart et al. (2003), некультивируемое вирусное сообщество было выделено из человеческих фекалий и VLP были визуализированы с помощью флуоресцентной микроскопии, однако никаких оценок их концентрации авторы не приводят.

II.4.1.3. Разнообразие бактериофагов - данные метагеномики

Метагеномный подход был использован для исследования разнообразия вирусов в некультивируемых вирусных сообществах фекалий человека (Breitbart et al., 2003) и лошади (Cann et al., 2005). В обоих случаях около 2/3 полученных последовательностей не имели гомологов в базе данных. Среди оставшихся последовательности, сходные с

вирусными составляли соответственно 27% и 63%. В обоих случаях значительная часть последовательностей была гомологична известным бактериальным (20% и 50% соответственно). Судя по гомологиям последовательностей, доминирующей группой вирусов и у людей и у лошадей оказались бактериофаги с длинными несократимыми хвостами (сем. Siphoviridae), которые, вероятно, являются наиболее многочисленными в большинстве естественных микробных сообществ (Weinbauer, 2004).

Последовательности, сходные с эукариотическими вирусами составляли в обоих случаях лишь небольшую долю, что согласуется с тем, что такие вирусы лишь изредка визуализировались при исследовании тотальных препаратов вирусных сообществ фекалий с помощью ТЭМ. Интересно, что в мета геноме РНК-содержащих вирусов, экстрагированных из фекалий человека, доминирующей группой являются вирусы растений (Zhang et al. 2006). Это, видимо, объясняется тем, что их потребление с пищей значительно превосходит эндогенную продукцию РНК-содержащих бактериофагов.

С введением в практику новых методов высокопроизводительного секвенирования появилась целая серия работ, посвященных исследованию метагеномов тотального вирусного сообщества человеческого кишечника (см. обзор Letarov 2012).

Reyes et al. (2010) исследовали влияние генетических особенностей макроорганизма на состав и стабильность индивидуальных вириомов фекалий у людей. Авторы отбирали образцы фекалий у 4 пар однояйцевых близнецов и их матерей в течение 1 года. Всего было проанализировано 32 вириома. Также производилось секвенирование микробных метагеномов из тех же образцов. Около 85% последовательностей вирусных метагеномов не имели гомологий с известными вирусными последовательностями; большинство из оставшихся 15% обнаруживали сходство с последовательностями умеренных хвостатых фагов и профагов.

Разнообразие бактерий в тех же образцах оценивали по данным секвенирования библиотек 16S рРНК. По оценке авторов уровень разнообразия бактерий соответствовал примерно 800 флотипам видового уровня, в то время как сложность вирусного сообщества, оцененная двумя различными способами по данным метагеномного секвенирования составляла 52-2773 (медиана 346) и 10-984 (медиана 35) предсказываемых генотипов. Таким образом, как количество, так и разнообразие фаговых частиц оказалось достаточно низким по сравнению с известными свободноживущими микробными сообществами. Сделанное авторами предположение

о превалировании частиц умеренных фагов в пуле свободных вирионов человеческих фекалий хорошо согласуется с значительным количеством обнаруженных последовательностей, сходных с фаговыми интегразами - сайт-специфическими рекомбиназами, катализирующими внедрение и эксцизию фаговых геномов в (из) бактериальные хромосомы.

Степень сходства индивидуальных микробных сообществ хорошо коррелировала с семейными связями индивидуумов. Состав метагеномов вирусоподобных частиц проявлял, напротив, высокую степень индивидуальности и значительно отличался у разных людей вне зависимости от степени их родства (Reyes et al. 2010). В то же время темпоральная динамика была слабо выражена: у одного и того же человека состав вирусного метагенома оставался стабильным в течение периода наблюдения. Более того, авторам удалось вычлнить доминантный вирусный генотип, который персистировал у каждого индивидуума и не обнаруживал существенного изменения или мутаций за время исследования.

Вытекающее из такой интерпретации данных Reyes et al (2010) предположение о том, что фаговые популяции в человеческом кишечнике мало зависят от успешности размножения в литическом цикле (и, соответственно от успеха в конкуренции за клетки хозяев), позволяет объяснить высокую индивидуальность фаговых сообществ у людей: умеренные фаги, которые колонизировали персистирующих в данной нише бактерий первыми имеют все шансы оставаться доминирующими в течение длительного времени. Таким образом, индивидуальные особенности кишечного вириома могут отражать индивидуальную историю колонизации кишечника бактериями, лизогенными бактериями и фагами (Breitbart et al., 2008).

Результаты обсуждаемого исследования свидетельствуют против существенного селективного давления фаговой инфекции на бактериальные популяции в кишечнике человека. Никаких признаков динамики Черной королевы не было обнаружено. Впрочем, возможно, разрешающая способность метагеномных экспериментов недостаточна для детекции таких признаков. По предположению С. Абедона (Abedon 2011) незначительное селективное давление фаговой инфекции на хозяев при постоянном присутствии фагов в системе может объясняться тем, что большинство бактерий в данной системе существует в виде биопленок (см. MacFarlane and Dillon 2007).

Обсужденная выше концепция экологии фагов в кишечнике человека согласуется

с данными Caroraso et al. (2011) которые применили несколько иной подход к анализу метагеномных данных. Эти исследователи изучили 26 вирусных метагеномов человеческих фекалий, собранных от 12 индивидуумов (по 1-4 образца от каждого) Они сравнили состав этих вириомов с вириомами свободноживущих микробных сообществ. Оказалось, что дистанция между вириомами разных людей значительно больше, чем между вириомами сходных свободноживущих сообществ. Они также подтвердили вероятное доминирование умеренных фагов и отсутствие признаков ко-эволюции вирусов и хозяев *in situ*. Сходные результаты также получены в работе Minot et al (2011), в которой авторы изучали вириомы 5 добровольцев в течение 1 недели. Они также обнаружили высокую индивидуальную вариабельность вириомов при отсутствии явных признаков динамики Черной королевы. Однако, вириомы подвергались заметным изменениям при резком изменении диеты в течение 1 недели (в частности, диета с преобладанием жиров и диета с преобладанием пищевых волокон). При этом вириомы людей, подвергавшихся сходным изменениям диеты становились ближе. Эти результаты могут означать, что у людей изменения вириома следует за изменением микробиома, что в свою очередь, можно интерпретировать как аргумент в пользу гипотезы о ведущем вкладе индукции лизогенных бактерий в продукцию свободных вирусных частиц в кишечнике человека. Анализ собранных вирусных (фаговых) контигов (Minot et al 2011) на их сходство с известными умеренными фагами и профагами (использовались несколько критериев для детекции такого сходства, подробно описанные в статье) обнаружил, что около 14% этих контигов потенциально принадлежат умеренным фагам. Однако, это лишь нижняя предельная оценка, поскольку далеко не все фрагменты геномов умеренных фагов соответствуют использованным критериям.

II.4.1.4 Электронная микроскопия.

Электронная микроскопия позволяет проводить непосредственный анализ морфологического разнообразия и концентрации вирусов, исследовать распределение морфологических классов, размеров вирионов (и, соответственно геномов) и др. Низкая стоимость и высокая производительность таких исследований делает их пригодными для целей скрининга, сравнения отдельных индивидуумов или изучения изменений некультивируемого вирусного сообщества во времени. Во всех подобных исследованиях было обнаружено, что большинство VLP представлены хвостатыми

фагами. Немаловажно отметить, что большая часть типов фагов, обнаруживаемых в кишечных или рубцовых сообществах имеют «своеобразные» морфологические черты. Поэтому можно ожидать, что морфологическое сходство вирусов (точные размеры морфологических элементов должны также приниматься во внимание) хорошо коррелирует с генетическим родством, хотя бы дистантным, как это было ранее показано для некоторых групп фагов семейства *Myoviridae* (с сократимым хвостом) (Comeau et al. 2007 и ссылке в этой работе; Krylov et al., 2007; наши неопубликованные данные). Фаги имеющие «тривиальную» морфологию, как, например, лямбда-подобные сифовирусы, в этих микробных системах встречаются сравнительно редко.

Число морфологических типов фагов, обнаруживаемых в различных отделах ЖКТ животных сильно варьирует в разных работах Paynter et al (1969) описали только различнх морфотипов фагов в рубцовой жидкости КРС, тогда как другие авторы сообщали о 26 – 40 типах (Ritchie et al. 1970; Klieve and Bauchop, 1988). К сожалению, авторы не приводят ни общего числа охарактеризованных частиц, ни степени представленности разных морфотипов. В образцах рубцовой жидкости были найдены, наряду с другими морфотипами, фаги с очень длинными шлангообразными хвостами (Hoogenraad and Hird, 1970; Tarakanov, 1971a; Klieve and Bauchop 1988). Эта морфологическая черта даёт, возможно, специфическое селективное преимущество в вязких средах, с замедленной диффузией, позволяя адсорбционному аппарату вируса сканировать значительный объём жидкости в поисках рецепторов хозяина за счёт одних лишь вращательных тепловых движений частицы.

Klieve (1991) обнаружил в общей сложности 40 различных морфологических типов фагов в преджелудках серых восточных кенгуру (*Macropus giganteus*), восточных грубошёрстных кенгуру (*Macropus robustus robustus*), и кенгуровых крыс (*Aepyrumnus rufescens*). Интересно, что у грубошёрстных кенгуру преобладали миовирусы, тогда как у серых кенгуру и кенгуровых крыс доминирующим типом оказались лямбда-подобные сифовирусы. Морфологическое разнообразие фагов у кенгуровых крыс было ниже, чем у кенгуру. Возможно, это связано с тем, что эти животные употребляют меньше содержащей целлюлозу пищи, поэтому они, возможно, содержат менее сложное микробное сообщество в преджелудке.

II.4.1.5 Общие замечания, касательно некультивируемых вирусных сообществ млекопитающих.

Суммируя вышеприведённые данные, мы можем заключить, что популяции бактериофагов в кишечных и рубцовых микробных сообществах млекопитающих сильно различаются между индивидуумами. Наиболее представленные типы вирусов составляют относительно небольшие фракции тотального сообщества (4-10%) и отличаются у разных индивидуумов. Однако, имеющихся данных не достаточно, чтобы исключить возможность того, что существуют определённые свойства вирусного сообщества являющиеся характеристическими для микробных комплексов отдельных участков тела и видов животных. Так же необходимо отметить, что в плотно заселённых экологических нишах, как, например, в толстом кишечнике или в рубце, значительная часть микроорганизмов образует биоплёнки на поверхности слизистых или на частицах пищи (см обзор Macfarlane and Dillon, 2007). На настоящий момент данные о взаимодействии этой части микрофлоры с бактериофагами практически и отсутствуют, за исключением работы (Lepage et al. 2008) в которой продемонстрировано присутствие большого количества вирусоподобных частиц в биопсиях слизистой оболочки кишечника человека. Необходимы обширные сравнительные исследования качественных и количественных характеристик некультивируемых вирусных сообществ различных видов и индивидуумов, при этом такие исследования были бы особенно информативны, если бы генетические и морфологические методы использовались бы согласовано на одних и тех же наборах образцов.

II.4.2 Экология культивируемых бактериофагов

II.4.2.1. Спектр хозяев.

Хозяйская специфичность бактериофагов обычно достаточно узкая, инфекционность каждого отдельного фага ограничена, как правило, определённым набором штаммов, принадлежащих к одному или к очень близким видам бактерий. В некоторых случаях, однако, фаги могут инфицировать бактерий нескольких различных видов или даже родов. Д'Эрелль (1921) впервые предположил, что выделение фагов *Yersinia pestis* им рост из фекалий крыс через 3 месяца после завершения эпидемии чумы может объясняться ростом этих вирусов на бактериях других видов. Comeau et al. (2005) наблюдали персистенцию вибриофагов у устриц в отсутствии заметного количества хозяев в течение зимнего периода. и предположили, что вибриофаги могут

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

В литературе имеется значительное число сообщений о выделении и характеристике тех или иных бактериофагов из образцов, полученных от животных и человека. Подробный обзор всех таких работ выходит за рамки данной статьи. Коротко, бактериофаги *Streptococcus bovis*, *S. durans*, *Prevotella bryantii*, *Bifidobacterium ruminale* были выделены из рубцового содержимого разных видов жвачных (см. обзор в книге Tarakanov, 2006); фекалии человека и различных животных послужили источником выделения фагов *E. coli*, *Salmonella*, *Bacteroides*, *Klebsiella* и других бактерий (Dhillon et al 1976, Furuse et al. 1983; Havelaar et al. 1986; Cornax et al 1994; Grabow et al. 1995; Calci et al 1998; Gantzer et al. 2002; Schaper et al. 2002; Cole et al. 2003; Lusiak-Szelachowska et al. 2006; см. Также ссылки в этих работах). В большинстве случаев фаги выделялись с использованием лабораторных штаммов соответствующих видов, либо полевых изолятов, полученных и охарактеризованных заблаговременно, что является вполне логичным для большого числа исследований, посвящённых применению фагов качестве индикаторов фекального загрязнения воды

Присутствие и титры ДНК-содержащих колифагов сильно варьируют у разных видов животных и между отдельными особями, что хорошо согласуется с данными о том, что некультивируемое вирусное сообщество является высоко вариабельным, по меньшей мере в рубцах овец и КРС (Swain et al 1996; Klieve and Swain 1993). В то же время отсутствуют сообщения о специфической ассоциации каких-либо типов или групп ДНК-содержащих колифагов с определённым видом животных. Напротив, присутствие F-специфических РНК-содержащих (F-РНК) колифагов (семейство Leviviridae) в фекалиях животных обладает определённой видовой специфичностью. Эти бактериофаги могут быть подразделены на четыре генетических группы, которые

различаются также серологически. Встречаемость отдельных серотипов существенно различается у разных видов животных: фекалии лошадей, например, редко содержат F-РНК фаги, тогда как более 70% образцов помёта кур обнаруживают высокие титры этих вирусов, ($10^5 - 10^7$ БОЕ г⁻¹). Только 10-20% образцов человеческих фекалий содержат F-РНК фаги, но встречаемость групп II и III в этих образцах значительно выше (>80% от общего числа изолятов) чем у животных, у которых группы I и IV преобладают примерно в такой же степени (Cole et al. 2003; Schaper et al. 2002; Havelaar et al. 1986; Furuse et al. 1978). К настоящему времени удовлетворительного объяснения такой связи не предложено.

Обнаружение возможной ассоциации некоторых генетических подгрупп в пределах установленных родов хвостатых бактериофагов с определёнными видами макрохозяев может быть затруднено, поскольку простые и производительные методы селективного выделения генетически родственных фагов из полевых образцов не разработаны. Недавно, однако, Chibani-Chenoufi et al. (2004) сообщили о почти селективном выделении фагов, родственных T-чёрным из фекалий педиатрических пациентов с диареей в Бангладеш при использовании тест-культуры штамма *E. coli* K803. Посев тех же самых образцов на газон энтеропатогенного штамма *E. coli* O127:K63 приводило к выделению совершенно иного набора фагов, причём все они принадлежали к семейству Siphoviridae.

II.4.2.2 Культивирование индигенных кишечных фагов

Furuse et al. (1983) обнаружили, что титры колифагов в фекалиях здоровых людей обычно низки и пул свободных фаговых частиц формируется у них главным образом за счёт умеренных фагов. Эти данные свидетельствуют о том, что у здоровых людей продукция фаговых частиц в кишечнике происходит в основном за счёт спонтанной индукции лизогенных бактерий. И, таким образом, размножение фагов в литическом цикле имеет ограниченное значение для экологии колиформных бактерий в кишечнике человека. В противоположность здоровым людям, у некоторых пациентов, страдающих внутренними болезнями или лейкемией, титры колифагов были выше и значительную часть высеваемых бактериофагов составляли вирулентные фаги (Furuse et al, 1986). У нескольких пациентов увеличение титров колифагов коррелировало с ухудшением состояния.

С результатами Furuse et al. (1986), согласуются безуспешные попытки выделить

колифаги из фекалий собак с использованием индигенных штаммов E.coli (ICS) (Ricca and Cooney 2000). При использовании в качестве хозяев более 500 ICS выделенных из 6 образцов фекалий собак, содержащихся в домашних условиях, для детекции колифагов в тех же самых образцах были получены отрицательные результаты. Лишь один из этих образцов содержал фаги, активные в отношении лабораторного штамма E. coli C. Однако, у 16 собак, содержащихся в приюте, колифаги были обнаружены в различных титрах 0-10⁷ БОЕ г⁻¹. Авторы предполагают, что отсутствие фагов у домашних собак связано с их изоляцией от себе подобных и со «слишком чистыми» условиями содержания. Реконтаминация фекальными микроорганизмами, очевидно, весьма ограничена и у людей, что может отчасти объяснить процитированные выше результаты Furuse et al, (1986)

II.4.2.3 Влияние фаговой инфекции на популяции бактерий в ЖКТ

Микробная биомасса может составлять до 54% влажного веса фекалий человека (Stephen and Cummings, 1980). Колиформные бактерии (>80% которых обычно представлены штаммами E. coli) обычно присутствуют в фекалиях людей и многих животных в титрах 10⁵ – 10⁸ КОЕ.г⁻¹ (Havelaar et al., 1986). Streptococcus bovis обнаруживается в рубцовой жидкости овец концентрациях 10⁶ – 10⁷ КОЕ*мл⁻¹ (Tarakanov 2006; Iverson and Mills 1977). Эти плотности популяций превышают пороговый уровень, необходимый для экспоненциального размножения фагов, составляющий по данным Wiggins and Alexander (1985) около 10⁴ клеток*мл⁻¹ для большинства систем фаг-хозяин. Таким образом, должны существовать определённые механизмы, стабилизирующие сосуществование фагов и бактерий.

Мы предполагаем, что инфекция колифагами представляет собой селектирующий фактор, ответственный за поддержание высокого уровня внутривидового разнообразия колиформ в кишечнике лошадей, ограничивая нескольким «наиболее приспособленным» штаммам возможность вытеснить остальные. С другой стороны, это разнообразие сильно ограничивает доступность клеток хозяев для каждого отдельного типа колифагов, стабилизируя таким образом систему. Высокий уровень разнообразия и ретикулярная организация делает затруднительным прямой дифференциальный мониторинг численности отдельных штаммов и связанных с ними фагов с целью прямой проверки данной гипотезы.

Установление сложной многокомпонентной (на штаммовом уровне) структуры сообщества фагов и их хозяев в кишечном микробиоме (например, колиформных бактерий и их фагов) согласуется с результатами математического и экспериментального моделирования сообществ, включающих бактерии и их фаги, в условиях, допускающих ко-эволюцию обоих компонентов. (Poullain et al. 2008; Weitz et al, 2005). Наблюдалось расщепление популяции хозяев на множество генетических линий, различавшихся по чувствительности к фагам. В свою очередь фаги испытывали селекцию на расширение спектра хозяев ценой уменьшения эффективности адсорбции. Таким образом, сложность исходно двухкомпонентной системы многократно возрастала (Poullain et al, 2008). Сходная экологическая ситуация недавно описана Holmfeldt et al (2007) в морской экосистеме. Используя подход, основанный на комбинации ПЦР-фингпринтинга бактериальных штаммов и типирования фагов с помощью анализа спектра специфичности и рестрикционных профилей геномной ДНК, авторы продемонстрировали широкую вариабельность присутствия и спектров специфичности в сообществе флавобактерий и их фагов в прибрежных морских водах.

Инфекция бактериофагами может играть также некоторую роль в последовательности событий, имеющих место в кишечном сообществе лошадей при перегрузке ЖКТ углеводами. Такого рода экспериментальная перегрузка Было высказано предположение, что какие-то токсины, продуцируемые изменённой кишечной флорой попадают в кровоток и вызывают прямо или косвенно нарушение адгезии эпителия копыта к базальной мембране. Недавно было показано (Millinovich et al, 2006), что резкое увеличение числе клеток стрептококков группы *S. bovis* / *equinus* происходит через 8-16 ч. после дачи олигофруктана. Однако, жизнеспособность этих бактерий очень быстро падает. Одно из возможных объяснений этого явления состоит в массовой инфекции стрептококков соответствующими фагами, по аналогии с явлением фагового контроля цианобактериального цветения воды (см. обзор Weinbauer, 2004).

Было продемонстрировано значительное селектирующее воздействие природных фагов на популяции *Campylobacter jejuni* у кур. Наличие фагов *C. jejuni* в слепой кишке кур негативно коррелировало с уровнем колонизации бактерией - (в среднем 10^5 КОЕ г⁻¹ в образцах, содержащих фаги против 10^7 КОЕ г⁻¹ в образцах, где фагов не обнаруживалось; Atterbury et al. 2005). Позднее удалось показать, что присутствие фагов селектирует варианты *C. jejuni* несущие крупномасштабные

перестройки генома (Scott et al. 2007a), возникающие в следствие латерального переноса или как результат внутригеномных инверсий по двум Мю-подобным профагам, интегрированным в ДНК бактерии (Scott et al. 2007b). В обоих случаях варианты, чувствительные к фагам имели значительно преимущество в способности колонизировать бройлерных кур. В отсутствие фагов популяция быстро возвращалась к чувствительному фенотипу. Авторы предположили, что геномные перестройки *S. jejuni* возникающие в ЖКТ птиц служат адаптивным механизмом, позволяющим пережить периоды активности фагов и последующую конкуренцию за ресурсы

II.4.2.4 Воздействие искусственно вводимых фагов на бактерии ЖКТ

Эффективная элиминация патогенных бактерий из ЖКТ с помощью фаговых препаратов была многократно продемонстрирована в экспериментах по терапевтическому применению фагов (см. детальные обзоры Sulakvelidze and Barrow 2005; Sulakvelidze and Kutter 2005). Терапевтический эффект фагов может, однако, сводиться просто к уменьшению популяции патогена до уровня, при котором иммунная система хозяина способна эффективно контролировать его размножение. В некоторых опытах даже такие низкие дозы фага как 10^2 БОЕ могли предотвращать развитие инфекции при последующем экспериментальном заражении патогенной *E. coli* (см. обзор Brussow 2005), при этом эти низкие дозы фага были значительно менее эффективны, если применялись после инокуляции патогеном. Это позволяет предположить, что популяция патогенной бактерии значительно более подвержена фаговой атаке до того, как ей удаётся колонизировать определённые защищённые ниши в кишечнике.

Действие вводимого извне коктейля фагов на резидентные и интродуцированные популяции *E. coli* в кишечнике мышей исследовалось в Chibani-Chenouffi et al (2004b). Мыши, использованные в этих экспериментах, стабильно выделяли *E. coli* в титрах около 10^6 КОЕ г⁻¹ фекалий. Эта величина несколько варьировала во времени, но присутствие естественных колифагов не детектировалось на индикаторного штамма *E. coli* K803, чувствительного ко всем фагам, использованным в последующих опытах. Мыши были подвергнуты действию фагового коктейля с титром 10^7 КОЕ мл⁻¹, добавляемому к воде. Эти фаги проявляли активность в сумме практически против 100% резидентных штаммов, полученных от этих же животных до начала эксперимента. Тем не менее, воздействие вводимых извне фагов

на титры колиформных бактерий в фекалиях было незначительным, при этом фаги не могли самоподдерживаться в кишечнике за счёт инфекции резидентных бактерий. Изоляты *E. coli*, полученные во время эксперимента, сохраняли те же паттерны чувствительности к компонентам коктейля, исключая таким образом замещение резидентной популяции устойчивыми вариантами. В то же время эти фаги были способны очень эффективно снижать численность популяции чувствительного штамма *E. coli* интродуцированной гнотобиотическим мышам за неделю до дачи фагового коктейля. При этом происходила активная репликация фага в кишечнике. Однако, выжившая часть популяции оставалась чувствительной к фагам, что позволяет предположить существование в кишечнике мышей определённых сайтов, в которых клетки оказываются физически или физиологически защищены от фаговой инфекции. Так как практически вся резидентная популяция обычных мышей оказывается защищена, эти «укрытия» по-видимому, покрывают практически все ниши, пригодные для длительной колонизации *E. coli* в кишечнике мышей. Интересно отметить, однако, что мыши, полученные из того же питомника через 1 год после описанных экспериментов, практически не *E. coli* в своём кишечнике и были колонизированы другими видами энтеробактерий (Brüssow, личное сообщение). В согласии с этим наблюдением, Kasman (2005) обнаружила, что менее 20% из 48 исследованных её мышей содержали резидентную *E. coli* в ЖКТ, при этом колифаги присутствовали в минимальных титрах. Автор предположила, что одним из основных барьеров для размножения колифагов в ЖКТ мыши является отсутствие достаточной популяции хозяев.

На продукцию фагов в кишечнике оказывают также влияние физико-химические факторы среды. Желчные соли и углеводы, например, могут оказывать ингибирующее действие на адсорбцию ряда колифагов (Gabig et al. 2002). Этот эффект нивелируется экспрессией белка Ag43, представляющего собой поверхностный адгезин бактерий, способствующий агрегации клеток, например при образовании биоплёнок. Синтез Ag43 регулируется по типу фазовых вариаций, таким образом, фаговая инфекция может при некоторых обстоятельствах селективировать клетки с пониженной способностью к образованию биоплёнок. Необходимо отметить, что на некоторые фаги *Bacteroides* добавление желчных солей к среде культивирования оказывало противоположный эффект, улучшая эффективность посева (Araujo et al, 2001).

Рост в составе биоплёнок на поверхности слизистой оболочки или на пищевых частицах может также играть существенную роль в ограничении фаговой инфекции бактерий в ЖКТ. По некоторым данным (Poulsen et al. 1995) популяция *E. coli* в просвете кишечника мышей представлена клетками в состоянии голодания, физиологически малопригодными для размножения фагов. Активно размножающаяся часть популяции может быть локализована только в микроколониях на поверхности слизистой оболочки кишечника этих (Krogfelt et al. 1993). В обеих работах, однако, были использованы мыши, обработанные стрептомицином и искусственно инокулированные единственным штаммом *E. coli* B14 с известным фенотипом. Кроме того, нужно отметить, что физиология пищеварения у мышей может существенно отличаться от более крупных животных. У мышей скорость метаболических процессов значительно выше, а время прохождения пищи по кишечнику короче, чем, например, у человека или лошади. Более того, отношение площади слизистой оболочки к объёму просвета кишечника у мышей значительно выше, что создаёт условия для более быстрого всасывания питательных веществ. Таким образом, вопрос о том, насколько данные, полученные на мышах, могут быть экстраполированы на более крупных животных, остаётся открытым.

II.4.2.5 Участки тела с пониженным воздействием фагов на микрофлору

По имеющимся данным, в кишечнике по меньшей мере некоторых видов животных, бактериофаги успешно преодолевают различные физико-химические барьеры, препятствующие инфекции и эффективно размножаются за счёт резидентных популяций хозяев, представляя из себя фактор, лимитирующий их численность. Принимая во внимание открытый характер экосистемы ЖКТ в отношении обмена веществом с окружающей средой, значительная роль бактериофагов в ней является вполне ожидаемой. Однако, ситуация может существенно отличаться в других экосистемах тела животных, также плотно заселённых микроорганизмами. Hitch et al (2004), например, не смогли выделить из ротовой полости людей фаги активные в отношении индигенных бактерий, что позволило им сделать вывод, что бактерии в данной системе не подвержены существенному влиянию фаговой инфекции. Удовлетворительно объяснения этому факту пока не предложено.

В микробной системе рубца жвачных животных некоторые виды бактерий достигают значительных популяционных уровней *S. bovis* может присутствовать в концентрациях $10^6 - 10^7$ КОЕ мл⁻¹ (Iverson and Mills, 1977; Tarakanov, 2006). Как было показано Iverson and Mills (1977), вся популяция *S. bovis* у овец может принадлежать к единственному фаготипу. Авторы наблюдали быструю смену доминирующего штамма на иной, но эти события не сопровождались появлением в рубцовой жидкости детектируемого на этих штаммах фага. Тем не менее, присутствие фагов *S. bovis* в рубце в титрах $10^1 - 5 \times 10^4$ БОЕ мл⁻¹, варьирующих у разных индивидуумов, было позднее продемонстрировано (Stryiak et al, 1989).

Экология рубцовых стрептофагов активно изучалась Таракановым с соавторами в 1970-80х годах. К сожалению, работы этих авторов опубликованы с труднодоступных журналах и ведомственных отчётах, поэтому мы ссылаемся здесь на книгу (Тараканов 2006) в которой дан детальный обзор этих исследований. Эти авторы обнаруживали фаги *S. bovis* в рубцах коров и овец в титрах $10^1 - 10^4$ БОЕ мл⁻¹ и показали в тщательно контролируемом полевом эксперименте, что пероральное применение препарата бактериофага *S. bovis* (стрептофагина) у коров приводило к увеличению концентрации фага в рубце на 4-5 порядков, сопровождающееся уменьшением количества амилитических бактерий, уменьшением общей амилитической и увеличением целлюлозолитической активностей рубцового содержимого. Эти изменения приводили к улучшению мясной и молочной продуктивности и улучшению качества продукции этих животных, что было подтверждено детальными и хорошо документированными исследованиями. После прекращения дачи стрептофагина титры фагов в рубце быстро возвращались к исходному уровню и количество амилитических бактерий возрастало. Эти результаты свидетельствуют о том, что препарат одного единственного фага может оказывать воздействие на заметную часть популяции *S. bovis* в рубцах экспериментальных животных, что хорошо согласуется с Iverson and Mills (1977), сообщившими о низком внутривидовом разнообразии *S. Bovis* в рубце овец. В то же время, очевидно, что присутствует некоторый фактор, препятствующий эффективному размножению стрептофагов на резидентной популяции бактерий в рубце.

Swain et al (1996) показали, что таниновая кислота при физиологических концентрациях может ингибировать размножение бактериофагов, вызывая осаждение фаговых частиц. Тараканов с соавт. (2006) продемонстрировали, что рубцовая

жидкость коров, а также уксусная кислота при физиологических концентрациях могут инактивировать бактериофаги *S. bovis*. При этом чувствительность разных фагов сильно варьировала и зависела от используемых концентраций инактивирующих веществ. Ингибирование активности фагов в рубце различными химическими веществами может играть ключевую роль в ограничении фагового лизиса резидентных бактерий. Эта модель согласуется с выводами Wells and Rassel (1996) о том, что наблюдающийся массовый лизис бактериальной биомассы в рубце обусловлен скорее автолитическими процессами, нежели фаговой инфекцией.

Влагалище у женщин и самок животных также представляет собой интенсивно колонизируемую бактериями экологическую нишу. Наиболее существенной частью вагинальной микрофлоры людей являются лактобациллы. Виды и штаммы этих бактерий варьируют у различных индивидуумов, (Antonio et al, 1999), однако обычно у каждой отдельной женщины 1-2 штамма являются доминирующими (Antonio and Hillier 2003). Плотность колонизации довольно высока и составляет около $10^6 - 10^7$ КОЕ на вагинальный мазок. Таким образом, можно предположить, что это сообщество может подвергаться массовому лизису бактериофагами. Однако, все попытки выделения свободных фагов из вагинального отделяемого были до сего момента безуспешны (Kilic et al. 2001). В то же время было показано, что лизогенные штаммы лактобацилл часто встречаются в вагинальном микробном сообществе (Kilic et al, 2001; J. Suarez, personal communication).

Хотя влагалище менее подвержено обмену бактериями и вирусами со внешней средой, за исключением передачи, связанной с сексуальной активностью, при исследовании вагинальных мазков, полученных от клинически здоровых женщин, часто наблюдаются неожиданное резкое снижение численности лактобацилл. В большинстве случаев нормальная флора самопроизвольно восстанавливается, однако у некоторых индивидуумов возникает так называемый анаэробный бактериальный вагиноз – заболевание, при котором лактобациллярная флора замещается анаэробными бактериями, такими как *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Atarobium* and *Mobiluncus* species. По эпидемиологическим свойствам это заболевание имеет черты инфекции, передающейся половым путём (см. обзор Blackwell 1999), хотя этиологический агент до сих пор не установлен. Blackwell (1999) было сделано предположение, что причиной нарушения лактобациллярной флоры, приводящего в ряде случаев к развитию вагиноза, является фаговая инфекция. Мы предполагаем, что

такого рода событие может возникать при попадании во влагалище лактобацилл, лизогенных по фагу, активному в отношении резидентного штамма.

Частота лизогенизации клеток хозяина умеренными фагами как правило не велика (10^{-7} – 10^{-2} ; Riipinen et al. 2007, Brown et al. 2006, Kihara et al. 2001), таким образом, размножение этих вирусов в экологической нише, плотно заселённой чувствительным штаммом хозяина происходит главным образом по литическому пути, что приводит к гибели большинства клеток, которые потом могут быть замещены потомками клеток лизогенного штамма, исходно высвободившего фаг, а также вновь образованными лизогенными бактериями, либо, при менее благоприятном стечении обстоятельств, другими видами бактерий. Такой сценарий был смоделирован математически и экспериментально (Brown et al. 2006) на модели популяций *E. coli*. Принимая во внимание, что частота спонтанной индукции многих лизогенных штаммов вагинальных лактобацилл составляет менее, чем 10^{-8} БОЕ клетку⁻¹ (Kilic et al, 2001) в лабораторных культурах, любой фактор, способствующий повышению частоты индукции может увеличивать вероятность «экологической катастрофы» в вагинальном микробном сообществе. Это может объяснить существующую эпидемиологическую связь между курением и риском бактериального вагиноза (см. обзор Blackwell 1999) так как компоненты табачного дыма могут вызывать индукцию профагов у лактобацилл (Pavlova and Tao 2000). Детальное исследование временной динамики штаммов лактобацилл во влагалище и феномена лизогении у этих культур может дать ключ к проверке гипотезы о фаговом происхождении части случаев вагиноза.

II.4.3 Взаимодействия фаг-клетка – экологически значимые особенности.

Во многих случаях полевые изоляты энтеробактерий (и, вероятно, других групп микроорганизмов) имеют частичную устойчивость к бактериофагам, присутствующим одновременно с ними. Эта устойчивость может выражаться в сниженной эффективности посева соответствующих фагов, медленной адсорбции или снижении урожая фага. Предполагается, что некоторые фаги могут нести «вторичные» белки адгезии, не связанные непосредственно с аппаратом, обеспечивающим проникновение ДНК в клетку. Многие из таких предположительных вторичных адгезинов несут иммуноглобулин-подобные домены, экспонированные на поверхности головок,

сократимых чехлов хвоста или на конце воротничковых нитей фагов (Fraser et al 2007 и ссылки в этой работе). Данные о том, что подобные структуры могут быть существенны для роста фагов в лабораторных условиях пока отсутствуют, однако, в экологической ситуации, подобной таковой в кишечнике животных, их роль может быть заметной, в частности за счёт увеличения вероятности обратимой адсорбции при столкновении фаговой частицы с потенциально пригодной клеткой хозяином.

Одной из причин, вызывающих снижение эффективности посева фагов являются бактериальные системы рестрикции- модификации ДНК, широко распространённые в природе. К сожалению, на настоящий момент отсутствуют количественные данные, характеризующие встречаемость и экологическую значимость таких систем в природных микробных сообществах, ассоциированных с животными. Этот вопрос, однако, заслуживает специального исследования так как рестрикция – модификация, наряду с другими механизмами, вызывающими abortивную инфекцию, превращает часть клеток, адсорбирующих фаги, в экологические ловушки, существенно ускоряющие распад свободных фаговых частиц (Dennehy et al. 2007).

Вклад лизогении в экологические взаимоотношения фагов и бактерий в симбиотических микробных сообществах животных также мало исследован.. Furuse et al. (1983) предположили, что индукция лизогенных бактерий является главным источником свободных частиц колифагов в кишечнике здоровых людей. Однако, большинство умеренных колифагов, выделенных Dhillon et al. (1980) из пула свободных фаговых частиц фекалий человека и животных принадлежала к группе лямбдоидных фагов, в то время как фаги, полученные путём индукции лизогенных штаммов относились в основном к группе P2 – подобным. В нашей работе все фаги, полученные из фекалий лошадей, которые были отнесены к той или иной группе на основании морфологии частиц и секвенирования случайных фрагментов геномов, оказались профессионально-вирулентными фагами (Golomidova et al. 2007, см. главу «Результаты и обсуждение»). Отражает ли это расхождение результатов видовые различия кишечных микробных систем животных, или связано с методологией исследования, в настоящее время не ясно.

II. 4.4 Прямое взаимодействие фаговых частиц с тканями и клетками макроорганизма.

4.4.1 Проникновение бактериофагов во внутреннюю среду организма

Известно, что бактериофаги могут проникать в кровяное русло из кишечника и других участков тела, заселённых микроорганизмами, и транспортироваться с кровью (Dabrowska et al, 2005; Gorski et al. 2006). По-видимому, наличие в циркулирующей крови определённого количества естественных бактериофагов является нормальным явлением; был даже предложен термин «физиологическая виремия» (Gorski et al. 2006). В недавнем экспериментальном исследовании фармакокинетики трёх различных фагов у кур (Olivera et al. 2009) показано, что при пероральном приеме фаговых препаратов лишь 1 из 3 используемых фагов обнаруживался в небольших количествах в печени и селезёнке. Также данный фаг присутствовал в лёгких, куда он мог попасть случайно при введении суспензии в рот птиц с помощью шприца. Поэтому следует признать, что при таком способе введения эффективной транслокации фагов не наблюдалось, не смотря на то, что в этой работе были использованы довольно высокие дозы фагов (10^6 , 10^7 и 10^8 БОЕ на особь). С этими данными согласуются также результаты нашей работы (Letarova et al. 2012) в которой нам не удалось обнаружить колифагов в крови лошадей, обладавших значительными (10^4 – 10^7 б.о.е. /г) титрами этих вирусов в фекалиях. Несколько более интенсивным было проникновение фагов, применяемых в форме аэрозоля, через лёгкие. Однако в более ранних работах зарубежных авторов (Dabrowska et al, 2005; Gorski et al. 2006) и отечественных исследователей (Боговазова с соавт 1991, Перепанова с соавт. 1995, Токарев с соавт. 2005, Субботин с соавт 2006.) было неоднократно продемонстрировано проникновение в кровь терапевтических фагов, применяемых перорально и ректально. При пероральном применении препарата «Секстафаг» (ФГУП «Микроген» Россия), бактериофаги обнаруживались в крови уже через час (Токарев с соавт. 2005). Аналогичные результаты были получены при применении этого препарата в форме ректального суппозитория (Токарев с соавт. 2005, Субботин с соавт 2006.) В данных работах не приведены дозы фагов (даётся лишь объём принимаемого препарата), а также не указываются их титры в крови, кроме того, отсутствуют данные о различиях в проникновении разных фагов, входящих в состав данного комплексного препарата. Необходимо отметить, что скорость транслокации фагов, также как и бактерий из ЖКТ в кровь может существенно меняться в различных физиологических состояниях. При воспалительном ответе транслокация бактерий (и, вероятно, фагов) из кишечника значительно увеличивается (Домарадский с соавт. 2002). Какие свойства фагов влияют

на их перенос через эпителиальные барьеры - достоверно не установлено. Вероятно, это рецептор-зависимый транспорт, активно осуществляемый специализированными клетками иммунной системы (М-клетками, бокаловидными клетками) и, возможно, клетками эпителия кишечника и других отделов ЖКТ. В ряде работ были предприняты попытки идентификации аминокислотных последовательностей, ответственных за связывание с соответствующими рецепторами посредством технологии фагового дисплея (Constantini et al. 2009, Duer et al. 2004, Higgins et al. 2004, Kang et al. 2009). Для этого библиотеки случайных пептидов, экспонированных на частицах нитчатого фага М13 (который сам по себе плохо проникает через слизистые ЖКТ) вводились в ЖКТ экспериментальных животных, после чего фаги выделяли из крови и внутренних органов или из соответствующих тканей самого ЖКТ, и определяли последовательности экспонированных на них пептидов. В результате было установлено, что пептиды YPRLLTP (Duer et al. 2004) и CSKSSDYQC (Kang et al. 2009) улучшают процесс транспорта фага, пептиды LETTCASLCYPS и VPPHPMTYSCQY (Higgins et al. 2004) усиливают связывание с М клетками и тканью пейеровых бляшек крыс, а пептид LTHPQDSPPASA стимулирует связывание экспонирующих его вирусных частиц со слизистой оболочкой кишечника мышей, повреждённой в результате сильной системной воспалительной реакцией (Constantini et al. 2009). В отличие от процитированных выше работ, в исследовании (Hamzeh-Mivehroud et al. 2008) не было обнаружено существенного влияния экспонируемых 7-членных пептидов на транспорт фага М13 из кишечника мышей в кровь. Вполне возможно, что этот результат связан с особенностями использованной авторами экспериментальной системы или с тем, что длины случайного пептида в 7 аминокислотных остатков не достаточно для эффективного связывания с соответствующими рецепторами клеток слизистых кишечника у мышей. В настоящее время в литературе отсутствуют публикации о попытках проводить селекцию терапевтически значимых фагов (главным образом т.н. хвостатых фагов) по признаку усиленной транслокации из ЖКТ в кровь. При этом успех в отборе длительно циркулирующих в крови вариантов фагов (см. ниже) позволяет надеяться, что хотя бы в некоторых случаях такая процедура может быть эффективной. Обращают на себя внимание имеющиеся данные о высокой эффективности транспорта в кровь фагов, вводимых ректально (Боговазова с соавт. 1991б Перепанова с соавт. 1995) Данный феномен уже используется в терапевтической практике, на российском рынке уже присутствуют препараты фагов, выпускающиеся в

форме ректальных суппозиторий (см. выше), однако механизмы транслокации фагов из прямой кишки и факторы, влияющие на этот процесс, требует более пристального исследования.

При внутримышечном или интраперитонеальном введении фагов их проникновение в кровь и органы было значительно более интенсивным, чем при пероральном пути введения. Так, по данным (Olivera et al. 2009) через 3 часа после внутримышечного введения курам 10^8 КОЕ трёх фагов их концентрация в селезёнке составляла $2 \times 10^2 - 3 \times 10^4$ БОЕ \times мл $^{-1}$, и $6 \times 10^2 - 10^4$ КОЕ \times мл $^{-1}$ в печени. В последующие часы концентрация фагов быстро падала и через сутки фаги практически полностью элиминировались. Обращают на себя внимание существенные различия в эффективности проникновения в органы птиц различных типов фагов, инъецированных в одной и той же дозе. При интраперитонеальном введении мышам 10^{11} БОЕ фагов (всего протестировано 4 фага) их концентрация в крови через 2 часа составляла $5 \times 10^8 - 2 \times 10^{10}$ БОЕ \times мл $^{-1}$, что свидетельствует о достаточно эффективном процессе проникновения фагов во внутреннюю среду организма (Uchiyama et al. 2009). В одной из ранних (но в то же время одной из наиболее тщательно выполненных) работ по фармакокинетике фагов (Dubos et al. 1943) продемонстрировали эффективное проникновение бактериофагов *Shigella dysenteriae* через гематоэнцефалический барьер у мышей. При интраперитонеальной инъекции очищенных ультрафильтрацией лизатов фаги практически немедленно появлялись в крови. У здоровых животных их проникновение в ткань мозга отмечалось лишь в незначительном числе у некоторых особей. Напротив, в группе мышей, инфицированных *S. dysenteriae* внутричерепно в дозе, превышающей DL95%, титр фага в ткани мозга быстро возрастал до $10^7 - 10^9$ БОЕ \times г $^{-1}$. В дальнейшем титр фагов в мозге падал медленнее, чем в крови. Выживаемость инфицированных мышей, получивших $10^7 - 10^9$ БОЕ фага, составляла 72% против 4% в контрольной группе, которой вводили инактивированный нагреванием препарат.

II.4.4.2 Распределение фаговых препаратов в организме и их элиминация

Ещё в ранних работах 20-30 гг. (Sulakvelidze and Kutter 2005) было показано, что бактериофаги быстро исчезают из циркулирующей крови. В крови мышей, получавших фаги интраперитонеально (Uchiyama et al. 2009), быстро создавались очень высокие концентрации вирусов (до 10^{10} БОЕ \times мл $^{-1}$), после чего их титр падал примерно на 3

порядка за 12 часов, и далее снижался по более плавной кривой. Авторы аппроксимировали такую двухфазную кинетику уравнениями вид: $C = 3,525 \times 10^9 \times e^{-0,753t} + 2,35 \times 10^7 \times e^{-0,0997t}$, где C – концентрация, БОЕ \times мл $^{-1}$, t – время, ч., числовые коэффициенты варьировали для различных типов бактериофагов. В крови некоторые бактериофаги могут адсорбироваться на эритроцитах и лейкоцитах (Dennehy et al. 2007, Raynaud et al. 1992). Участвуют ли таким образом секвестированные фаги в инфекции целевых бактерий в процессе фаготерапии - не вполне понятно. Наиболее активно частицы фагов поглощаются печенью, где они быстро разрушаются (Olivera et al. 2009, Inchley et al. 1969). В селезёнке фаги сохраняются несколько дольше (Sulakvelidze and Kutter 2005, Olivera et al. 2009, Appelmans 1921). По-видимому, ретикулоэндотелиальная система играет ведущую роль в этом процессе по сравнению с циркулирующими фагоцитами, так, у мышей с индуцированной циклофосфамидом нейтропенией, элиминация фагов замедлялась лишь в ограниченной степени (Uchiyama et al. 2009).

Фаговые частицы подвергаются эффективной элиминации ретикуло-эндотелиальной системой. Возможно, однако, отобрать штаммы фагов с изменённой структурой поверхностных белков, обладающих значительно увеличенным временем полужизни в крови (для этого может быть достаточно одной аминокислотной замены (Vitiello et al. 2005), такие длительно циркулирующие мутанты могут находиться в кровотоке в 1000 и более раз дольше родительского штамма (Vitiello et al. 2005, Caparelli et al. 2006, 2007)

Выделение фагов с мочой было показано неоднократно (Перепанова с соавт. 1995, Токарев с соавт 2005, Субботин с соавт. 2006, Дарбеева О. личное сообщение), однако, по-видимому, этот механизм не имеет решающего значения в процессе элиминации фагов, так как концентрации этих вирусов в моче $10^1 - 10^2$ (Субботин с соавт. 2006), суммарное выведение их незначительно. Вместе с тем, даже этих незначительных количеств бактериофагов, попадающих в мочевыводящую систему, оказывается достаточно для достижения терапевтического эффекта пероральных препаратов бактериофагов при урологических инфекциях (Перепанова с соавт. 1995). Логично предположить также, что при повреждении вследствие воспалительного процесса базальной мембраны капилляров почечных клубочков (при пиелонефрите), интенсивность выделения фага увеличится. Возможно также, что попадание фага в мочу связано не только с его фильтрацией в клубочках, но и с переносом из крови

через клетки эпителия канальцев. Вопрос о выделении фагов с мочой и факторах, контролирующих этот процесс, нуждается в более тщательном изучении.

Выработка в организме пациентов специфических антител к бактериофагам может препятствовать успеху фаговой терапии. Определённые титры антифаговых антител обнаруживаются также и у здоровых людей и пациентов до фаговой терапии (Kucharewicz-Krukowska, et al. 1987). Однако, по имеющимся на данный момент наблюдениям, присутствие таких антител в крови слабо коррелирует с результатами терапии (A. Gorski, личное сообщение, Sulakvelidze and Kutterr 2005). Необходимо отметить, что не все антитела, взаимодействующие с фаговой частицей, обладают прямым нейтрализующим действием. Для этого антитела должны взаимодействовать с адгезинами и (у части фагов) некоторыми другими белками хвоста. Выработка специфических высокоафинных иммуноглобулинов класса IgG требует нескольких недель времени, поэтому при относительно непродолжительных курсах фаготерапии эта проблема не имеет существенного значения. Кроме того, иммуногенность разных фагов существенно различается, для достижения значимого ответа против некоторых бактериофагов требуется применение адъювантов и повторной иммунизации. Нужно также отметить, что количество антигена, содержащегося в терапевтических дозах очищенных бактериофагов, незначительно, так, например, 10^{10} частиц бактериофага T4 содержат только около 1 мкг белка (подсчёт основан на том, что массовое содержание ДНК и белка в частицах хвостатых фагов примерно одинаково (Miedzybrodzki et al. 2008).

II.4.4.5. Иммуно-биологическая активность фаговых частиц

Непосредственное воздействие некоторых типов фаговых частиц на иммунную систему человека и животных было продемонстрировано в недавних работах группы проф. Gorski. Было показано, что вирусные частицы T-чётных бактериофагов уменьшают продукцию активных форм кислорода нейтрофилами, индуцированными бактериями или эндотоксином, супрессируют активацию T-клеток, способствуя толерантности к трансплантатам, а также оказывают некоторое противоопухолевое воздействие (Miedzybrodzki et al. 2008, Pajtasz-Piasecka et al. 2008, Przerwa et al. 2006). Применение бактериофаговых препаратов при лечении различных инфекций, вызванных стафилококками и E.coli, часто наблюдалось резкое падение уровня сывороточного C-реактивного белка, являющегося важным маркером воспаления. По-

видимому, такое падение не может быть объяснено только антибактериальным эффектом фагов, и может быть вызвано иммуномодулирующей активностью фаговых частиц (Gorski et al. 2009)

Было высказано предположение, что связывание частиц фага T4 с эукариотическими клетками опосредовано белком вершин капсида пг 24, который содержит аминокислотный мотив KGD, близкий к мотиву RGD, распознаваемому $\beta 3$ интегринами (Gorski et al 2006). Это связывание может отчасти, обуславливать иммуносупрессорный и противоопухолевый эффект фага T4 in vivo и in vitro (Dabrowska et al. 2007). Мутант фага T4, лишённый декорирующего белка капсида пг hос, имеет более высокую иммунобиологическую активность (Dabrowska et al. 2007), что, возможно, связано с частичным маскированием этим белком мотива связывания $\beta 3$ интегринов. У нескольких фагов обнаружены поверхностные белки, обладающие структурным сходством с молекулами, вовлечёнными в сигнальные каскады иммунокомпетентных клеток. Целый ряд структурных белков различных фагов имеет в своём составе иммуноглобулин – подобные (Fraser 2007) или коллаген – подобные домены (Rasmussen 2003). В работе (Lepage et al. 2008) было отмечено значительное увеличение концентрации фаговых частиц на изъязвлённой слизистой оболочке кишечника и предположили, что иммунологическая активность фаговых частиц может принимать какое-то участие в патологическом процессе при болезни Крона. С другой стороны, предполагается, что природные фаговые популяции могут участвовать в регуляции взаимодействий лимфоидной ткани кишечника и кишечной микрофлоры, в частности, в подавлении воспалительного ответа вызванного массивным контактом с антигенами (Gorski et al. 2006). Однако, экспериментальные данные, характеризующие взаимодействия естественного вирусного сообщества с иммунной системой, пока отсутствуют

II. 5. Бактериофаг T4. Семейство T4-подобных бактериофагов¹

II. 5.1 Общая характеристика группы

T4-подобные бактериофаги – это широко распространённая группа

¹ При написании данного раздела использованы материалы кандидатской диссертации О.Р. Латыпова, защищенной под моим научным руководством (Латыпов 2007).

вирулентных бактериофагов, имеющих генетическое и морфологическое сходство с хорошо изученным фагом *E. coli* T4.

Фаг T4 и очень близкие к нему бактериофаги T2 и T6 были выделены и описаны в 1945 году Демерек и Фано (Demerec and Fano 1945). В дальнейшем Р. Эдгар и Д. Эпштайн использовали эту группу вирусов в качестве рабочей модели для генетических исследований и сделали T4 «рабочей лошадкой» зарождавшейся тогда молекулярной биологии.

На настоящий момент, бактериофаг T4 является одним из наиболее подробно исследованных биологических объектов. Появившиеся в конце 1930-х – в начале 1940х годов методы электронной микроскопии позволили визуализировать фаговые частицы. В дальнейшем на основании морфологии вирионов были выделены семейства хвостатых бактериофагов. Фаг T4, в соответствии с его морфологией, был отнесен к семейству Myoviridae – бактериофаги с сократимым хвостовым отростком. Геном бактериофага T4, достаточно детальные карты которого были составлены генетическими методами к концу 1970х, был полностью секвенирован к 1995 г. усилиями большой международной коллаборации, и составляет без учёта концевой избыточности 168 903 п.н. В этом геноме идентифицированы 278 открытые рамки считывания, из которых лишь 62 являются необходимыми для роста бактериофага в лабораторных условиях (Miller et al. 2003). Транскрипция генов фага T4 осуществляется при помощи трех типов промоторов: ранних, средних и поздних (Mosig et al. 1994). Несмотря на долгую историю молекулярно-биологических исследований фага T4, функции более 100 его открытых рамок считывания до сих пор неизвестны.

Вирион фага T4 состоит из головки, сократимого хвостового отростка, включающего базальную пластинку, сократимый чехол и стрежень, а также длинных и коротких хвостовых фибрилл (Рис. 2). В районе «шейки» фаговой частицы, отделяющей головку от хвостового отростка располагается комплекс «воротничок-бакенбарды».

Головка бактериофага состоит из основного головочного белка (p23), гексамерная решётка которого формирует грани головки, p24, формирующего пентамеры в вершинах икосаэдра (кроме порталной), а также декорирующих белков Hoc и Soc (Fokine et al. 2004)

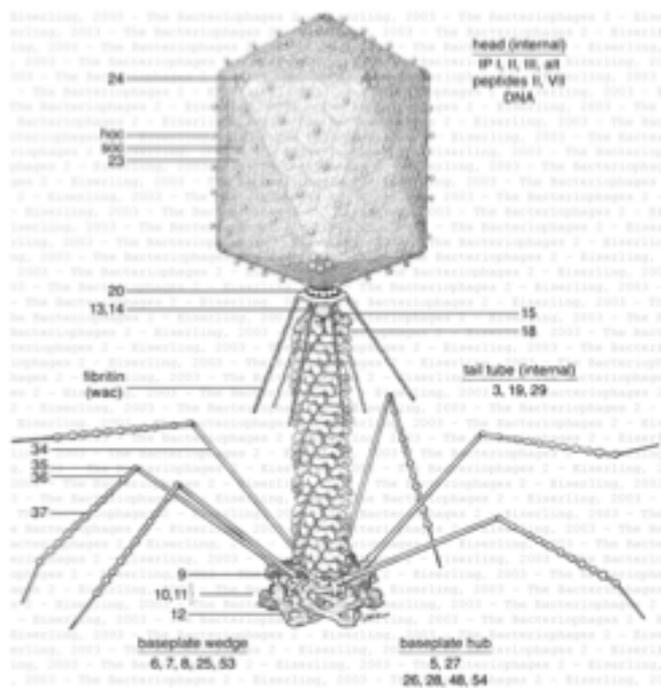


Рис. 2. Схема строения вириона бактериофага T4 (из работы Mosig and Eiserling 2006)

Через портовый белок (пг20) и продукты генов 3, 13, 14 и 15 головка присоединяется к хвостовому отростку или хвосту фага, состоящему из стержня (пг19), окруженного сократимым чехлом (пг18). Оканчивается хвостовой отросток базальной пластинкой, представляющей собой сложный белковый комплекс, включающий субъединицы продуктов генов 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 25, 26, 27, 28, 29, 48, 54 (Kostuchenko et al. 2005).

Присоединенные к базальной пластинке изогнутые длинные хвостовые фибриллы (ДХФ), состоящие из продуктов генов 34, 35, 36, и 37 (а у фагов T2, T6 и ряда иных - также пг 38) и короткие хвостовые фибриллы (пг 12), являются рецептор-узнающими адгезинами, которые необходимы для адсорбции фага на поверхности клетки-хозяина (Kutter et al, 2005).

К шейке фаговой частицы, состоящей из гетероолигомера продуктов генов 13 и 14 присоединяются шесть тримерных молекул фибритина, формирующих воротничковые нити («бакенбарды») (Fokine et al. 2004, Kostuchenko et al 2006). Шейка отделяет головку фаговой частицы от ее хвоста. Подробнее о структуре и функциях этого комплекса см. ниже.

К концу 1990-х Н.Кrisch с соавторами (Tetart et al. 2001) исследовали обширную коллекцию изолированных бактериофагов морфологически сходных с Т4 предложили первую филогенетическую систему этой группы бактериофагов (иногда, вопреки принятой систематики именуемой суперсемейством). В основу классификации помимо чисто морфологических признаков, таких как размеры головки фаговой частицы, легла степень сходства аминокислотной последовательности продуктов ряда генов этих бактериофагов, в частности – гомологий в генах основного структурного белка головки (ген 23), а также генах, кодирующих структурные белки хвостового отростка: стрезня (ген 19) и сократимого чехла (ген 18). В ходе дальнейших исследований в соответствии с данными признаками, Т4-подобные бактериофаги были подразделены на 4 группы (Рис. 3).

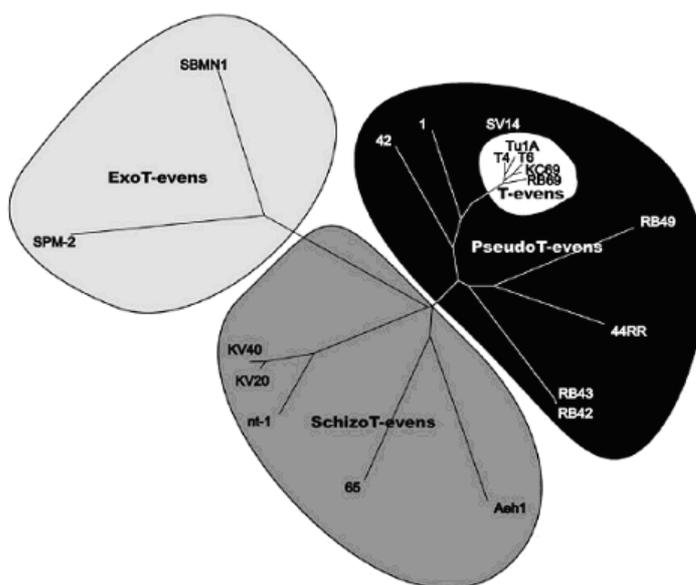


Рис. 3. Филогенетическое дерево семейства Т4-подобных бактериофагов по Г. Криш².

Наиболее близко родственные Т4 бактериофаги относятся к группе истинно Т-чётных. Эти фаги имеют морфологию частицы, практически идентичную Т4 и отличаются друг от друга по аминокислотным последовательностям ключевых белков не более, чем на 5% (Monod et al. 1997, Tetart et al. 2001) К этой группе относятся такие бактериофаги, как Т2, Т4 и Т6, а также большое число других изолятов. К этой группе относятся также фаги RB69, Tu1a, SV40, JS98 и некоторые другие. Несмотря на последовательность гена 23, типичную для истинно Т-четных фагов, эти бактериофаги

² Группа Exo-T-evens не была известна к началу нашей работы и установлена с участием автора

по свойствам своего генома близки к псевдо-Т-четным (см. ниже; Desplat and Krisch 2003). Особенности данной группы может свидетельствовать о наличии интенсивного обмена генетическим материалом между истинно- и псевдо-Т-четными бактериофагами.

К группе псевдо-Т-четных относятся эволюционно удаленные от Т4 бактериофаги, такие как RB42, RB43, RB49 и 44RR. Несмотря на то, что их морфология очень напоминает Т4, только 10% их ДНК гибридизуется с ДНК фага Т4 при жестких условиях. Аминокислотные последовательности одного из наиболее консервативных белков Т4-подобных бактериофагов – главного белка капсида (головки) пг 23, отличаются у фагов этой от последовательности пг 23 фага Т4 до 30%. У RB49 - наиболее изученного бактериофага, относящегося к данной группе - показано также существенное отличие в стратегии экспрессии генома, а именно – отсутствие средних промоторов.

К группе относят шизо-Т-четных бактериофагов, относят фаги еще более филогенетически удаленные от Т4, большинство которых изолированы на хозяевах, филогенетически удаленных от *E. coli*, таких как представители родов *Aeromonas* и *Vibrio*. Подавляющее большинство фагов этого семейства имеет головку большего размера, чем у Т4 (137 нм вместо 111 нм). Соответственно, и их геном больше, чем геном фага Т4 (230-250 тыс. п.н. вместо 169 тыс. п.н. у Т4) (Tetart et al. 2001, Desplat and Krisch 2003). Отличия в аминокислотных последовательностях белков этих бактериофагов от истинно Т-четных бактериофагов еще больше, чем у псевдо-Т-четных, что, вероятно, связано с длительной генетической изоляцией этих групп в силу различающегося спектра хозяев. Интересно, что еще в 1987 году у Т4 были получены точечные мутации в гене 23, приводящие к увеличению длины капсида (Doerman et al. 1987). Возможность подобных преобразований, в купе со свойствами шизо-т-четных фагов, говорит о том, что в процессе эволюции объём генома Т4-подобных фагов (определяющийся напрямую размером головки) может изменяться без особых препятствий.

Наиболее филогенетически и морфологически удаленной группой Т4-подобных фагов являются экзо-Т-четные бактериофаги. Для представителей данной группы характерна головка, имеющая форму изометрического икосаэдра (85 нм), а также более длинный, чем у Т4 хвостовой отросток (180 нм вместо 113 нм) (Hambly et al.

2001). Несмотря на столь явные отличия в морфологии, гомологии в нуклеотидных последовательностях генов 23, 18 и 19 позволяют отнести этих фагов к семейству T4-подобных. Экзо-T-четные бактериофаги были изолированы на цианобактериях родов *Synechococcus* и *Prochlorococcus*.

В настоящее время быстро накапливаются новые последовательности полных геномов бактериофагов, родственных T-чётным, в том числе благодаря системным усилиям группы J. Karam. Этот процесс многократно ускорился благодаря появлению пиросеквенирования и других методов секвенирования «нового поколения». Активное изучение новых геномов бактериофагов позволило недавно идентифицировать новую группу вирусов, отдаленно родственную близкую T-чётным, которые предлагается выделить в отдельный род *Viunalikevirus* (Adriaenssens et al. 2012 и ссылки в этой работе). Дальнейшие исследования в этом направлении со временем, возможно, позволят реконструировать эволюционную историю T4-подобных бактериофагов, а также, несомненно, улучшат наше понимание биологии этих вирусов.

II.5.2 Фибритины T4-подобных бактериофагов.

Продукт гена *wac* бактериофага T4, белок фибритин, входит в состав комплекса "воротничок-бакенбарды", который локализован на частице бактериофага в месте соединения головки фаговой частицы и хвостового отростка - "шейке" (Рис. 4).

Воротничковые нити, которые представляют собой фибриллы размерами около 48x2 нм, были обнаружены при помощи электронной микроскопии еще в 1970 году (Yanagida et al. 1970, Dickson et al. 1970). Название, «фибритин», этот белок получил в 1988 году, когда он привлек внимание группы В.В. Месянжинова (Prilipov et al. 1988)

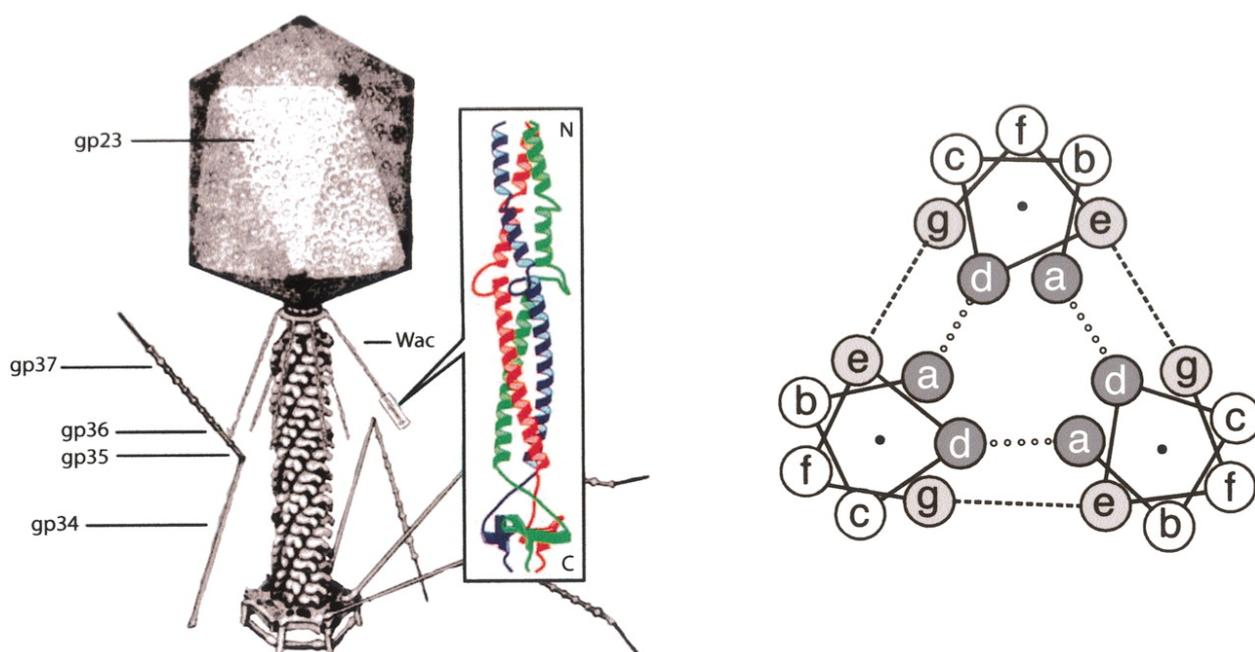
В 2013 г, уже после завершения нашей работы, опубликована статья Fokine et al. (2013) в которой представлена детальная реконструкция шейки частицы фага T4 с помощью крио-электронной микроскопии. Авторами показано, что частица фага T4 содержит не 6, как показано на рис. 4А, а 12 молекул фибритина, 6 из которых образуют воротничок, а 6 других – воротничковые нити (Рис. 4В). Таким образом авторам удалось атрибутировать электронную плотность воротничка, которая в более ранних реконструкциях (Kostuchenko et al. 2004) не была поставлена в соответствие определенным белкам фага. По данным Fokine et al. (2013) Каждая ДХФ образует два контакта с молекулами фибритина: один с воротничковой нитью в районе колена ДХФ,

а второй – с С-концевым участком молекулы воротничка, расположенный ближе к концу ДХФ (на пг 37). Эти существенные уточнения, однако, не оказывают принципиального влияния на интерпретацию результатов нашей работы.

После определения последовательности гена *wac* (Prilipov et al. 1988), основываясь на анализе аминокислотной последовательности, данных спектроскопии кругового дихроизма и экспериментах с делеционными вариантами фибритина, Б. Соболев и В. Месянжинов сделали вывод о том, что фибритин имеет структуру параллельного альфа-спирального сегментированного coiled-coil (Sobolev and Mesyanzhinov 1991) (структурные основы и закономерности образования структуры coiled-coil рассмотрены ниже). К настоящему моменту методами рентгеновской кристаллографии решены структуры нескольких делеционных вариантов фибритина бактериофага Т4 (Boudko et al. 2004, Strelkov et al. 1998, Tao et al. 1997). Согласно полученным в этих работах данным, фибритин представляет собой тримерную фибриллу, длиной 480 Å, которую можно разделить на три домена, отличающихся по своему строению и функции. Глобулярный N-концевой домен фибритина состоит из 50 а.к. и служит для прикрепления данного белка к «шейке» фаговой частицы.

Средняя часть фибритина представляет собой тримерную параллельную альфа-спиральную coiled-coil фибриллу, содержащую 13 сегментов с гептадными повторами, перемежающимися петлями (Sobolev and Mesyanzhinov 1991, Efimov et al. 1994). На С-конце фибритин имеет еще один небольшой (30 а.к.) глобулярный домен.

A.



В.

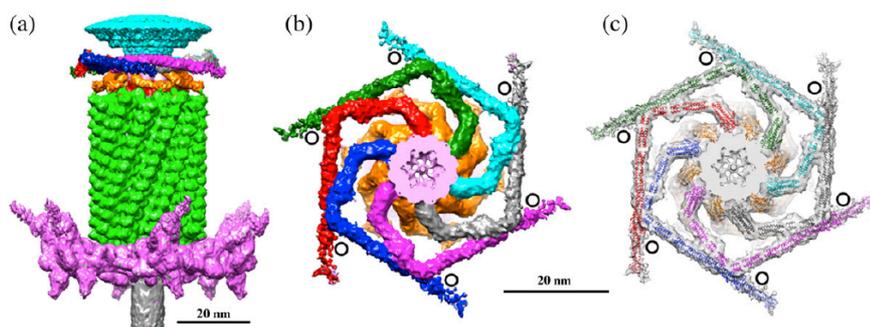


Рис. 4. А. Схема строения ДХФ бактериофага Т4 и его фибритина. Справа – схема структурной организации фибритина - тримерного сегментированного α -спирального coiled coil белка (показана проекция одной гептады каждой полипептидной цепи на плоскость, перпендикулярную оси суперспирали; пунктирные линии из белых кружков обозначают гидрофобные взаимодействия остатков в гидрофобном коре суперспирали, чёрные пунктирные линии - электростатические взаимодействия заряженных остатков, стабилизирующих структуру coiled coil) **В.** Структура области шейки частицы фага Т4 (хвост сокращен) и укладка молекул фибритина (по данным Fokine et al. 2013). Кружками отмечены участки контакта ДХФ и «верхних» молекул фибритина, образующих воротничок.

Фибритин функционирует как молекулярный шаперон, ускоряющий в процессе морфогенеза вируса присоединение длинных хвостовых фибрилл к базальной пластинке фага (Wood et al. 1994).

Средняя часть фибритина представляет собой тримерную параллельную альфа-спиральную coiled-coil фибриллу, содержащую 13 сегментов с гептадными повторами, перемежающимися петлями (Sobolev and Mesyanzhinov 1991, Efimov et al. 1994). На С-конце фибритин имеет еще один небольшой (30 а.к.) глобулярный домен.

Фибритин функционирует как молекулярный шаперон, ускоряющий в процессе морфогенеза вируса присоединение длинных хвостовых фибрилл к базальной пластинке фага (Wood et al. 1994).

Мутанты фага Т4, лишенные способности синтезировать фибритин, жизнеспособны в лабораторных условиях. При росте амбер – мутантов по гену was длительность инфекционного цикла на семь минут больше, чем у дикого типа. На газоне чувствительных штаммов бляшки was – дефективных фагов имеют меньший размер, а в жидкой культуре урожай фага на одну инфицированную клетку

уменьшается в 5-10 раз по сравнению с диким типом (Conley and Wood 1975, Follansbee et al. 1974).

Фибритин также является элементом простейшего молекулярного сенсора, позволяющего фагу модулировать адсорбцию в зависимости от условий среды. Известно, что длинные хвостовые фибриллы на частице фага могут находиться в двух положениях: "down", при котором они направлены вниз и способны к адсорбции на клеточной стенке, и "up", при котором они, взаимодействуя с бакенбардами, отогнуты вверх, вдоль хвостового отростка, и не активны (Wood 1994, Follansbee et al. 1974, Conley and Wood 1975). Положение "up" стабилизируется при некоторых условиях внешней среды. ДХФ подняты при рН ниже 5, низкой ионной силе, низкой температуре, а также в присутствии полиэтиленгликоля (Follansbee et al. 1974). Таким образом, с помощью пг was и других элементов сенсора, бактериофаг Т4 может реагировать на изменение окружающей среды. Этим объясняется также способность мутантов фага Т4 по гену was адсорбироваться на клетках в присутствии полиэтиленгликоля, тогда как адсорбция фага дикого типа полностью подавляется в этих условиях.

Также высказано предположение, что переход длинных фибрилл в опущенное положение в определённых условиях может модулироваться следовыми концентрациями различных метаболитов бактерий и / или изменением кластерной структуры воды в ближайшей окрестности бактериальной клетки. Опускание фибрилл приводит к резкому увеличению эффективного гидродинамического радиуса вирусной частицы и уменьшению амплитуды броуновских движений, что должно приводить к некоторому концентрированию вируса вблизи бактерии (то есть к таксису) (Иванитский с соавт. 1995)

Бактериофаги, наиболее близко родственные Т4, истинно Т-четные, такие как Т2 и Т6, КЗ Ох2 имеют аминокислотные последовательности пг was, практически идентичные фибритину фага Т4 (Prilipov et al. 1988, Шнейдер 1997). Гомологи фибритинов более отдаленных в филогенетическом отношении фагов к моменту начала нашей работы не были известны.

II.6. Фолдинг белка.³

II.6.1 Общие закономерности фолдинга

II.6.1.1 Фолдинг белка как вторая половина генетического кода

Проблема укладки полипептидной цепи в нативную пространственную структуру - одна из наиболее актуальных в современной биохимии молекулярной биологии и медицине. Многие наследственные заболевания, такие как ретикулярный пигментоз и куриная слепота, болезнь Альцгеймера, идиопатический муковисцидоз (cystis fibrosis), синдром Ларона при мутациях в гормоне роста, синдром Марфана при мутациях в гене фибриллина, различные болезни соединительной ткани, являются следствием нарушения фолдинга соответствующих белков в клетке. Мутации в гене p53 - супрессоре опухолевого роста также, вероятно, приводят к нарушению фолдинга (Santucci et al. 2004, Курочкина и Месянжинов 1996).

Понимание механизмов фолдинга *in vivo* существенно также для развития биотехнологии и биоинженерии. При гетерологичной продукции различных белков в следствие aberrantного фолдинга рекомбинантные белки часто накапливаются в клетках в виде нерастворимых тел включения (Gautam et al. 2012). Возможность рационального дизайна белковых молекул *de novo* также ограничивается недостаточным пониманием закономерностей фолдинга.

В процессе формирования нативной структуры белковой молекулы происходит отбор правильной, биологически активной конформации из огромного множества стериически возможных состояний (Ramachandran et al. 1968). Простой перебор этих состояний потребовал бы времени сравнимого со временем существования Вселенной, однако в клетке процесс фолдинга занимает промежутки времени, исчисляемые минутами или секундами. Эта проблема известна под названием парадокса Левинталя (Курочкина и Месянжинов 1996). Предложено несколько гипотез, объясняющих способность белка быстро находить правильную конформацию, в том числе теория «иерархической конденсации» с последовательным формированием элементов вторичной структуры белка, доменов, субдоменов и сборкой субъединиц (Jaenicke 1991, Matouschek 1994) & После классической работы Анфинсена (Anfinsen et al. 1961), показавшего, что денатурированная рибонуклеаза А способна к спонтанному

³ Литература по этой проблеме применительно к задачам данного исследования подробно проанализирована в моей работе (Летаров 1999), послужившей основой для данного раздела

рефолдингу *in vitro* стало очевидно, что полипептидная цепь содержит полную информацию, необходимую для формирования её пространственной структуры. И, хотя не все белки удаётся ренатурировать *in vitro* и скорость и условия рефолдинга в клетке не сопоставимы с условиями в эксперименте, все факторы, управляющие фолдингом в клетке (молекулярные шапероны, пептидилпролил-цис-транс-изомеразы, изомеразы дисульфидных связей, протеазы, удаляющие неправильно собранные полипептидные цепи и агрегаты, а также существующие в цитоплазме физико-химические условия) носят неспецифический характер. Конечная конформация полипептидной цепи определяется, таким образом, только её аминокислотной последовательностью.

Идентификацию стереохимического кода фолдинга то есть способа кодирования пространственных взаимодействий в первичной структуре белка часто называют второй половиной проблемы генетического кода.

В целом, как сформулировал Крейтон (Creighton 1994) при изучении проблемы фолдинга возникают следующие вопросы:

1. В результате каких кинетических процессов или последовательных стадий белок принимает нативную биологически активную конформацию
2. Какова физическая основа стабильности различных конформаций белка
3. Почему аминокислотная последовательность белка определяет одну его конечную структуру, а не иную
4. Как предсказать трёхмерную структуру белка исходя из его аминокислотной последовательности.

II.6.1.2 Основные закономерности фолдинга.

Две основные гипотезы, о том, как могут сворачиваться белки, были сформулированы в 1972 г. Гипотеза Болдуина (Tsong et al. 1972) предсказывала, что лимитирующим шагом в сворачивании белка является формирование ядра фолдинга, которое затем быстро растёт, охватывая всю молекулу. Эта гипотеза подразумевает, что сворачивание происходит по принципу «всё или ничего»: молекула скачкообразно переходит из развёрнутого в свёрнутое состояние, минуя какие-либо интермедиаты.

Птицыным (Ptitsyn et al. 1972, Птицын 1998) напротив была предложена гипотеза, согласно которой процесс самоорганизации макромолекулы сопровождается

формированием ряда промежуточных состояний с возрастающей степенью упорядоченности.

По современным представлениям (Santucci et al. 2004, Птицын 1998) обе эти гипотезы верны для определённых классов белков.

Для ряда белков экспериментально показано существование интермедиатов фолдинга типа «расплавленная глобула» (Dey et al. 2012, Sasha et al. 2012, см. также Santucci et al. 2004 и ссылки в этой работе). Однако в 1993 г. Джексон и Фершт показали, что сворачивание ингибитора химотрипсина 2 (CI2) протекает без накопления каких-либо кинетических интермедиатов (Jackson et al. 1993).

II.6.1.3 Гипотеза нуклеации и роста

На основании результатов компьютерного моделирования Шахновича и соавторов (Abkhevich et al. 1991), а также различных экспериментальных данных Птицыным были сформулированы следующие закономерности (Птицын 1998): 1) Развёрнутая цепь флуктуирует в течении достаточно долгого времени, до тех пор, пока случайно не достигает состояния в котором имеется определённый набор контактов аминокислотных остатков, характерный для нативной структуры белка. После достижения этого состояния процесс сворачивания очень быстро распространяется на остальную часть молекулы и приходит к завершению без образования каких-либо кинетических интермедиатов. 2) Сворачивание белка начинается скорее всего с формирования определённого набора нативных контактов (а не просто некоторого числа любых нативных контактов). 3) Остатки, входящие в состав ядра сворачивания заметно разнесены вдоль по цепи.

Интересно, что в компьютерном эксперименте (Abkhevich 1991) все последовательности, стабилизирующие одно и то же конечное состояние имеют одинаковые ядра нуклеации. Это может быть связано с тем, что такие последовательности включают в себя общий набор консервативных остатков, формирующих ядро фолдинга (фолдон).

Это предположение было подтверждено Шахновичем и Птицыным путём сравнения определённого расчётным путём ядра фолдинга с наиболее консервативными неполярными остатками для большого числа последовательностей (Shakhnovich et al 1996). Авторы пришли к заключению, что ядро фолдинга состоит из

наиболее консервативных нефункциональных (то есть не вовлечённых в формирование активных центров) остатков. Это даёт возможность предсказать ядро сворачивания из анализа больших белковых семейств с сильно различающимися последовательностями (Ptitsyn 1998).

II.6.1.4 Сворачивание с образованием кинетических интермедиатов

Фолдинг больших белков (начиная приблизительно со 100 остатков) идёт через образование кинетических интермедиата (интермедиатов) (Santucci et al. 2004, Птицын 1998). Фолдинг больших мультидоменных белков может протекать в несколько дискретных этапов в зависимости от числа доменов. Существование кинетических интермедиатов фолдинга, обладающих нативоподобной вторичной структурой и топологией молекулы, но не имеющих жёстких третичных взаимодействий было предсказано Птицыным ещё в 1973г. (Птицын 1973). В настоящее время существование таких интермедиатов, названных состоянием расплавленной глобулы, продемонстрировано экспериментально для значительного числа белков (Dey et al. 2012, Sasha et al. 2012, см. также Santucci et al. 2004, Бычкова и Птицын 1993 и ссылки в этих работах).

Состояние расплавленной глобулы может быть получено также и в равновесных условиях. Многие белки удовлетворяют основным критериям состояния расплавленной глобулы находясь в умеренно денатурирующих условиях (Бычкова и Птицын 1993).

Основные свойства состояния расплавленной глобулы таковы (Santucci et al. 2004, Птицын 1998, Бычкова и Птицын 1993):

- 1) Компактность. Эффективный гидродинамический радиус меньше, чем у неупорядоченного клубка и лишь немного больше, чем для нативной структуры
- 2) Существование ядра. Участок с жёсткой структурой, стабилизированной нативными контактами, который является ядром фолдинга (см. выше)
- 3) Содержание вторичной структуры, близкой к нативной.
- 4) Топология молекулы (взаимное расположение элементов вторичной структуры) сходная с нативной.
- 5) Отсутствие жёсткой третичной структуры. Неопределённость положения атомов и подвижность участков цепи друг относительно друга. В следствие этой

особенности белок в состоянии расплавленной глобулы значительно более подвержен протеолитическому расщеплению.

6) Отсутствие биологической активности.

7) Доступные для растворителя неполярные кластеры. Как следствие повышенная склонность к агрегации.

Схематически различие расплавленной глобулы и нативной структуры белка изображено на (Рис. 5).

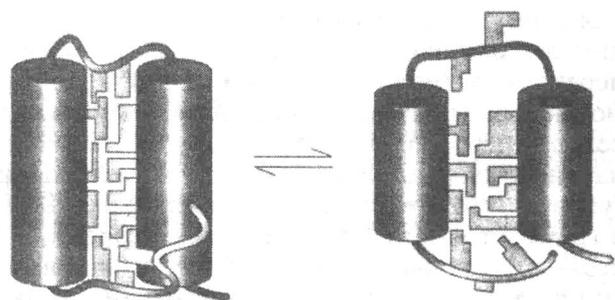


Рис.5. Сопоставление моделей двух состояний белковой молекулы: нативного (слева) и состояния расплавленной глобулы (справа). Состояние расплавленной глобулы отличается от нативного в основном менее плотной упаковкой боковых групп внутри молекулы и частичным разворачиванием петель и концов белковой цепочки. Рис. из работы (Птицын 1998)

Предполагают, что состояние расплавленной глобулы может реализовываться *in vivo* не только на этапе фолдинга белка и играет существенную роль в таких процессах как транслокация белков через мембраны, взаимодействие белков с мембранами, связывание и освобождение лигандов, олигомеризация белков и т.д. (см. обзор Santucci et al. 2004).

От состояний неупорядоченного клубка и нативного состояние расплавленной глобулы отделено переходами типа «всё-или-ничего» (Ptitsyn and Uversky 1996, Бычкова и Птицын 1993, Santucci et al. 2004 и ссылки в этой работе).

Обязательные шаги на пути сворачивания белка, такие как формирование вторичной структуры, коллапсирование в глобулярную структуру, упаковка боковых групп не являются, по-видимому, медленными процессами (Птицын 1998) и не могут служить причиной высоких барьеров, замедляющих сворачивание белков до обычно

наблюдаемых времён порядка секунд.

Появление второго (между состояниями расплавленной глобулы и нативной структурой) кинетического барьера часто определяется некоторыми второстепенными эффектами, такими как изомеризация пролиновых остатков, ненативное лигандирование и т.д.

Таким образом, существуют, по-видимому, два барьера (Sosnick et al. 1994, Птицын 1998) :

- (1) Барьер сворачивания (БС) между развёрнутым и промежуточным состояниями и (2) Барьер улучшения (БУ) между промежуточным состоянием и нативной структурой.

Перед формированием расплавленной глобулы образуется так называемое «состояние - предшественник расплавленной глобулы». Эта стадия с характерным временем жизни порядка миллисекунд заключается в частичном формировании вторичной структуры и частичном коллапсе белковой цепи без образования относительно стабильных деталей вторичной структуры.

Схематически последовательность процесса сворачивания белка проиллюстрирован диаграммой (Рис.6)

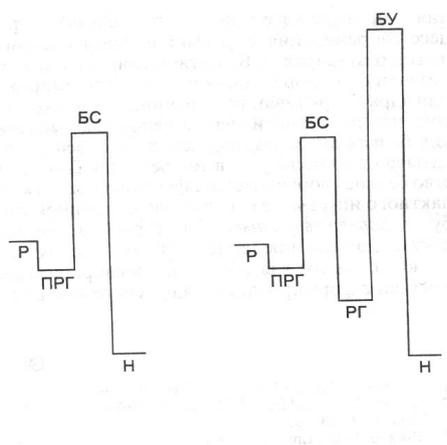


Рис. 6. Гипотетическая роль состояния предшественника расплавленной глобулы (ПРГ) и расплавленной глобулы (РГ) в сворачивании белка. Р – развёрнутое состояние, БС – барьер сворачивания, БУ – барьер улучшения. Рис. из работы (Птицын 1998)

II.6.2 Формирование структуры coiled coil

Суперспиральная структура coiled coil белков была предсказана в 1953 году Полингом и Кори и независимо от них Криком (см. обзор Лондер с соавт. 1999) как главный структурный элемент большого класса фибриллярных белков, таких как кератин, миозин и фибриноген. Однако, лишь с 1988 года, когда были охарактеризованы белки, относящиеся к классу транскрипционных факторов и содержащие так называемый лейциновый zipper, началось активное исследование этого структурного мотива. В последнее время опубликовано несколько обзоров, посвящённых структуре coiled coil и её биологическим функциям (Pechar and Pola 2012, Sutherland et al. 2012, Apostolovic et al. 2010, Лондер с соавт. 1999, Lupas 19967

II.6.2.1 Основные принципы структуры coiled coil

В структурном плане coiled coil представляет собой суперспираль, образованную двумя, тремя или четырьмя и даже пятью спиральями (Лондер с соавт. 1999). Спирали могут быть упакованы в одном (параллельный coiled coil) или в противоположных направлениях (антипараллельный coiled coil). Регулярное строение coiled coil требует периодичности в упаковке боковых цепей остатков аминокислот в ядре протяженной структуры. Однако такая регулярность невозможна без искажений канонической α -спирали, где на один оборот приходится 3,6 аминокислотных остатка. В структуре coiled coil α -спираль деформируется таким образом, что число остатков на виток уменьшается до 3,5 и положения боковых цепей повторяются через два оборота (см. Рис. 3). Обычно последовательность аминокислот суперспиральных белков имеет гептадную периодичность. В каждой гептаде в первой и четвертой позициях находятся гидрофобные остатки, боковые группы которых обеспечивают межспиральные взаимодействия и формируют гидрофобное ядро (кор) суперспирали. Если позиции аминокислот в гептаде обозначить соответственно как (a, b, c, d, e, f, g)_n, то гидрофобные остатки занимают положения a и d, а в положениях b, c, e, f, g обычно находятся гидрофильные остатки, образующие экспонированную в растворитель внешнюю поверхность coiled coil (Рис. 3). Расстояние полного оборота суперспирали называется шагом, а угол между α -спиралью и осью coiled coil называется шаговым углом (Лондер с соавт. 1999).

Главным признаком структуры coiled coil является характерная упаковка боковых цепей аминокислот в коре суперспирали, называемая выступ-в-выемку (knobs-into-holes), которая была впервые предложена Криком (Crick 1953). Остаток одной α -

спирали (выступ) окружен четырьмя боковыми цепями остатков встречной α -спирали (выемка).

Интерес представляет также минимальная длина полипептида, способного формировать стабильный coiled coil. В работе (Fairman et al 1995) были изучены полипептиды различной длины (21, 28 и 35 аминокислот), полученные на основе последовательности Lac-репрессора. Оказалось, что даже самый короткий полипептид, состоящий всего из трех гетпад, способен формировать стабильный тетрамер. При этом с увеличением длины полипептида стабильность структуры существенно возрастала. В работе (Lumb et al. 1994) показано, что пептид, соответствующий остаткам 8-30 лейцинового zipper GCN4, формировал стабильный параллельный димер, а пептид такой же длины, соответствующий остаткам 11-33, даже при 0°C находился в неупорядоченном состоянии. Эти данные позволяют предположить, что минимальная длина пептида, способного образовывать стабильную суперспираль, сильно зависит от его последовательности, но в любом случае длина стабильной структуры coiled coil, по-видимому, не может быть менее 3 гетпад.

II. 6.2.2 Олигомерность coiled coil

Число спиралей в coiled coil определяется в первую очередь характером упаковки аминокислотных остатков в гидрофобном коре суперспирали (поверхность, по которой взаимодействуют отдельные α -спирали). Дело в том, что остатки в положениях a и d имеют различную геометрию по отношению к остову встречной спирали в ди-, три- и тетрамерном coiled coil, поэтому для каждого типа спирали существуют различные предпочтения в типах боковых цепей. В димерном coiled coil C_{α} - C_{β} связь остатка, находящегося в коре, параллельна C_{α} - C_{α} -вектору, образующему дно встречной выемки, в положении a и перпендикулярна в положении d. В тримерном coiled coil оба положения a и d имеют остроугольную геометрию. В тетрамерном coiled coil эта связь перпендикулярна в положении a и параллельна в положении d. Поэтому олигомерность coiled coil определяется геометрией боковых цепей остатков, находящихся в позициях a и d. Так, например, обнаружено, что при параллельной ориентации векторов C_{α} - C_{β} более предпочтительным является изолейцин, при остроугольной - лейцин, а при перпендикулярной предпочтительнее лейцин и менее всего подходит изолейцин (Лондер с соавт 1999 и ссылки в этой работе). В работе (Harbury et al. 1993) на основании анализа олигомерности ряда пептидов на основе

лейцинового zipperа, но с различными аминокислотными остатками в позициях a и d были сформулированы правила олигомерности coiled coil. Положение остатков лейцина в позициях d и β -разветвленных остатков (изолейцин или валин) в позициях a способствуют образованию димеров (по соображениям упаковки). Остатки лейцина в позициях d и аспарагина в a также благоприятствуют димерам, но из-за формирования в гидрофобном коре сети водородных связей. β -Разветвленные остатки в позициях d или a дестабилизируют соответственно димеры и тетрамеры, а находясь в обеих позициях они благоприятствуют формированию тримера..

II.6.2.3 Ориентация цепей в структуре coiled coil

При конструировании набора синтетических пептидов было установлено, что ориентация цепей (параллельная или антипараллельная) определяется преимущественно полярными и ионными взаимодействиями, возникающими между фланкирующими гидрофобное ядро остатками (Monera et al. 1994, Myzaska et al. 1994, Лондер с соавт. 1999) Большая часть таких взаимодействий осуществляется между остатками в позициях g одной гептады и e следующей гептады.

В природных белках участки coiled coil обычно фланкированы глобулярными доменами или входят в состав крупных структурных доменов (Лондер с соавт 1999). В этих случаях ориентация цепей coiled coil может определяться факторами, связанными со взаимодействиями в остальной части молекулы.

6.2.4 Нарушения периодичности.

Практически все фибриллярные α -спиральные coiled-coil белки, за исключением тропомиозина, имеют нарушения гептадной периодичности. Принципиально возможны 6 способов нарушения фазы гептадных повторов, когда отсутствует 1,2,3,4,5 или 6 остатков в одном из повторов (следует отметить, что это эквивалентно вставке 7-н остатков) (Лондер с соавт 1999).

Функциональная роль нарушений периодичности может быть связана с локальной дестабилизацией coiled-coil. Возможно, что такие нарушения периодичности способствуют правильной укладке длинных участков α -спиралей в coiled-coil без сдвига.

Функции многих coiled coil in vivo, в отличие от тропомиозина, связаны с объединением в высокоупорядоченные филаменты, состоящие из большого числа молекул. Консервативные нарушения периодичности могут, вероятно, сглаживать искажения молекул, возникающие при образовании таких структур, а, может быть, и направлять их сборку (Pechar and Pola 2012, Sutherland et al. 2012, Apostolovic et al. 2010, Лондер с соавт, 1999).

6.2.5 Механизмы фолдинга и олигомеризации coiled coil.

К настоящему времени известно сравнительно мало работ, касающихся непосредственно процесса фолдинга структур coiled coil (см. обзоры Robson et al. 2010, Лондер с соавт 1999). Ряд выводов сделан на основе данных по разворачиванию (денатурации) структур coiled coil in vitro. Показано, что фолдинг in vitro подобных лейциновому zipperу GCN4 coiled coil белков протекает как бимолекулярная реакция в одну стадию, т.е. процессы олигомеризации и собственно фолдинга не разделены во времени (Wendt et al. 1996, Jelesarov et al. 1997, см. также ссылки в обзоре Лондер с соавт 1999). Скорость такой реакции лимитируется диффузией (Wendt et al. 1996). Однако в нескольких исследованиях обсуждается двухстадийная кинетика фолдинга и олигомеризации производных лейцинового zipperа (Wendt et al. 1994a,b) Первая стадия - быстрая является концентрационно-зависимой и, по-видимому, соответствует ассоциации полипептидных цепей. Вторая стадия протекает медленно, причем скорость не зависит от концентрации. На этой стадии предположительно происходит конформационная реорганизация образовавшегося в быстрой реакции протимера.

Термоденатурация и рефолдинг протяженных coiled coil белков, таких как миозины и тропомиозины, также обнаруживают двухстадийную кинетику фолдинга/олигомеризации. Так, фолдинг -тропомиозина характеризуется первой быстрой стадией (быстрее, чем 40 мс) и второй, более медленной стадией ($t_{1/2} = 1,67$ с) (Mo et al. 1992, Mo and Holtzer 1991) Эксперименты с модельным пептидом, соответствующим N-концевому домену -тропомиозина, показали, что при фолдинге/олигомеризации нарастание содержания -спиралей опережает формирование coiled coil структуры (Greenfield and Hitchcock-DeGregori 1993).

II.7. Особенности олигомеризации и фолдинга фибритина фага T4

II.7.1 С-концевой домен (фолдон) и инициация фолдинга фибритина

Существенная роль С-концевого домена в фолдинге фибритина стала очевидной при первых же попытках экспрессии мутантных вариантов pg was с делециями, затрагивающими последние 30 а.к. (Efimov et al. 1994). Делеция последних 18 аминокислотных остатков приводила к нарушению фолдинга фибритина в условиях суперэкспрессии в *E.coli*. В то же время полноразмерный фибритин, равно как и его N-делетированные мутанты не только экспрессировались в нативном состоянии, но и легко спонтанно денатурировали после термической денатурации в течение нескольких минут (Efimov et al 1994). Интересной особенностью этого белка также является способность сохранять тримерную структуру в присутствии ДСН и в условиях ДСН-ПААГ электрофореза белков, если образцы не были подвергнуты нагреванию перед нанесением на гель. В таких негретых образцах можно наблюдать образование высоко идущей полосы олигомерного (тримерного) белка. Эти особенности фибритина позволили получить первые доказательства его тримерной организации путём отжига N-делетированного белка и его полноразмерного варианта *in vitro*. В результате ДСН-ПААГ разделения полученных гетероолигомеров образуются 4 полосы, соответствующие 2 типам гомотримеров и двум типам гетеротримеров, предсказываемых моделью тримерной структуры белка.

Полученные данные позволили сформулировать предположение о том, что фолдинг фибритина инициируется тримеризацией С-концевого домена (Efimov et al. 1994), который был назван «фолдоном». Однако, до начала нашей работы это предположение не имело чёткого экспериментального подтверждения. Более того, В.В. Месянжиновым активно разрабатывалась модель инициации фолдинга фибритина за счёт самопроизвольной тримеризации coiled coil участков с последующей стабилизацией образующейся структуры фолдоном (В.В. Месянжинов. личное сообщение). Преимущество этой модели состояло в том, что она допускала возможность ко-трансляционной олигомеризации белка, исключая таким образом необходимость существования относительно стабильного мономерного интермедиата фолдинга. Существование такого интермедиата требует, чтобы полипептидная цепь фибритина была способна принимать некоторую конформацию, по свойствам сходную с обсужденной выше расплавленной глобулой, но, в отличие от последней, не

имеющую вторичной структуры и топологии, близкой нативной конформации (поскольку изолированная полипептидная цепь не может поддерживать жесткую фибриллярную конформацию). Такой интермедиат должен, очевидно, иметь возможность перестраиваться из глобулярной мономерной в фибриллярную тримерную структуру непосредственно в процессе фолдинга.

Однако, в результате наших экспериментов (см. раздел результаты и обсуждение) было показано, что исходное предположение было верным и тримеризация фибритина инициируется фолдоном и происходит пост-трансляционно.

Небольшие размеры структурированной части (27 а.к.) и простой фолд делают фолдон фибритина бактериофага T4 исключительно удобным объектом для изучения закономерностей фолдинга. Большинство предыдущих исследований фолдинга тримерных белков были выполнены на крупных фибриллярных белках, обладающих крайне медленной и сложной кинетикой фолдинга, зачастую сопровождающегося необратимыми реакциями агрегации (Seckler 2000).

Фолдон фибритина бактериофага T4 представляет собой тримерный бета-пропеллер, собранный из мономерных бета-шпилек (Рис. 7)

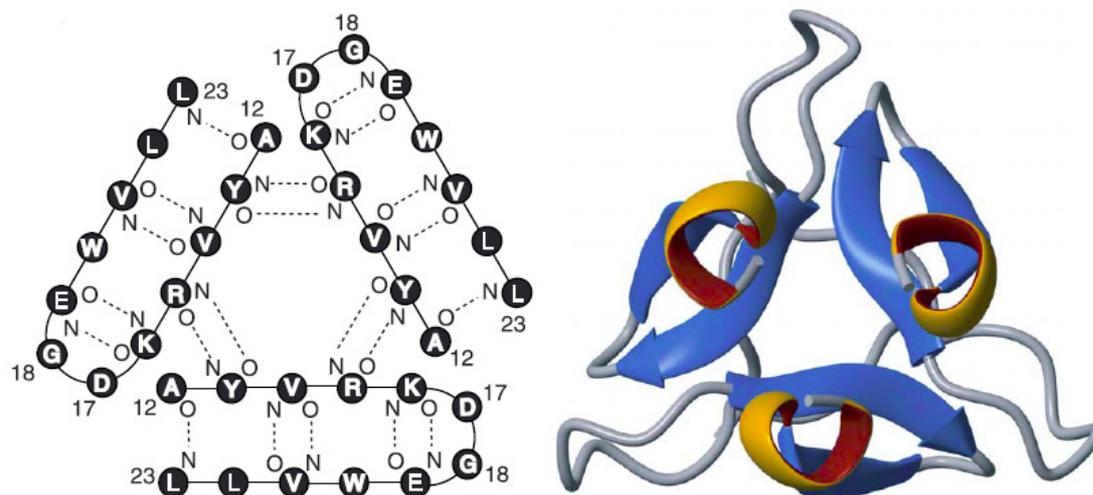


Рис. 7. Структура фолдона фибритина бактериофага T4. Слева – схема внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий. Справа – модель четвертичной структуры (из работы Meier et al., 2004).

Тример стабилизируется за счет гидрофобных взаимодействий между Trp476 (по нумерации с начала фолдона Trp20 (W20)) каждой субъединицы, межмолекулярных солевых мостиков между Glu461 (E5) и Arg471 (R15), а также межмолекулярных водородных связей между Tyr469(Y13) и Arg471(R15) (Tao et al. 1997, Strelkov et al, 1998)

К настоящему моменту для фолдона фибритина фага Т4 детально охарактеризованы физико-химические и кинетические характеристики равновесия «мономер-тример», а также исследован процесс термоденатурации его мономерной формы, полученной при низких значениях рН. Кроме того, методами ядерного магнитного резонанса выявлены практически все диполь-дипольные взаимодействия в данном белке (Meier et al. 2004). Таким образом, несмотря на некоторые остающиеся неразрешенные вопросы, фолдон фибритина можно считать одним из наиболее подробно изученных олигомерных белков.

III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

III.1 Плазмиды, штаммы бактерий и бактериофагов и их культивирование.

В работе использовались следующие плазмиды:

Векторы для клонирования и экспрессии:

pET-23d(+), pET-19b (Novagen, США)

Плазмиды с фрагментами ДНК бактериофага T4 из коллекции лаборатории:

pZWR - вектор pTZ-19R, в который по сайтам HindIII и EcoRI был проклонирован фрагмент генома бактериофага T4, включающий часть гена 12, ген was и большую часть гена 13.

pFbrB, pFbrB1 и pFbrE – вектор pET-19b, в который по сайтам NcoI и BamHI были проклонированы фрагменты ДНК, кодирующие фибритины В, Е соответственно.

Плазмиды pZ1-Leu, pZ1-Ser, pZ1Ter, кодирующие мутантные формы фибритина с заменами остатка Trp476 на Leu, Ser и стоп кодон соответственно (Шнейдер 1997), а также плазида pWas C1, с делецией последних 18 С- концевых остатков (Efimov et al. 1994).

В работе использовали ряд стандартных лабораторных штаммов E.coli (Табл. 2)

Штамм E.coli	Источник	Генотип	Для каких целей использовали
C600	Ferment as, Литва	<i>F-, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, lambda-</i>	в качестве хозяев для культивирования бактериофагов
NM52 2		<i>F' proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i>	
Be/1	Коллекция лаборатории	wt, T1 resistant	для культивирования фагов, имеющих am мутации
CR63		am-sup (Ser)	

Штамм E.coli	Источник	Генотип	Для каких целей использовали
DH5α		<i>F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ-</i>	для клонирования и выделения плазмид
BL21(DE3)	Novagen, США	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	для экспрессии рекомбинантных белков
JM109 (DE3)		<i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) λ(DE3)</i>	для клонирования и скрининга клонов по экспрессии белка под контролем промотора T7

Кроме этого использовались полевые изоляты колиформных бактерий, полученные в ходе работы.

Для культивирования фага Aeh I использовали штамм *Aeromonas hydrophila* HER 1209, полученный вместе с фагом из d'Herrelle reference centre (Канада).

В работе использовали штаммы бактериофагов T4Д (из коллекции нашей лаборатории), колифаги Tu1a, RB6, RB11, RB16, RB17, RB18, RB27, RB33, RB43, RB49, из коллекции лаборатории Н.М. Krisch (LMGM CNRS, Франция), а также мутанты T4Д 12am13am и T4Д wasΔ, любезно предоставленные проф. В.В. Месянжиновым.

Использовались также фаги *Enterobacter cloacae*

phage 1; *Aeromonas salmonicida* 44RR2.8t и 65; *Aeromonas hydrophila* фаг Aeh1; *Burkholderia cepacia* фаг PC42; *Vibrio natriegens* фаг nt-1 and *Vibrio parahaemolyticus* фаги KVP20 and KVP40. Все эти вирусы имелись в коллекции Н.М. Krisch.

Для культивирования бактерий применяли среду LB, содержащую 10г триптона, 5 г дрожжевого экстракта и 5 г NaCl, дистиллированная вода - до 1 л. Для получения твердых сред добавляли 15 г/л бакто-агара (Difco)

Для культивирования фагов методом двойного слоя (по Грациа) использовали мягкий (верхний) агар того же состава, содержащий 6 г. бакто-агара на 1л. Для культивирования фага T4 и его мутантов на чашках применяли также верхний и нижний агар Херши (Carlson and Miller 1994) в котором вместо пептона применяли триптон.

Для кратковременного хранения бактериальных культур использовали чашки Петри с LB-агаром, которые хранили при 4°C. Для длительного хранения при - 70°C в жидкую среду с бактериальной культурой добавляли глицерин до конечной концентрации 15% (по объему).

III.2 Выделение бактериофагов и колиформных бактерий

Для выделения колифагов образец фекалий лошади измельчали и отбирали среднюю пробу массой 20 г. Эту пробу суспензировали в 80 мл фагового буфера (0.2 М NaCl, 0.1 г/л азида натрия, 1 г/л Tween 20). Затем суспензия перемешивалась на роторной качалке 1 ч при комнатной температуре, после чего аликвоты были центрифугировали в течение 2 мин на микроцентрифуге при 13000 об/мин. Супернатант высевали на газон индикаторных штаммов непосредственно и в различных разведениях.

Для подсчёта и выделения колиформных бактерий пробы фекалий лошадей отбирали немедленно после дефекации в стерильные контейнеры и транспортировали в лабораторию в течение не более 3ч. Материал хранили при +4 °С и обрабатывали в тот же день. Часть образца замораживали при температуре -70°C и сохраняли при этой температуре для последующих исследований. Для выделения колиформных бактерий к навеске фекалий массой 15-20г добавляли физиологический раствор в соотношении 1:4. Для суспензирования образцы инкубировали при комнатной температуре и постоянном перемешивании на качающейся платформе в течение 30 минут.

Приготовляли разведения суспензии 1:100 и 1:1000 в стерильном физиологическом растворе и высевали по 50 мкл на селективную для энтеробактерий

среду LTA, содержащую триптозы - 20 г., лактозы 5 г., NaCl 5 г., K₂HPO₄ 2,75 г., ДСН - 0,1 г., дистиллированной воды - до 1 л. .

По 10 выросших колоний аутоштаммов E. coli из 3-х разных образцов перекальвали на чашки со средой LB.

Посевы инкубировали при 37°C в течение ночи и учитывали количество выросших колоний. Необходимую выборку колоний переносили с помощью зубочисток на чашку со средой Эндо и инкубировали в течение ночи в тех же условиях. Далее аутоштаммы перекальвали на хромогенный агар для колиформных бактерий (HiCrome Coliform Agar w/SLS, "Himedia"). Данная среда является селективной, используется для одновременного обнаружения Escherichia coli и общего числа колиформных бактерий (рис. 1)

Для определения изолятов до вида использовали метод MALDI-TOF масс-спектрометрии тотальных клеточных лизатов на приборе Microflex Biotyper (Bruker - Daltonics, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

III.3 Создание библиотек случайных клонов геномов бактериофагов, клонирование и выделение плазмидной ДНК

Для получения случайных клонов ДНК бактериофагов, гидролизовали эндонуклеазами рестрикции, образующими тупые концы: DraI, EcoRV, HaeIII, SspI, осаждали этанолом, после чего ресуспензировали в деионизованной воде, трансферировали с целью добавления остатков А на 3' концы и клонировали в плазмидный вектор T-system PCR cloning kit (Promega, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Для создания экспрессионных плазмидных векторов применяли два различных подхода: в первом случае ген соответствующего белка амплифицировали ПЦР вместе с природным сайтом инициации трансляции и клонировали в вектор pGEM-T в соответствии с инструкциями производителя, после чего отбирали клоны с нужной ориентацией вставки, позволяющей производить экспрессию с промотора РНК полимеразы фага T7, имеющегося в этом векторе. Во втором случае нужный ген

амплифицировали с праймерами, содержащими сайты выбранных рестриктаз, после чего клонирование проводилось по этим сайтам в соответствующие плазмидные векторы как это описано в руководстве (Sambrook et al. 2000).

III.4 ПЦР, олигонуклеотидные праймеры и секвенирование.

Для создания различных делеционных и мутантных вариантов фибритина фага T4 были использованы следующие праймеры: Пр I (5'-GGTTCTTTGACCATGGGAAGTT), содержащий сайт NcoI - в качестве 5'- праймера для фибритина В и белков на его основе, Пр II (5'- GCTGGATCCCAACAGTACCAATT), содержащий сайт BamHI, как 3'- праймер для фибритина NB1, Пр V (5'- TGCGGATC CATGTTATGCTGGTGATAAANNGGTAGAAAGTAATACNNNTTCGCCATCTNNBNNА ССВNN, где В= С,G или Т), содержащий сайт BamHI - для мутагенеза выбранных аминокислотных остатков С-концевого домена, Пр. IX (5'-GAAACACGTCCATGGAAC), содержащий сайт NcoI и Пр. X (5'-AGGAATTCAACCGGCTTCTTG), содержащий сайт EcoRI - для получения фибритина ХN и Пр.XI (5'- TCTGCCATGGGTCTTTGACCATTG AAGTTGGTCAT) - в качестве 5' - праймера для фибритина В1.

Для амплификации фрагмента между генами 10 и 13 у различных бактериофагов, родственных T-чётным, использовали универсальные праймеры: AL10d (5'- CCTCACAIACCGCAGGTGG-) и AL13r (5'-AGAAAGTCIGTIAACCACGGATA). С помощью этих праймеров были получены фрагменты (4,5 т.п.н.) для фагов RB42 ^ RB43, RB49 и T4, используемого в качестве контроля. Использовали также усовершенствованные универсальные праймеры Tев-10d (5'-TTTGTCTG(T/C)TGGATAAGG(A/G)T(A/T)G) и Tев-13r (5'-СТАGGGCACGCTGNАТАСААТС(G/A)ТА).

Для амплификации соответствующего фрагмента фага РС42 использовали специфические праймеры 42-11d (5'-ТТТАСТАGТGТCGAAGCTCC) и 42-13R (5'-ТСТАGGGACCGCTGTATA).

Для амплификации фрагмента от гена 10 до гена 18 фага Aeh1 мы использовали праймеры A10d (5'-ААТТCGАТССAGACGATCAG) и A18R (5'-GATATAGAGCAGAGGAGTTAC). Эти праймеры были синтезированы по последовательностям, полученным в результате секвенирования случайных геномных клонов AehI.

Амплификация с использованием этих праймеров дала фрагмент длиной в 14 т.п.н. Мы гидролизовали этот фрагмент рестриктазой HindIII и лигировали с ДНК

вектора pBluescript SK(+) гидролизованной тем же ферментом. Используя лигазную смесь в качестве матрицы, мы получили ПЦР-фрагмент с праймерами A10d и стандартным M13R, который имел длину в 8 т.п.н. Этот фрагмент был частично секвенирован с праймера M13R и полученная последовательность была использована для синтеза праймера AN3R (5'-TAAAGGTGTCCGTCTGGATA), который был использован в паре с праймером A10d для получения 8 т.п.н. фрагмента генома фага AehI, который был в дальнейшем секвенирован методом праймерной прогулки. .

Для амплификации и клонирования гена *wac* фага RB49 использовали праймеры Wstart-NcoI (5'-GGGTGCGCC**CCATGGT**TGAACAATTAACATCC) и WBamHI-rev (5'-TCTTGG**GATCCT**GGTTACTATCCTGCA). Соответствующие рестрикционные сайты выделены жирным шрифтом. Для получения C-делетированного варианта RB49 пг *wac* (RBW-N), использовали праймеры Wstart-NcoI и F-stop-W, содержащий сайт BamHI (5'-CTCAAG**GGATCCT**CAAATATCTGCGGTATTTTAAATGC). Для получения N – делетированного варианта этого гена (RBW-CE) применяли праймеры WBamHI-rev и WEdir, содержащий сайт NcoI (5'-CTCTAG**CCATGGG**TATTAAGTTGTAGAAAACACTC).

Для клонирования гена *wac* фага PC42 использовали праймеры PCW-NcoI (5'-GGGTT**CAGCCATGG**AAATTCTTCCATTTGTAAATAGC) и PCW-BamHI (5'-ACCTCGAT**GGATCC**GAAGGCCCTAA-3).

Для амплификации, клонирования и секвенирования гена 36 фага T4 использовали праймеры T436NcoD (5'-AAGGGGCATACCATGGCTGA) и T436BamR(CAT**GGATCCT**CTTAATAATAG CCGA).

Для введения амбер мутации *amS197* в ген 36 фага T4, использовали праймеры T436CamD (5'-ATCCTGCATAGCAACCCTCACA) и T436CamR (5'-GAGGGTTGCTATGCAGGATTCT).

Для ПЦР-амплификации и секвенирования случайных клонов из плазмидной библиотеки нами применялись стандартные праймеры M13F и Sp6 (Fermentas, Литва). Для обнаружения бактериофагов, родственных T4 мы применяли вырожденные олигонуклеотидные праймеры к гену 23, MZIA1bis (5'-GAT ATT TGI GGI GTT CAG CCI ATG A) и MZIA6 (5'-CGC GGT TGA TTT CCA GCA TGA TTT C). Ген *wac* фага JS98C3 амплифицировали и секвенировали с использованием олигонуклеотидов JST12up (5'-AGT TAC CAT (T\A)(T\C)G TTG A(C\T)G GC), JS13lo (5'-ATA AAA AGC CTG ATA ACC TTT), JS98_ *wac*M (5'-AAC CGA GTT GAT ATT CTG G) и jsNdlo (5' -TTT TTT CCA TGG TTA AGT GTC ATC AAG GAT TTC AGC CC). Для амплификации и секвенирования гена 36 использовали

олигонуклеотиды JS98_35up (5'-GAA TTT GG(T/C) GT(A/C) AAT GGT ATT CG) и JS98_g37lo (5'-ТСТ ТТТ ААГ ТТА АТА GCC AG(C/T) TC(G/A) CCT TC(A/G) GC). Фрагменты С-концевого домена фибритина фага JS98C3 амплифицировали при помощи олигонуклеотидов js_Cd1up (5' -ТТТ ТТТ ССА TGG GTC AAA TGC СТА СТА ААТ TGG G), js_Cd2up (5' -ТТТ ТТТ ССА TGG GTA CAG AAA TTG АТА CGG TC) и jsCdlo (5' -ТТТ ТТТ CTC GAG GCC СТТ TTG ТТА TGG TGC TGG G).

ПЦР-амплификацию производили по стандартным протоколам, адаптированным в каждом случае. Использовали термостабильные полимеразы Taq и Pfu различных производителей, а также набор Long PCR kit (Roche)

ПЦР-продукты анализировали путем электрофореза в агарозном геле в 1xTAE буфере с окрашиванием бромистым этидием [100]. Секвенирование ПЦР-продуктов и случайных клонов проводили на автоматических секвенаторах Avant 3150 (Applied Biosystems, США) и Seq2000XL (Beckman, США) с использованием реактивов фирм-производителей.

III.5. ПЦР-фингерпринтинг энтеробактерий

Для ПЦР-фингерпринтинга штаммов колиформных бактерий использовали праймеры: IS1tr (5'- ATC AGT AAG TTG GA(G/A) (T/G)CA TTA CC – 3') и TR8834 (5'- ATCGGCGATGCGTTGACGAAT), в процессе оптимизации этой системы также использовали праймеры IS2tr (5'- CAGATGTCTGGARATWYAGGGG-), IS3tr-L (5'- CCATATTACGTGGGTAG GATCA), IS3tr-R (5'- CCACTATTGCTGGGTAAGATCA), IS4tr (5'- TSCTTAACTGACTGGCATTA), IS5tr (5'- SSRCTTRTTCGCACCTTCC), IS30tr (5'- TGTTGCRTTGACMRATTGAATCTACA), TR8D (5'- ATGCAC GTCATACTCTTTTTT), TR8R (5'- AAGAGTATGACGTGCATCCTA)

Параметры программы для IS1-фингерпринтинга были следующими:

денатурация при 94°C – 30 сек., далее 30 циклов, включающих инкубацию при 94°C – 15 сек., 56°C – 30 сек. и 72°C – 45 сек., завершающая стадия проходила при 72°C – 2 мин.

BOX - фингерпринтинг осуществлялся как это описано авторами метода (Johnson et al. 2000) Для постановки реакции использовали праймер BOX A1R (5'- СТА CGG САА GGC GAC GCT GAC G – 3'). В остальном, реакционная смесь имела тот же состав, что и для IS1-ПЦР, однако программа амплификации существенно отличалась. Реакция начиналась с прогрева смеси при 95°C – 2 мин., далее 30 циклов инкубации при 94°C – 3

сек., 92°C – 30 сек., 50°C – 1 мин., 65°C – 8 мин., и завершающая стадия - 8 мин. при 65°C, полная программа в 30 циклов занимала около 7 часов. Детекцию результатов ПЦР проводили описанным выше стандартным способом.

Риботипирование аутоштаммов *E.coli* проводили для контроля разрешающей способности на этапе разработки метода IS1 фингерпринтинга. Гены 16S рРНК были амплифицированы с использованием универсальных для эубактерий праймеров 27F (5'-AGA GTT GAT CMT GGC TCA G -3') и 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3') [4]. Для гидролиза продуктов амплификации использовали рестриктазы Hind III и Hae III («Fermentas». Литва) Анализ результатов рестрикции методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Оценку чувствительности изолятов колиформных бактерий к фагам проводили двуслойным методом Грация на среде LB. В качестве верхнего агара использовали среду LB с 0.6% бакто-агара.

III.6 Электронная микроскопия.

Каплю фагового лизата наносили на медную сетку с формваровой подложкой, напыленной углеродом. После 5 мин инкубации при комнатной температуре каплю отбирали фильтровальной бумагой. Затем препарат контрастировали 1% уранилацетатом и исследовали при помощи электронного микроскопа Jeol 100S (Япония) при 25000 - 50 000х увеличении.

III.7. Экспрессия белков и анализ на растворимость

Клетки *E. coli* BL21 (DE3), трансформированные рекомбинантной плазмидой, высевали на чашки с агаром и подращивали при 37°C в течение ночи. Затем подращивали клетки в бульоне LB или в среде 2xYT, содержащей 20 г. триптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г. NaCl и дистиллированную воду до 1 л., с добавлением 100-200 мкг/мл ампициллина (при экспрессии в двухплазмидной системе фибритина фага AehI и соответствующего шаперона использовали также спектиномицин в концентрации 50 мкг/мл) при 37°C до достижения оптической плотности 0,5-0,8 (при длине волны 600 нм), после чего добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и

инкубировали 3-4 ч при 37°C или в течение ночи при 25°C. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин.

Для анализа экспрессируемого белка на растворимость осадок из 0,5-1,0 мл культуры клеток суспензировали в 100 мкл буфера DMM (0,6 г/л Na₂HPO₄, 0,3 г/л KH₂PO₄, 0,05 г/л NaCl, 0,1 г/л NH₄Cl, 20 mM MgSO₄, pH 7,5), содержащего 0,5 мг/мл лизоцима и 0,05 мг/мл ДНКазы I. После инкубации в течение 10 минут при комнатной температуре клетки лизировали трехкратным замораживанием в жидком азоте с последующим оттаиванием в водяной бане при 30°C. Лизат центрифугировали при 12000 об/мин в течение 3-4 минут. Супернатант, содержащий растворимые белки, переносили в чистую пробирку. Осадок промывали в 200 мкл буфера DMM и суспензировали в 100 мкл этого же буфера. Образцы смешивали с равным объемом двукратного буфера для образцов (0,125 M трис-HCl, pH 6,8, 4% DСН, 20% глицерин, 10% 2-меркаптоэтанол, 0,01% (масс./об.) бромфеноловый синий), прогревали в кипящей воде 3-5 минут и наносили в ячейки ПААГ с DСН.

Для препаративного выделения белка клетки собирали центрифугированием при 4000 g в течение 15 мин., суспензировали в 50 mM Трис HCL и разрушали ультразвуком на льду, как это описано в руководстве (Sambrook et al, 2000). Нуклеиновые кислоты осаждали стрептомицин-сульфатом. Для этого к лизату, активно перемешиваемому на магнитной мешалке, медленно добавляли 10% объёма 30% раствора стрептомицин-сульфата. Инкубировали на льду 30 мин., после чего осадок удаляли центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 10 мин.

Очистку фибритина фагов T4, JS98C3, RB49 и Aeh1 проводили дифференциальным высаливанием с последующей хроматографией на гидроксил-апатите, как это описано в работе (Efimov et al. 1994).

Варианты С-концевого домена пг was фага JS98C3 очищали при помощи аффинной хроматографии на колонке с Co-NTA смолой Talon (Clontech, США) в соответствии с инструкцией производителя. Предварительно очищенный высаливанием раствор целевого белка наносили на колонку с 1 мл смолы. После промывки 10 мл промывочного буфера (50 mM натриево-фосфатный буфер (pH 7.0), 500 mM NaCl, 10 mM имидазол), белок элюировали 2 мл буфера для элюции (pH 7.0), 300 mM NaCl, 250 mM имидазол). Затем раствор белка диализовали против 500 мл буфера для гидролиза тромбина (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) в течение ночи при 4°C.

После гидролиза тромбином, белки вновь диализовали против буфера для лизиса, затем проводили еще один цикл очистки на колонке с Co-NTA.

Степень очистки целевых оценивали при помощи ДСН-ПААГ электрофореза в 10% (пг was и его N-концевой домен) или 15% (варианты С-концевого домена) акриламидном геле по методике Лэмбли (Sambrook et al. 1989) с окраской Кумасси R-250, а также путем измерения соотношения оптической плотности раствора при длинах волн в 260 и 280 нм. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по методу Брэдфорда, с использованием набора реактивов BioRad (Bio-Rad, США), согласно инструкции фирмы-изготовителя.

III.8 Ограниченный протеолиз.

К белку в буфере 50 мМ трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ CaCl₂ добавляли трипсин (Serva, США) в различных соотношениях и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением ФМСФ до концентрации 2 мМ. Затем добавляли двукратный буфер для образцов, нагревали 3–5 мин в кипящей воде и наносили на ПААГ с ДСН.

III.9 Предсказание вторичной и третичной структуры белковых доменов.

Предсказанные аминокислотные последовательности мотивов пг was бактериофага JS98C3, гомологичных фолдону фибритина фага T4, а также данные, полученные в результате поиска их гомологов в GenBank (программа BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) анализировали при помощи программы Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). В качестве шаблона для построения моделей предполагаемых вторичных и третичных структур использовали модель фолдона фибритина бактериофага T4, депонированную в Protein Data Bank по результатам рентгеноструктурного анализа.

III.10 Получение мутантов фага T4 по гену 36

Для получения амбер-мутанта фага T4 amS197 N-концевая и С-концевая части гена были амплифицированы в независимых реакциях с использованием праймеров

T4g36CamR и T436NcoD для N-концевого фрагмента и праймеров T4g36CamD и T436BamR для C-концевого. ПЦР-фрагменты были очищены, смешаны в эквимольном соотношении и ре-амплифицированы 10 дополнительными циклами ПЦР с праймерами T436NcoD и T436BamR. Полученный фрагмент 0,67 т.п.н. был клонирован в вектор pGEM-T в соответствии с инструкциями производителя. Последовательность вставки была проверена секвенированием. Полученная плазмида была использована для трансформации *E.coli* Ve/1, и полученный штамм заражён фагом T4. Разведения полученного лизата были посеяны на газон штамма CR63. Индивидуальные бляшки были перенесены зубочистками на свежие газоны штаммов *E.coli* Ve/1 и CR63. Около 1% бляшек росли на амбер-супрессирующем штамме CR63 значительно лучше, чем на непермиссивном хозяине Ve/1. Эти фаги были очищены последовательным выделением отдельных бляшек и наличие мутации 36 amS197 было подтверждено секвенированием соответствующего участка генома. Доля спонтанных ревертантов в лизатах полученного фага T4g36amC1 составляла около 10^{-6} .

III.11 Тестирование ингибирующего действия ПЭГ на адсорбцию фага T4 и его мутантов.

Бульонную культуру *E.coli* Ve/1 выращивали в течение 2-3 ч. при активной аэрации до концентрации порядка $5 \cdot 10^7$ клеток/мл., после чего добавляли 30% раствор ПЭГ 6000 стерилизованный автоклавированием при 0,5 атм до конечной концентрации 5 или 6,4%. Культуру заражали фагом со множественностью 30-50 Б.О.Е. / мл. Инкубацию продолжали в тех же условиях до появления видимого лизиса культуры.

III.12. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Калориметрические измерения проводились В.Н. Орловым (Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ) на приборе ДАСМ-4 («Биоприбор», Пушкино) в платиновых ячейках объемом 0.47 мл со скоростью 1К/мин под давлением 2 атм. Перед измерениями препараты белков диализовали против 10 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,4. Результаты были скорректированы вычитанием данных, полученных на чистом буфере. Концентрация белков была в интервале от 0,2 до 2,0

мг/мл. При расчетах использовалось значение молекулярной массы мономеров фибритина В1 30 кДа

III.13 Солюбилизация тел включения и рефолдинг белка *in vitro*.

После разрушения экспрессирующих клеток ультразвуком тела включения осаждали низкоскоростным центрифугированием при 4000 об./мин в течение 20 мин. Тела включения дважды промывали 50 мМ Трис-НСl буфером с рН 7,6 и растворяли в минимальном объёме 8М раствора мочевины.

Рефолдинг белка *in vitro* ставили разбавляя раствор белка в мочеvine в 100 раз буфером следующего состава: 50мМ Трис НСl , рН 7,6, ЭДТА 20мМ, β-меркаптоэтанол 1% (по объёму) и ФМСФ 0,2 мМ (буфер готовили непосредственно перед употреблением) Через 48 часов инкубации при 4°C раствор сконцентрировали с помощью концентратора Centriprep cut off 30 KDa (Omicon, USA). И освобождали от взвешенных частиц центрифугированием при 14000 об/мин. В течение 10 мин.

IV. 14 Выделение и очистка некультивируемого вирусного сообщества фекалий.

Для экстракции вирусных частиц образец фекалий обрабатывали как и для культурального выделения бактериофагов (см. раздел III.3). Полученный осветленный экстракт очищали методом центрифугирования сквозь градиенте вязкости или гибридным градиентом вязкости-плотности. В первом случае на дно центрифужных пробирок наливали 3 мл 40% глицерина, приготовленного на SM буфере (50мМ Tris-НСl, рН 7,5; 10мМ MgSO₄; 0,6% NaCl), поверх наслаивали 3мл 5% глицерина на том же буфере и до 15мл экстракта, содержащего фаг. Пробирки центрифугировали при 23000 об/мин в течение часа в бакет-ротаторе. Над осадком фага оставляли 100мкл 40% глицерина, к которому последовательно добавляли по 100мкл SM буфера с промежутками в 15 мин. до объёма 500мкл . Осадок оставляли в под слоем буфера на 12 часов, после чего ресуспензировали и осветляли центрифугированием на настольной центрифуге Eppendorf 2мин при максимальных оборотах. Для гибридного градиента под слой 40% глицерина подслаивали 2мл. фреона 113, имеющего плотность 1,57 г/см³, что больше плавучей плотности бактериофагов. Вирусные частицы собирались в плёнке на поверхности раздела фаз фреон-вода. Перед ресуспензированием этой

плёнки необходимо удалить большую часть градиента, после чего медленно разбавить оставшийся над фреоном раствор глицерина и провести дополнительное центрифугирование при 20000 об/мин в течение 30 мин. 40% глицерин может быть заменён на 20% раствор фикола, обладающий меньшей осмотической активностью.

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

IV.1 Установление роли С-концевого домена фибритина фага Т4 в инициации фолдинга данного белка⁴.

IV.1.1. Исходные предпосылки и методический подход.

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 C-концевыми глобулярными доменами, имеющими протяжённость в 50 и 28 а.к. соответственно. Было также показано, что делеционный мутант, лишённый 18 C-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 C-концевого домена (фолдона) нуждалась в экспериментальном уточнении. В частности, были сформулированы 2 гипотезы:

1) Фолдон - это действительно домен иницирующий тримеризацию и последующий фолдинг фибриллярной части по принципу застёжки – молнии. В этом случае необходимо постулировать существование метастабильного мономерного интермедиата фолдинга фибритина, способного после тримеризации спонтанно перестраиваться из глобулярной в фибриллярную конформацию

2) Функция фолдона состоит в стабилизации структуры, формирование которой иницируется сегментами coiled coil. В этом случае возможна ко-трансляционная тримеризация и инициация фолдинга.

Поэтому задачи данного раздела работы состояли в дискриминации между этими двумя гипотезами и получении экспериментального доказательства той или иной роли C-концевого домена фибритина в тримеризации и фолдинге молекулы. Для решения этих задач мы применили методологию белковой инженерии. Основываясь на известных к началу работы свойствах фибритина и его N - делетированных

⁴ При написании данного раздела использованы материалы моей работы (Летаров 1999)

мутантов мы сконструировали ряд рекомбинантных белков. Схематически структура использованных в работе белков приведена на Рис. 8.

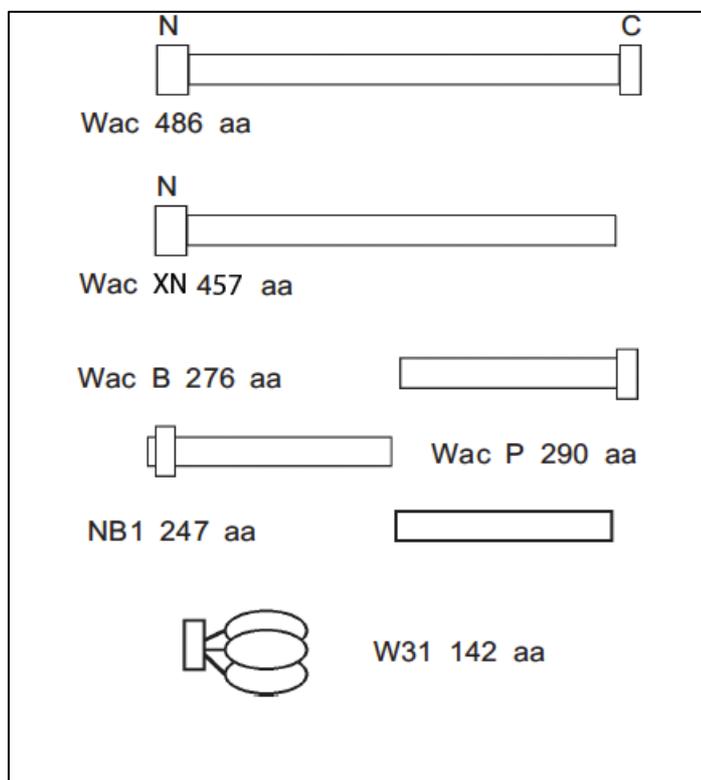


Рис. 8. Схематическая структура фибритина фага T4, его делеционных мутантов и химерного белка W31, использованных в данной работе. Белки Wac XN, NB1, W31, были сконструированы нами. Конструкции, экспрессирующие полноразмерный пг wac и Wac B получены из коллекции лаб. В.В. Месянжинова ИБХ РАН, плазмида, экспрессирующая Wac P любезно предоставлена Ю.Ю. Лондером

Свойства этих белков и их способность к автономной тримеризации с образованием ДСН - устойчивых олигомеров и к формированию компактной нативную структуру, свойственной для фибритина и некоторых его ранее изученных производных, были изучены нами экспериментально.

IV.1.2 Неспособность последовательности coiled coil участка фибритина инициировать тримеризацию и фолдинг.

IV.1.2.1 Получение и свойства белка NB1 - делеционного мутанта фибритина В, лишённого С-концевого домена.

Мы получили делеционный мутант фибритина В, полностью лишённый С-концевого домена. Для этого фрагмент, соответствующий области coiled coil фибритина В, амплифицировали с использованием праймеров I и II (раздел III.5) на матрице полноразмерного гена фибритина и клонировали по сайтам Nco I и BamH I в вектор рЕТ19. Граница суперспирального сегмента была установлена на основе данных рентгеноструктурного анализа по остатку Gly 456 последней α -спирали (Рис. 9).

Полученная таким образом плазида была названа рNB1, а кодируемый ею мутантный белок - NB1 (Рис. 8.)

Белок NB1, представляющий собой фибритин В, без С-концевого домена, нарабатывается в *E. coli* в количестве примерно до 30% от общего клеточного белка. При разрушении клеток замораживанием - оттаиванием около 2/3 всего количества белка обнаруживается в осадке.

После разрушения клеток ультразвуком и последующего центрифугирования этот белок полностью остается в супернатанте и высаливается при низкой концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - примерно 20% от насыщения. После высаливания белок NB1 легко растворяется в 50 мМ Трис НСl буфере, но при длительном хранении (при 4 °С) иногда частично агрегирует. При двукратном высаливании получается препарат, содержащий до 80% целевого белка, который использовался нами без дальнейшей очистки.

Белок NB1 прочно связывается с ГАП и не элюируется при концентрациях Na-фосфатного буфера до 500 мМ.

Подвижность белка NB1 в ДСН-ПААГ электрофорезе соответствует расчетной молекулярной массе (27 кДа). При ДСН-ПААГ электрофорезе непрогретого образца подвижность белка не отличается от таковой в денатурированном нагреванием образце (Рис.9, дорожки 3 и 4).

Фибритин NB1 оказался высокочувствителен к обработке трипсином. При концентрациях трипсина 0, 0125 мг/мл и выше (соотношение белок: фермент около

100:1) белок подвергается полному гидролизу в течение 30 мин. при 37 °С.

Фибритин дикого типа, а также его делеционные мутанты, содержащие интактную последовательность фолдона, способны быстро ренатурировать после денатурации нагреванием с восстановлением ДСН-устойчивого тримерного состояния (Efimov et al. 1994). Образцы белка NB1 были прогреты при 65°C и при 100°C в течение 3 мин. и затем охлаждены при 20°C в течение часа. После этого образцы были смешаны с ДСН-содержащим буфером и разделены на две аликвоты каждый. Одна из них была денатурирована нагреванием, вторая не прогревалась. Полученные таким образом образцы проанализировали электрофорезом в ДСН- ПААГ. Образования ДСН устойчивых олигомеров в данных условиях не происходило.

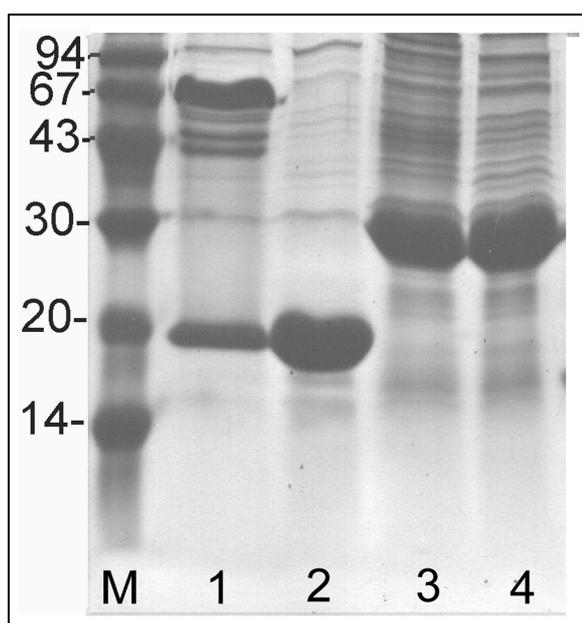


Рис. 9. Анализ электрофорезом в ДСН-ПААГ частично очищенных белков NB1 и W31. Дорожки 1 негретый образец W31; 2- образец W31, денатурированный нагреванием, дорожки 3 и 4 негретый и гретый образцы белка NB1 соответственно; М – маркер молекулярных весов.

Интересно, что при кипячении не происходило агрегации белка. Раствор оставался прозрачным и при центрифугировании при 14000 об/мин. в течение 10 мин. весь белок оставался в супернатанте.

В нашей лаборатории Ю. Лондером было показано, что фибритин, денатурированный нагреванием в присутствии ДСН, восстанавливает своё тримерное состояние при замораживании образца при -20°C (Лондер и Месянжинов 1999). Этот феномен назван им криорефолдингом. При замораживании денатурированных

образцов мутантных белков криорефолдинг не наблюдается.

Эти результаты свидетельствуют, что свойство фибритина В формировать ДСН-устойчивые тримеры связано с наличием функционально активного С-концевого домена.

IV.1.2.2 Неспособность ингибировать рефолдинг фибритина В

Так как белок NB1, неспособный к правильной тримеризации и фолдингу, может быть получен в стабильной растворимой форме, оказалось возможным исследовать его влияние на процесс ренатурации фибритина *in vitro* после денатурации нагреванием.

Для этого фибритин В смешивали с белком NB1 в массовом соотношении приблизительно 1:5 (в объёме 30 мкл) и нагревали при 100 °С в течение 3 мин. В контрольном опыте экстракт, содержащий мутантный белок, заменяли таким же количеством буфера. Затем пробирки охлаждали при комнатной температуре в течение 30 мин. После добавления буфера для образцов, содержащего ДСН, пробы подвергали электрофорезу в ДСН-ПААГ.

Так как структура NB1, возможно, соответствует структуре естественного интермедиата фолдинга фибритина В, то, чтобы не нарушать её, в другом эксперименте горячий раствор фибритина В добавляли к охлаждённым на льду экстрактам, содержащим мутантный белок.

Ни при каких условиях не происходило существенного ингибирования тримеризации фибритина В (Рис 10). Этот результат ясно указывает, что *in vitro* на первом этапе фолдинга фибритина взаимодействия участков полипептидной цепи, соответствующих области *coiled coil*, не происходит. Таким образом, первым этапом тримеризации и последующего фолдинга фибритина, по-видимому, должно являться взаимодействие С-концевых последовательностей.

Тот факт, что фибритин NB1 оказался растворимым, позволило охарактеризовать его свойства, свидетельствующие, что этот белок образует рыхлую структуру, в которой остатки лизина и аргинина в достаточной мере экспонированы, чтобы сделать белок чувствительным к расщеплению трипсином. По-видимому, часть гидрофобных остатков также экспонированы на поверхность, что вызывает способность белка к формированию лабильных агрегатов. Таким образом, в целом свойства фибритина NB1 напоминают постулированные свойства состояния расплавленной глобулы (см. раздел

II.6.1.4), за исключением, разумеется, соответствия общей топологии нативной структуре.

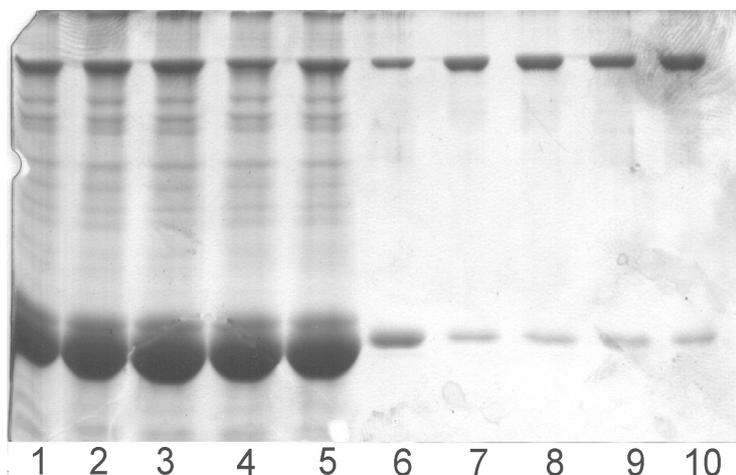


Рис. 10.. Ренатурация фибритина В в присутствии избытка фибритина NB1. Дорожки 1-5 соответствуют времени 1, 2, 3, 5 и 10 мин. с момента начала ренатурации, а дорожки 6-10 - аналогичные образцы, содержащие фибритин В (контроль).

IV.1.3 Доказательство способности С-концевого домена к независимой тримеризации.

IV.1.3.1 Получение химерного белка W31, содержащего фолдон фибритина и его свойства

Если сборка фибритина действительно инициируется тримеризацией С-концевого участка полипептидной цепи, то, вероятно, полипептид, соответствующий фолдону, должен быть способен к тримеризации и в отсутствие остальной части молекулы фибритина. Однако, получение такого пептида генно-инженерным путём и его последующее исследование затрудняется его малой молекулярной массой (около 3

КДа). Для демонстрации способности С-концевого домена фибритина к автономной олигомеризации мы сконструировали химерный белок W31. В этом белке последовательность фолдона располагается в N-концевой части полипептидной цепи, а после неё следует «нагрузочная» последовательность белка пг 31 бактериофага T4.

Таким образом, общая молекулярная масса конструкции составляет 17 КДа.

Плазмида pW31 была сконструирована следующим образом. Фрагмент ДНК,

содержащий последовательность гена 31, получали с помощью праймеров III и IV (раздел III.5) на матрице ДНК бактериофага T4. В качестве вектора клонирования для данного фрагмента использовали плазмиду pWAC P, созданную ранее в нашей лаборатории Ю. Лондером. Данная плазида содержит ген фибритина P - мутанта фибритина с фолдоном, перемещённым на N-конец белка. Фибритин P, в свою очередь, получен на основе фибритина B1, близкого к фибритину B (Рис. 8). Из плазмиды pWAC P был удален фрагмент Bam HI - EcoRI, кодирующий участок coiled coil фибритина P. Полученный линейризованный вектор лигировали с фрагментом ДНК, кодирующим пг31, предварительно обработанным теми же ферментами. В результате рамка считывания сохранялась и полученная конструкция кодирует гибридный полипептид, представляющий собой последовательность белка пг 31 (109 аминокислотных остатков), на N-конце которого находится последовательность из 36 остатков f-MQALQEAGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLSPA, соответствующая фолдону фибритина.

Этот белок экспрессируется примерно с той же эффективностью, что и NB1, и присутствует в растворимой форме.

Частичную очистку белка проводили двухкратным высаливанием, также, как это описано для белка NB1. Полученный таким образом препарат использовали без дальнейшей очистки.

Если электрофорез в ПААГ препарата белка проводили сразу после разрушения клеток, то в дорожке с непрогретым образцом практически не было заметно высоко идущей полосы, соответствующей тримерной форме. Однако, при хранении супернатанта при +4°C в течение суток (к супернатанту добавляли меркаптоэтанол - 1% по объёму и ФМСФ до концентрации 1 мМ) до 80% белка переходило в ДСН-устойчивую олигомерную форму (Рис. 9, дорожки 1 и 2). Необходимо отметить, что пг 31 фага T4, являющейся ко-шаперонином (Hunt et al. 1997), на основе которого был создан белок W31, образует в растворе гептамеры, которые, однако, не устойчивы к действию ДСН и поэтому полосы с высокой молекулярной массой при электрофорезе непрогретых образцов пг 31 не наблюдается.

Молекулярная масса олигомера химерного белка W31, оцененная по подвижности в геле, составляет 50 КДа, что приблизительно соответствует ожидаемой молекулярной массе тримера.

При хранении образцов в стандартном буфере для нанесения образцов при

электрофорезе, содержащем 2% ДСН, олигомер диссоциирует на мономеры в течение двух часов (Рис. 11), а тримеры фибритина В в этих условиях стабильны при комнатной температуре в течение длительного времени.

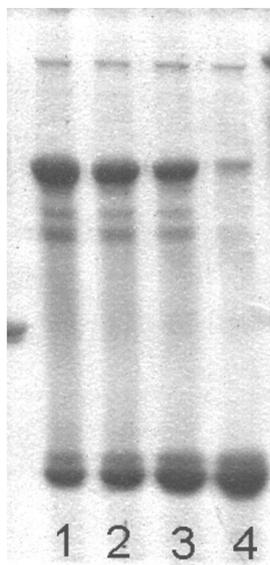


Рис. 11. Анализ диссоциации химерного белка W31 с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. Дорожки 1-4 соответствуют 1, 30, 60 и 120 мин. инкубации в присутствии 2% ДСН при комнатной температуре.

Медленная кинетика олигомеризации позволяет предположить, что химерный белок W31 не способен к быстрой сборке после денатурации нагреванием. Однако при отжиге образцов (нагрев до 100 °С - 3 мин., а затем инкубация при 4°С - 15 мин.) около 50% общего количества белка обнаруживается в олигомерной форме. Присутствие 1% меркаптоэтанола не влияет на эффективность тримеризации, но 1% ДСН полностью подавляет её (Рис.12.).

IV.1.3.2. Ингибирование ренатурации фибритина В

Способность белка W31 быстро формировать олигомеры после тепловой денатурации позволило нам использовать его в эксперименте по ингибированию ренатурации фибритина В, аналогичному эксперименту, описанному выше для фибритина NB1. В отличие от фибритина NB1, присутствие избытка (в 3 - 5 раз) гибридного белка существенно снижало выход тримерной формы фибритина В. Кроме того, при совместном отжиге значительное количество фибритина В оказывается в

виде мономера, что можно объяснить образованием гетероолигомеров, чувствительных к ДСН (Рис. 13).

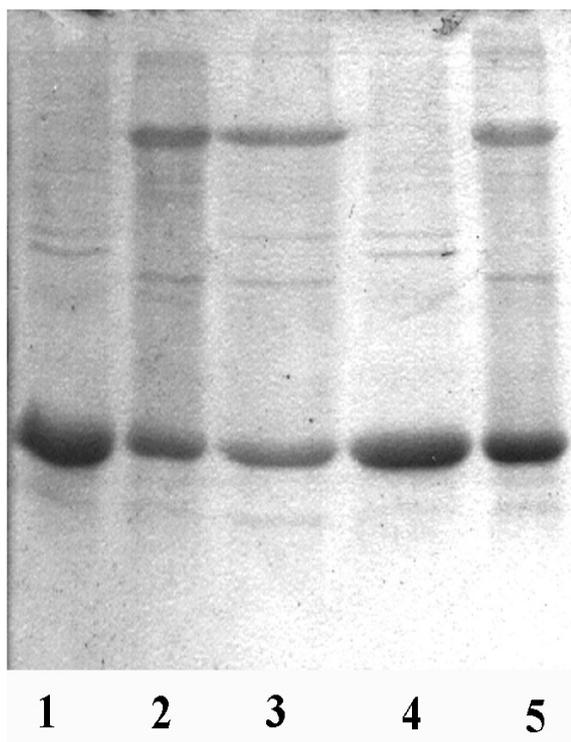


Рис12. Ренатурация химерного белка W31. 1 - образец, прогретый в буфере для нанесения; 2 - непрогретый образец; 3 - ренатурация в присутствии 5% меркаптоэтанола; 4 - ренатурация в присутствии 1% ДСН; 5 - ренатурация в 50 мМ Трис HCl буфере, рН 7,6 без добавок.

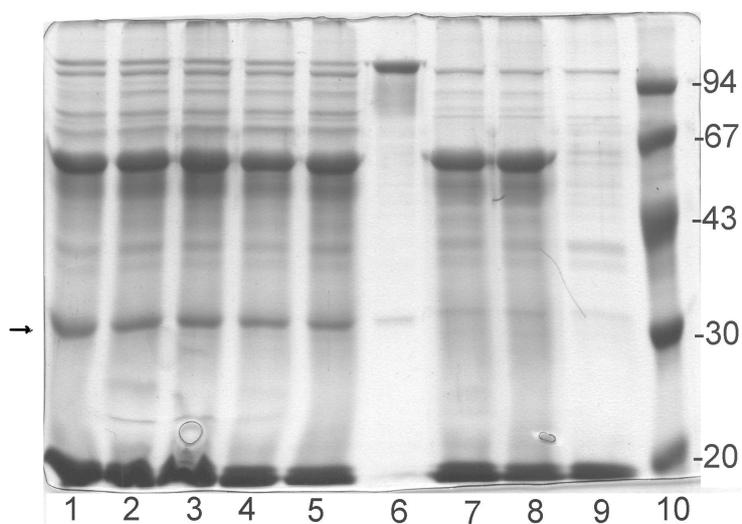


Рис. 13. Ренатурация фибритина В в присутствии избытка W31. Дорожки 1 - 5 соответствуют временам ренатурации 1, 2, 3, 5 и 10 мин соответственно; 6 - ренатурация фибритина В в течение 10 мин; 7 - ренатурация химерного белка W31 без фибритина В в течение 10 мин; 8 - непрогретый образец W31; 9 - прогретый 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.

При электрофоретическом анализе образцов, подвергнутых совместному отжигу, появляется серия полос, расположенных между тримерами фибритина В и W31. Эти полосы соответствуют, по-видимому, гетероолигомерным формам, которые различаются по составу и конформации. Наличие большого числа различающихся по подвижности в геле гетероолигомеров можно объяснить стерическими затруднениями, которые возникают из-за глобулярной конформации белка W31, а также эффектом противоположного расположения фолдонов в фибритине В и химерном белке W31 (на С- и на N - концах соответственно; Рис.8).

IV.1.4 Поиск мутаций, стабилизирующих мономерный интермедиат фолдинга.

Очевидно, что мутации, функционально инактивирующие С-концевой домен, должны препятствовать переходу мономерного интермедиата в протример (гипотетическое промежуточное короткоживущее состояние молекулы фибритина, в котором тримеризация С-концевого домена уже произошла, но структура coiled coil ещё не сформирована). Полученные ранее (Шнейдер 1997, Efimov et al. 1994) мутанты полноразмерного фибритина, с повреждённым С-концевым доменом (см. обзор литературы) были полностью нерастворимы и формировали тела включения. Однако, так как белок NB1 был растворим (и формировал лишь очень лабильные агрегаты), можно предположить, что могут быть получены растворимые мутанты на основе фибритина В. Если мутации фолдона могут в некоторых случаях стабилизировать мономерный интермедиат, то должно быть возможным получение нескольких различающихся по характеру замен мутантов, обладающих сходным фенотипом.

IV.1.4.1 Получение и скрининг библиотеки случайных мутантов фибритина В1 по пяти аминокислотным остаткам в последовательности С-концевого домена.

Мутагенез пяти выбранных аминокислотных остатков в последовательности фолдона был выполнен с помощью ПЦР с использованием вырожденного обратного праймера V (раздел III.5), генерирующего сайт рестрикции Bam HI. В качестве прямого использовали 5'-концевой праймер фибритина В1 (праймер XI), создающий сайт Nco I.

Выбор мутагенизируемых аминокислотных остатков был сделан на основе известной рентгеновской структуры С-концевого домена (Strelkov et al. 1998, Tao et al. 1997). Выбранные нами аминокислоты участвуют в образовании водородных связей и гидрофобных взаимодействий в структуре типа β -пропеллер фолдона (Рис. 7).

Так как использованный для мутагенеза праймер содержит 10 вырожденных нуклеотидных позиций в 3' концевой области, то чтобы добиться эффективного отжига на матричной ДНК, при ПЦР была использована низкая температура отжига (39°C).

Аmplицированный фрагмент был клонирован в вектор pET19b по соответствующим сайтам. Для трансформации лигазной смесью использовали компетентные клетки штамма JM 109 (DE3), что позволило анализировать экспрессию белка непосредственно в первичных клонах.

Выросшие колонии пересеивали на чашки штрихом и на следующий день инокулировали в 3 мл. среды 2ХТУ разлитой в 12-ти луночные культуральные планшеты и ставили экспрессию как это описано в разделе «Материалы и методы». Образцы культур смешивали с 4х кратным ДСН-содержащим буфером для образцов, денатурировали кипячением в течении 3 мин. и анализировали электрофорезом в ДСН-ПААГ.

Всего было отобрано 90 клонов, экспрессирующих белок ожидаемой молекулярной массы (30 кДа). Во всех случаях уровень экспрессии был очень высоким (30-40% от общего клеточного белка).

IV.1.4.2 Растворимость мутантных белков с нарушенным С-концевым доменом.

Растворимость полученных белков анализировали, разрушая клетки методом замораживания - оттаивания (см. «материалы и методы»). Образцы супернатанта и осадка анализировали методом ДСН-электрофореза.

32 клона экспрессировали растворимый белок. Во всех этих клонах при нанесении на гель не подвергнутых тепловой денатурации образцов, рекомбинантный белок образовывал высоко идущую полосу, соответствующую по подвижности тримеру фибритина В1. Это позволило нам предположить, что в этих клонах сохраняется интактная последовательность фибритина. Это предположение было подтверждено выборочным секвенированием подвергнутого мутагенезу участка в 5 клонах.

Накопление в процессе амплификации большого количества фрагментов с интактной последовательностью фибритина объясняется преимущественным отжигом соответствующих праймеров при первых циклах ПЦР.

Остальные 58 клонов экспрессировали белок, локализующийся в осадке при разрушении клеток методом замораживания оттаивания. При добавлении ДСН-содержащего буфера для образцов белок переходил в растворимое состояние. Однако, электрофоретическая подвижность таких белков в прогретых и непрогретых образцах не различалась и соответствовала молекулярной массе в 30 КДа, то есть формирования ДСН – устойчивых олигомеров (см. обзор литературы) не происходило.

Нами было обнаружено, что при разрушении ультразвуком экспрессирующих мутантные белки клеток и последующем разделении центрифугированием, данные белки практически полностью обнаруживаются в супернатанте.

Оказалось также, что при хранении ресуспензированных в 50мМ Трис-НСl буфере рН7.6 осадков, полученных методом замораживания-оттаивания, значительная часть белка переходила в растворимое состояние. Все эти данные свидетельствуют о способности белков образовывать лабильные агрегаты (в отличие от прочных нерастворимых тел включения). Вероятно, эти агрегаты взаимодействуют с грубым, имеющим большую удельную поверхность клеточным дебрисом, формирующимся при разрушении методом замораживания - оттаивания. При более полном разрушении клеток (и, возможно, самих лабильных агрегатов), белки переходят в раствор.

IV.1.4.2. Общий фенотип мутантов фибритина с нарушенным С-концевым доменом.

Все полученные нами случайные мутанты по С-концевому домену фибритина характеризуются сходным фенотипом:

- 1) Локализуются в осадке при разрушении клеток замораживанием-

оттаиванием.

2) Не формируют ДСН-устойчивых тримеров

3) При разрушении экспрессирующих клеток ультразвуком переходят в раствор.

4) Мутантные белки не формируют ДСН-устойчивых олигомеров при отжиге (в тех же условиях, которые описаны для белка NB1), а также не подвергаются криорефолдингу.

5) Не ингибируют рефолдинг фибритина В1 в эксперименте, аналогичном описанному выше для фибритина NB1 (данные не приводятся)

Для более полной характеристики данного типа мутантных белков мы отобрали 5 клонов, обозначенных как Wac20, Wac22, Wac30, Wac31, Wac61. В дальнейшем, в пределах данного раздела, описанные результаты относятся ко всем этим белкам. Были определены аминокислотные последовательности белков, кодируемых этими генами (Рис 14)

Дикий тип

...Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Ser Pro Ala Stop

Wac 20

...Gln Ala Tyr Val Ser Arg Asp Gly Glu Arg Val Leu Leu Ser Thr Ser Leu Ser Pro Ala Stop

Wac 22

...Gln Ala Tyr Val Ile Arg Asp Gly Glu Thr Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Ser Pro Ala Stop

Wac 30

...Gln Ala His Val Gly Lys Asp Gly Glu Arg Val Leu Leu Ser Thr Asp Leu Ser Pro Ala Stop

Wac 31

...Gln Ala Tyr Val Arg Thr Asp Gly Glu Leu Val Leu Leu Ser Thr Lys Leu Ser Pro Ala Stop

Wac 61

...Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Arg Val Leu Leu Ser Thr His Leu Ser Pro Ala Stop

Рис. 14. Последовательности 20 С-терминальных аминокислотных остатков в

мутантных белках. Полиморфизмы по сравнению с диким типом выделены жирным шрифтом.

При экспрессии мутантных белков при температурах 25°C и 42°C существенных изменений их свойств по сравнению с экспрессией при 37°C не происходило. Следовательно, данные мутации не являются температура-чувствительными. При всех температурах часть белка (до 20-30%) обнаруживалась в супернатанте. Разрушение клеток ультразвуком полностью переводило исследуемые белки в раствор, однако ДСН-устойчивых олигомеров не образовывалось (Рис.15).

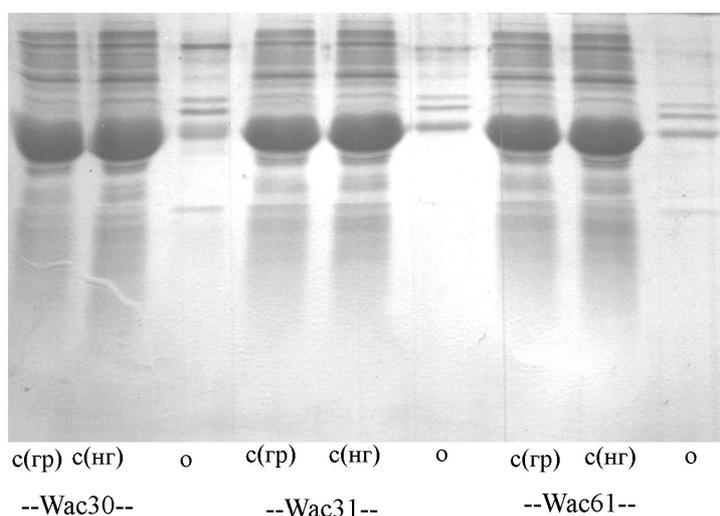


Рис. 15. Анализ растворимости мутантных белков при разрушении экспрессирующих клеток ультразвуком. С-супернатант; О – осадок; НГ – негретые образцы; ГР – денатурированные нагреванием образцы.

Получить частично очищенные (70-80%;) препараты мутантных белков удавалось дифференциальным высаливанием (см. раздел “Материалы и методы”), причём их выпадение в осадок происходило при низких концентрациях $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (19-23% насыщения). Однако, нам не удалось подобрать условий хроматографической очистки. В частности, белки плотно связывались с гидроксил-апатитом и не элюировались с него вплоть до 500 мМ концентрации фосфатного буфера, в то время как фибритин В1 дикого типа элюируется уже в 10 мМ буфере.

После высаливания эти белки переходили в раствор медленнее, чем нативный

фибрилин В1, что также свидетельствовало об их способности образовывать лабильные агрегаты. Это предположение было подтверждено аналитической гелевой фильтрацией на носителе BioGel P200 (BioRAD) с верхним пределом разделения 200 кДа белки выходили в свободном объеме колонки, что свидетельствует об образовании достаточно крупных ассоциатов с молекулярной массой не менее 200 кДа.

Полученные мутантные белки высоко чувствительны к расщеплению трипсином. При концентрациях трипсина до 0,006 мг/мл (массовое отношение белок : фермент 100:1) происходит практически полный гидролиз препарата белка за 30 мин. при 37°C.

В данных условиях не удаётся наблюдать образования каких-либо трипсин-устойчивых фрагментов.

Фибрин дикого типа и его N-делеционные мутанты практически не расщепляются в этих условиях при соотношении белок : фермент 20:1, несмотря на то, что содержит большое число потенциальных сайтов протеолиза (Хаа-Arg и Хаа-Lys, где Хаа - любая аминокислота, кроме Pro).

По данным КД-спектроскопии дважды очищенных дифференциальным высаливанием мутантных белков оцененное содержание вторичной структуры находилось в пределах 30-40% α -структуры, 20-30 % β -структуры и 20-30% неупорядоченной. Из-за неоднородности препаратов эти цифры несколько различаются для индивидуальных препаратов одного и того же белка, и могут рассматриваться лишь как ориентировочные. Однако очевидно отличие от интактного фибрина В1, содержащего по данным КД-спектроскопии 70 % α -спиралей. И практически не содержащем β -структуры.

IV.1.4.3 Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) мутантных белков
Для исследования методом ДСК использовали препараты, подготовленные также, как и для КД-спектроскопии. Для сравнения были исследованы образцы фибрина В1, очищенного хроматографией на ГАП и диализованного в тех же условиях, что и мутантные белки. На кривой плавления фибрина В1 (Рис.16) выявляются два высококооперативных пика при 52,3 и 54,6 °С.

Термограммы мутантных белков выявляют похожую форму кривой плавления, отличающуюся от таковой фибрина В1. Выявляется 3 калориметрических пика (Рис

16) , очертания 3-х из них размыты, что свидетельствует о низкой кооперативности плавления. Однако, последний пик, соответствующий переходу при 52,6 °C. , напротив, характеризуется высокой кооперативностью.

IV.1.5 Реконструкция пути фолдинга фибритина фага T4

Суммируя данные об свойствах и особенностях фолдинга описанных выше белков можно заключить, что С-концевой домен фибритина фага T4 является автономно - тримеризующимся доменом, способным инициировать ассоциацию полипептидных цепей, которая, по-видимому, приводит к образованию нативной структуры фибриллярной молекулы из глобулярных интермедиатов. Это заключение подтверждается рядом работ, появившихся после описанных выше исследований, в которых фолдон фибритина успешно использован для обеспечения тримеризации и фолдинга других гомотримерных фибриллярных белков, не обязательно имеющих в основе структуру типа coiled coil.

Таким образом, полученные нами белки NB1 и мутантные формы фибритина B1 с большой вероятностью соответствуют по своим свойствам природному мономерному интермедиату фолдинга фибритина. К сожалению, несмотря на предпринятые усилия, нам не удалось обнаружить мутант с условным (например, температурочувствительным) нарушением инициации фолдинга и продемонстрировать способность таких интермедиатов к сворачиванию в нативную структуру в прямом эксперименте. Тем не менее, существование таких интермедиатов можно считать доказанным так как факт инициации фолдинга фибритина ассоциацией С-концевых последовательностей доказан прямыми экспериментами.

Так как фибритин, равно как и другие тримерные фибриллярные белки бактериофагов образуется в инфицированной клетке в относительно небольшом количестве. Поэтому время полужизни интермедиатов, подобных охарактеризованным нами белкам, может быть достаточно большим. Это обстоятельство, в свою очередь, может иметь непосредственное физиологическое и экологическое значение: в бактериальных клетках имеются специальные механизмы, способные эффективно направлять белки с “рыхлой” структурой на протеолитическую деградацию (Truscott et al. 2011) , причем специфичность протеолитического расщепления различных субстратов может зависеть как от особенностей генотипа клетки, так и от ее физиологического состояния. В настоящее время механизмы

снижающие эффективность размножения фага на определенных штаммах хозяев за счёт неспецифического протеолиза интермедиатов фолдинга определенных вирусных белков не известны, однако их существование представляется весьма вероятным⁵.

IV.2. Исследование эволюционной пластичности генов фибритина у бактериофагов, родственных T-четным.

Имеющиеся данные о структуре и фолдинге фибритина фага T4 позволили нам предположить, что в процессе эволюции организация этого белка должна оставаться достаточно консервативной. Дивергентное расхождение аминокислотных последовательностей центральной (coiled coil) части молекулы может происходить достаточно быстро, но следовало ожидать сохранения паттерна гептадной периодичности гидрофобных остатков (см. обзор литературы, раздел 6.2). Также возможно было ожидать сохранения паттерна петель, разделяющих сегменты coiled coil, которые могут быть предсказаны на основании прерывания гептадной периодичности (Sobolev and Mesyanzhinov 1991). Аминокислотные последовательности N-концевого домена (примерно 50 а.к.) и C-концевого фолдона должны быть высококонсервативны так как первый вовлечен в белок-белковые взаимодействия с белками шейки вириона, а второй играет важную роль в фолдинге молекулы. Кроме этого ожидалось наличие консервативной аминокислотной последовательности вблизи C-конца так как из геометрических соотношений элементов фаговой частицы (см. Рис. 4), вовлеченной в транзитное белок-белковое взаимодействие с областью "колена" ДХФ. Эта последовательность может располагаться как в пределах собственно фолдона, так и в прилегающей области (например, в петлях последних сегментов). Из тех же геометрических соображений следовало, что длина coiled coil области также должна быть консервативной величиной.

Вместе с тем, поскольку из предшествующих работ было известно, что C-конец фибритина доступен для дисплея на поверхности вириона гетерологичных пептидов, можно было ожидать появления дополнительных доменов после мотива фолдона.

Поиск модульных перестановок в доменах фибритина, в том числе и небольших мотивов представлял существенный интерес с точки зрения изучения тонкой

⁵ Эта гипотеза сформулирована автором совместно с Е.Е. Куликовым

настройки молекулярного сенсора среды, компонентом которого является фибритин (см. обзор литературы) в процессе микроэволюции T4-подобных бактериофагов в естественных или техногенных микробных сообществах. Однако, несколько последовательностей фибритинов у бактериофагов, родственных T4, которые были определены к началу нашей работы (Prilipov et al. 1988, Шнейдер 1997) оказались почти идентичны последовательности *pg was* фага T4. В дальнейшем нами были определены несколько иных последовательностей С-концевых областей фибритинов фагов, близко родственных T4 (собственно T-чётных в терминологии Н.М. Krisch) RB6, RB11, RB16, RB17, RB18, RB27, RB33, RB69 и Tu1a также обнаружили последовательности очень близкие к *pg was* бактериофага T4.

В связи с этим представляло существенный интерес определить последовательности гена *was* и соответствующих белков у бактериофагов более отдаленных от фага T4, в частности, у псевдо-T-четных и Шизо - T- четных.

IV.2.1. Определение последовательностей генов фибритина у псевдо-T-чётных и шизо-T-чётных бактериофагов.

Данный этап работы выполнялся нами в 2000 - 2002 гг. до появления дешевых методов полногеномного секвенирования, поэтому задачи по определению последовательностей генов фибритина решали с применением достаточно сложных схем, основанных на ПЦР-амплификации участков генома, с использованием опорных последовательностей, получаемых в результате секвенирования ограниченного числа случайных клонов (genomic snapshot).

В частности, определение последовательности гена *was* фага RB49 выполнено основываясь на участках генов 10 и 13, последовательности которых были любезно предоставлены С. Desplat, выполнившей в лаборатории Н.М. Krisch работу по общей характеристике генома этого бактериофага.

С использованием полученных последовательностей генов, фланкирующих ген *was* мы попытались создать универсальные праймеры для амплификации этого сегмента генома у различных бактериофагов. Эта задача осложнялась тем, что ген 12, расположенный слева от гена *was* в геномах многих бактериофагов, родственных T-чётным, кодирует фибриллярный адгезин (короткую хвостовую фибриллу), обладающий большой степенью эволюционной пластичности. Поэтому приходилось

разрабатывать праймеры на гены 10 и 13, кодирующие более консервативные белки базальной пластинки и шейки фага соответственно. В результате длина амплифицируемого фрагмента возрастала до 5 - 7 т.п.н. в различных случаях. Тем не менее, нам удалось получить амплификацию для псевдо - Т - чётных фагов RB42 и RB43, PC42, а также, в дальнейшем - фага JS98C3 (см. ниже).

Кроме того, применяя более сложные приемы (краткое описание приведено в методическом разделе) мы получили последовательность гена *wac* шизо - Т - чётного бактериофага Aeh I.

IV.2.1. Особенности эволюции генов фибритина.

IV.2.1.1. Консервативный N-концевой домен.

Как мы и ожидали, N-домены всех секвенированных нами гомологов фибритина оказались достаточно консервативны (см. Рис. 16). Так, например, первые 50 а.к. фибритина шизо -Т- Четного фага Aeh I имеют 48% идентичных остатков с фибритином фага T4. В то время как уровень сходства в coiled-coil части существенно ниже (около 27%). Аналогичное распределение уровней сходства наблюдается и у других гомологов фибритина, которые можно найти в базе данных GenBank в 2012 г.

IV.2.1.2. Периодичность аминокислотных остатков в центральной части пг *wac*.

Образование структуры α -спирального coiled coil требует, чтобы в последовательности белка присутствовали повторяющиеся гептады, содержащие по семь аминокислотных остатков (abcdefg), позиции a и d в которых занимают гидрофобные остатки. α -спирали в этой структуре имеют несколько изменённую конформацию, так, что их шаг оказывается практически равен 3,5 а.к. вместо 3,6 а.к., что приводит к тому, что позиции a и d гептад (показаны желтым на Рис. 16). формируют продольные тяжи на каждой из спиралей, что обуславливает их объединение в мультитяжевую структуру с образованием гидрофобного кора (подробнее см. обзор литературы).

В белке пг *wac* фага T4 имеются 13 сегментов, способных формировать трехспиральные coiled coil домены. Однако, структура coiled coil прерывается петлями, в которых гептадная периодичность нарушена (Sobolev and Mesyanzhinov 1988).

Domain N-terminal



T4_wac --MTDIVLNDIPEVDGPPAEG-CSRISWIKNGEETLGADTQYGSEGSNNRPTVSVLRNVE 57
 RB69 ----MIEIKSLPYVDGPPDEG-QKRLNWKKNSEETITGADTLYGSEGVNNRPTITEVQRNVE 55
 RB49_wac MIEQLN-IHEI PHVDGVPSSEG-QHRTIWKNGECLSGATTQTGNDGTLNRPVAIQENVA 58
 RB42_wac MISKLNPPKIPFVDGVPSDTTQTPINWIIINGETLDGAKTKVTNEGSLNRCGVLVQKNAV 60
 PC42 -----MKIIPFVNSVPNDG-QQRITQNRNGDALMGASTKFGSDGNLNLIATTQVQANVV 52
 Aeh1_wac MAIEKVSQSQIPFVDGVPAVG-QTRIDNIQNGEYTDGAVSATDNGCALNRSVKVQKNVD 59

Segment 1 Loop 1 Segment 2
 T4_wac VLDKNI GILKTSLETANS DIKTIQG IILDVSGDIEALAQIGINKKDISDLKTLTSEHTEIL 117
 RB69 TINDNVKTIAESLDTANADIVTIKSIILDVSGDVDALAQIGHNTDDIEVLKHTVNSHGVDI 115
 RB49_wac RVNENAKSTVAKVNEVVTAVNDIKTTLGVISDGSIIDVNVQTVAKVESVEENLGETARTL 117
 RB42_wac QLETNTITQTAKINEVIDQVNLISENLAAISDESVIDKLDQVVADVEVLKVDMTAVQGST 120
 PC42 VL DENLQELNLGFDANTQKIQEIEALLEASGSLDLVQVVQTNNTDIDVQLKADSEDAKTRL 112
 Aeh1_wac TINQELNKTKDSL SKVIDLAE THDRILLNAQGDG---TNLYDRVTAVEVVNKAQQDRLAKI 116

Loop 2 Segment 3 Loop 3
 T4_wac NGTNNTVDSILADI GPFNAEANSVYRTIRNDLLWIKREL GQYTGQDINGL PVVGNPSSG 176
 RB69 LNTEEKLDDTIANIGVVNPETDSVYRTVRNDLLWIKTEL GQYTGQDINGV PTEGNESTG 174
 RB49_wac QTTVDAVSELNIKIGDR-PAADPSTRTIYDDISFIKQEMGSYPNFNINGS PDAGSSGSG 176
 RB42_wac ASNTLKIQDL DKEIGTWDASTDPKHRTIRKDIIFLKGE MGAYPGFNENGVDVDPSTGSG 179
 PC42 TSVETTVRENKTM LGEAGPNFVG---TVNSEIEFLKARIGNNTNETVNGT PSPGTSATG 168
 Aeh1_wac ET-----DEIEHVAGQEAINKRITDTVDPQITNIKKMLGN YKGFQDQDGNPDINAPGLG 169

Segment 4a Loop 4a Segment 4b Loop 4b
 T4_wac MKHRIINNTDVTITSO GIRLSELETKFIESDVGSLTIEVGNLREEL GPKPPSFSQNVYSRL 236
 RB69 MKRRIITNSSVLVDQGVRLTEENKFADSDVGAL TTEVENLRQEI GPRP-SLTVPVYTRL 233
 RB49_wac IKYRVIQNTAALNDHGRRIVQLENDWQSDV GELTRQVNKMRSEIGDTSLATQENVYVRL 236
 RB42_wac MKYKIMTNAQAISIHEGRITREDDWANSDVGH LTDEVTDLRNEMGPKHLATFESVYVRL 239
 PC42 IKLSINNVILELNAVKEDNLENTKLDLFDVPSIKQDIVQIRREL GQT PVSQPT-VYERL 227
 Aeh1_wac VKGQVERNWENVVQHDNR IKSLESFQQGDT PDVLIRNTRDLRAEMGPSSEKTDKTIYQRV 229

Segment 5 Loop 5 Segment 6 Loop 6
 T4_wac NEIDTKQTTVESDITSAIKTSG IGYPGNN---SIITSVNTNTDNIASINLELN-QSGGIKQR 292
 RB69 SGIDSSISIQTRDIAALKDFVGYPNST---AIKTQVEANRLSISTINSDIN-SPGGIKPR 289
 RB49_wac RTNARNIANLSNEVLEVKKAILFDSIP---DIGTKVTTLGTNYELLNNDVNGVDSGIRP 293
 RB42_wac NTIGTEITGINSELTSINQYIGRTGTGGTGSISARMTAESNIATLQTQMNDSATGVLP 299
 PC42 NSLNNXSNTFSTDIEAIKVKINFDNPI---DIAPRVFTLETNYSTLDNVIN-GPNGITTK 283
 Aeh1_wac KESEDHVT TANKHLTDIDTAIGKIEFPAKYVTSTGTEVTAKDIWEYTKLVRGDVGANQNA 289

Segment 7 Loop 7 Segment 8 Loop 8 Segment 9 Loop 9
 T4_wac LTVIETSIGSDDIPSS- IKGQIKDNNTTSIESLNGIVGENTSSGLRANVSWLNQIVGTDSS 351
 RB69 LTTLETTIGSPDLPTT-LQGKIKLNTDSISGINTVLGVDSSSGLRFNVAWLNQVGVDSN 348
 RB49_wac LLAVENKIGTLQSAGS-IDYRLTNTEREFLDLKQVVGVSADGLRGEVVRLSNEIGTDS 352
 RB42_wac VISLENAVGNSQIPGS-IRYDISAIKRDIGDINMIVGESSDDGLRGEMAQVMTDIGTDSQ 358
 PC42 VTVLESEMALVKTSG-----VDTLELQVDTIDSTLDG--ASGLTTQVQEI KTYIGIVPN 335
 Aeh1_wac LNTAINDILLNKSDIKTKMKEFD TSSGAKITNLESLVGLQPTDGMRGDIKALDLRESNNAT 349

Segment 10 Loop 10 Segment 11
 T4_wac GGQPSPPGSLLN RVSTIETS VSGLNNAVQNLOVEIGNNSAGIKGQVVALN TLVNGTNP 409
 RB69 GGQPEPAGSLLYRTRILETGVTDLGNNIQNVQTELG TNSSGIKQVTSLNK LISGTNP 406
 RB49_wac -----RHTLAGRIKVVENTQGRLEASVQDMEQIVGDRESGLTAGVIKLS SSIYGDDG 404
 RB42_wac -----PTS IKGRILLNVENTQRDDHQK LIDVESVVGNTSSGLVAANIAMGKAVYGDAT 410
 PC42 G-TPVPPTSLEGRFITLQGIQNN TASTVQDLQVEVQDLRSQ L TALTARVAALAESNP* 390
 Aeh1_wac RLEGVKTITD VNVLETT PAVRN LQEDMTKAKPDI ◆ 384

	Loop 11	Segment 12	
T4_wac	NGSTVBERGLTNSIKANETNIASVTQEVNT- <u>AKGNISSLQGDVQALQEAGYIPEA</u>		463
RB69	NGQTI [▶] EERGILPTVKNHDTSIMALTTTRVTT-LETDLAAAEAEIQALKEAGYIEDA		460
RB49_wac	SEDPFTQKGVIKIVKELQTSNGN-----		432
RB42_wac	SSDPFLKDGIIQKTARDSKAAIGVNTTGSETGIYKLI [▶] SDLTARVAALES◆		458
T4_wac	<u>PRDGQAYVRKDG[▶]EWVFLSTFLSPA*</u>		487
RB69	<u>PSDGK[▶]FYVRKDGAWVELPTA*</u>		480
RB49	<u>PDDGFHYLRKRGEWVQVA◆</u>		450

Рис. 16 Выравнивание аминокислотных последовательностей N-концевых доменов и coiled coil сегментов фибритинов T-чётных фагов T4 и RB69, псевдо-T-чётных фагов RB42, RB49 и PC 42 и шизо-T-чётного фага AehI (с изменениями из работы Letarov et al. 2005).

Выравнивание выполнено с помощью программы CLUSTAL W (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>). Граница N-концевого домена отмечена стрелкой (которая также указывает на позицию а первой гептады первого сегмента coiled coil). В пределах этого домена остатки, общие как минимуму для 4 из 6 выравненных последовательностей, выделены цветом. В регионе coiled coil консервативные гептадные позиции выделены желтым. Остатки, занимающие аналогичные гептадные позиции, не выравнивающиеся с соответствующими позициями у фага T4 (из-за предполагаемой делеции петель) показаны зелёным.

Гептадные позиции, показанные для последовательности фага T4, предсказаны в работе (Sobolev and Mesyanzhinov 1988) с поправками Tao et al. (1997). Предсказанные петли, разделяющие coiled coil сегменты в последовательности фага T4, которые были предсказаны (Sobolev and Mesyanzhinov 1988) показаны фиолетовым, предполагаемые петли у других фагов выделены серой заливкой. Символ “◆” в конце последовательностей фибритинов фагов T RB42, RB49 и AehI обозначают начало C-концевых доменов, негомологичных последовательности фага T4, которые имеют различную длину у разных фагов. Звёздочка обозначает конец полипептидной цепи. Консервативные 10 а.к. мотивы LTARVAALES в последовательностях фибритинов PC42 и RB42 подчёркнуты. Последовательность фолдона фага T4 выделена жирным подчёркиванием. Рисунок заимствован из работы Letarov et al. 2005.

Эти петли часто начинаются с остатков Gly и часто содержат остатки Pro. В фибритине фага T4 положение последних двух петель подтверждено данными рентгеновской кристаллографии (Tao et al. 1997).

Аминокислотные последовательности доменов coiled coil псевдо-T-чётных и

шизо-Т-чётных фагов существенно дивергировали от последовательности фага Т4, но гептадная периодичность гидрофобных остатков хорошо прослеживается и в них. Более того, участки, на которых данная периодичность прерывается могут быть в большинстве случаев выравнены с участками предсказанных (Sobolev and Mesyanzhinov 1988, Tao et al. 1997) петель в последовательности фибритина фага Т4. В пг was фага РС42 петля 11 deletирована (Рис. 16), а у фага Aeh I наблюдаются и другие изменения паттерна расположения петель.

Значительная дивергенция последовательностей центральных доменов фибритинов хорошо согласуется с предположением, что эта часть белковой молекулы не участвует в формировании белок- белковых взаимодействий.

Единственным ограничением пластичности этой области фибритина является, по-видимому, сохранение периодичности аминокислотных остатков. Присутствие различных типов гидрофобных остатков в позициях a и d может влиять на количество α -спиралей входящих в состав суперспирали coiled coil (см. обзор литературы). Однако, наличие автономно тримеризующегося С-концевого домена может жестко детерминировать число α -спиралей, ослабляя таким образом ограничения на замены гидрофобных остатков в соответствующих позициях.

Таким образом, последовательность аминокислот в самом coiled coil участке фибритина оказывает меньшее влияние на степень олигомерности, чем в других белках, где структура coiled coil формируется автономно. Это же соображение может объяснить, почему фибритин фага Т4 содержит значительно больше структуры coiled coil, чем это предсказывается программой COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html).

Для того, чтобы экспериментально подтвердить тримерную организацию дистантного гомолога фибритина, мы провели эксперимент по рефолдингу *in vitro* эквимольной смеси рекомбинантного фибритина фага RB49 и его Т-deletированного мутанта (подробнее об этих белка см. ниже). ДСН-ПААГЭ анализ продуктов рефолдинга без тепловой денатурации образца обнаружил формирование двух типов гетероолигомеров (аналогичные эксперименты были выполнены и для фибритина фага Т4; Efimov et al. 1994), что подтверждает тримерную структуру данного белка.

Мы также показали, что обнаруженные нами новые гомологи гена was фага Т4 не являются псевдогенами. В частности, присутствие фибритина фага Aeh I в вирионах было подтверждено с помощью иммуноблота с антителами, выращенными против

рекомбинантного фибритина, полученного в *E.coli* (тогда как хозяином этого фага является *Aeromonas hydrophila*).

В секвенированных на данный момент последовательностях геномов фагов, родственных Т-чётным не обнаружено дубликаций гена фибритина, что позволяет исключить наличие иной функциональной копии гена.

IV.2.1.3 Модульные замены С-концевого региона фибритина у фагов, филогенетически далеких от фага Т4.

Поскольку 30 а.к. С-концевой домен фибритина фага Т4 оказался существенным для инициации тримеризации и фолдинга (см. выше), можно было предположить, что этот сегмент окажется консервативным. Действительно, у 13 фагов, относящихся к группе собственно т-чётных, эти домены были практически идентичны (данные не приведены). Однако, у всех проанализированных филогенетически дистантных фагов (уровень сходства аминокислотных последовательностей менее 80%), были обнаружены различные, не родственные друг другу последовательности С-концевой области фибритина (Рис 17).

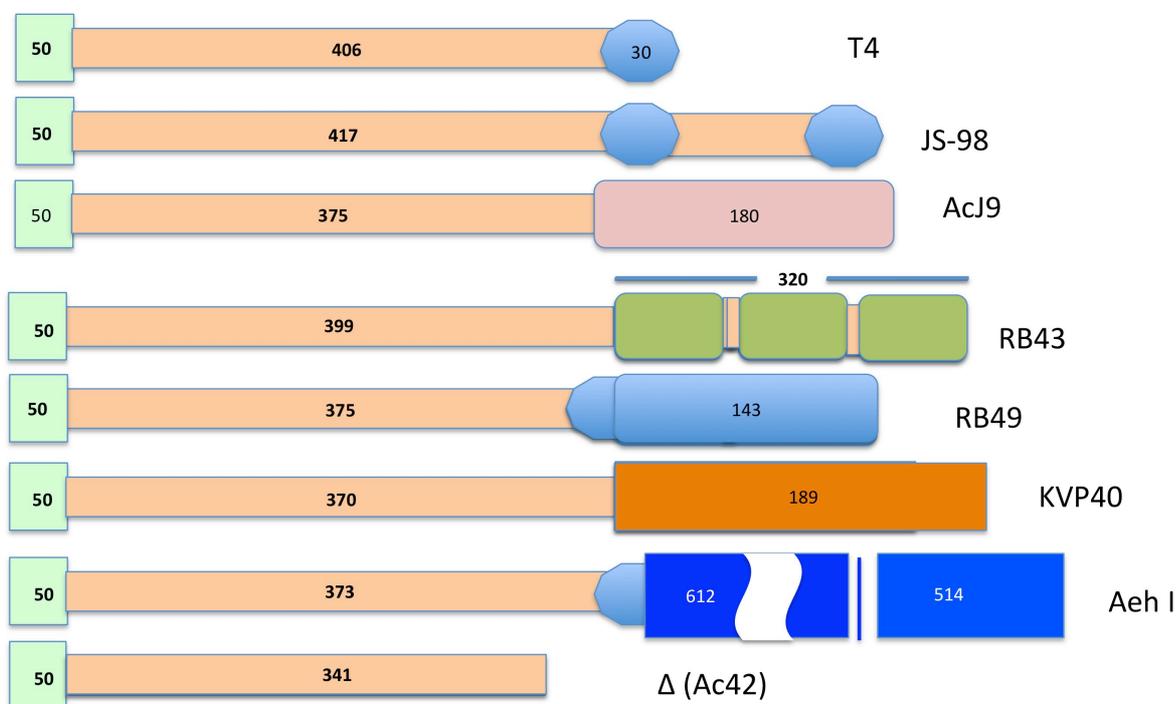


Рис 17. Типы С-концевых доменов фибритинов бактериофагов, родственных Т-чётным, известные на 2012 г. Типы RB49, RB43, Aeh I и Δ впервые обнаружены нами.

Также нами впервые секвенирован один из подтипов JS-98. Цифры обозначают размер соответствующих доменов или дополнительной рамки в а.к.

IV.2.1.3.1 RB 49

У фага RB49 сходство с пг was фага T4 обрывается на остатке Trp476 (координаты по последовательности пг was T4), и 10 терминальных аминокислотных остатков заменены на последовательность в 143 а.к. неизвестного происхождения, не обнаруживающую заметных гомологий в базе последовательностей белков. В случае фага RB49 точку рекомбинации можно указать с большой точностью, поскольку последовательность “альтернативного” 143 а.к. С-концевого домена начинается сразу после консервативного мотива GEWV, расположенного в пределах участка, гомологичного фолдону фага T4. Можно предположить, что в данном случае мы имеем дело с природной химерной молекулой, аналогичной конструктам, создаваемым искусственно, с целью дисплея гетерологичных пептидов на С-конце фибритина фага T4. Однако проведенные нами эксперименты (см. ниже) свидетельствуют, что участок, сходный с фолдоном T4 потерял способность автономно инициировать тримеризацию и эта функция принадлежит новому С-концевому домену.

IV.2.1.3.2 RB 42/43 и PC42

У фагов RB42 и RB43 (очень близких друг другу) после остатка, выравниваемого с Gln 455 пг was фага T4 следует последовательность из 323 а.к., имеющая слабую гомологию с белками, содержащими иммуноглобулин - подобные домены (Halaby et al. 1999). Анализ этого участка с помощью алгоритма поиска консервативных доменов BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) обнаруживает один Ig - подобный домен, однако визуальное исследование выявляет три tandemных повтора, по-видимому, соответствующих трём таким доменам (Рис 18).

```
RB43: YKLISDLTARVAALESSGTGGELEQRVSDLETNKASHQDVANALVPYITEAEADVKYEPPKK  
      ++ DTR+ +ST + R+ ++ VAN+ VP +K +
```

```
UNC-89: FESTDDGTQRLVIEDSKTDDQGNYRIE----VSNDAGVANSKVPLTVVPSETLKIKKGL
```

```
RB43: IPLSFTQNLVGRGDYIEGDDISFMVTVTGGKLPYVYQWKKGTADVGTNASSSILIQ-----  
      ++ TQ G I V V G P +W KGT V ++ ++ ++Q
```

```
Sbjct: TDVNVTQ-----GTKILLSVEVEGK--PKTVKWKYKGTETVTSSQTTKIVQVTESE
```

```
RB43: -----SITSADAGVYKVVVTDADNTVITSDEVTVAV----YPVPQFDTNLADKSVVDGD  
      S +D G Y+VV++ +V +S VTV +P F LAD+SV G
```

```
UNC-89: YKLEIESAEMSDTGAYRVVLSTDSFSVESSATVTVTKAAEKISLPSFKKGLADQSVPKG
```

RB43: PLTLEVVYSGGKPPYTYEWFKDNSVIS-----GETSATFTKSAVTSADAGEYYVSVTD
 PLLEV G P +W+K+ I G T DGEY SVT
 UNC-89: PLVLEVEIEG--KPKDVKWYKNGDEIKDGKVEDLGNGKYRLTIPDFQEKDVGEY--SVTA

RB43: AMNNQNDSVKATVTVTPRPALAFITDLSATKSYSTGA-NMDLAVVVTGGKTPYTKWFKD
 A KAVV+P+ +KTN++VG KW+K+
 UNC-89: ANEAGEIESKAKVNVSAKPEIVSGLVPTTVKQGETATFNVKVKGPVKG-----VKWYKN

RB43: TAEISGQTGASLTTVAEDGVYKVEVTDA LTTKITSTECTVTV
 EI AT DG+Y +E+ +A
 UNC-89: GKEIPD----AKTKDNGDGSYSLEIPNA

Рис. 18. Выравнивание С-концевой области фибритина фага RB43 и белка UNC-89 *Caenorabdis elegans*, содержащим множество tandemно повторяющихся Ig -подобных доменов. Цветами выделены повторяющиеся мотивы, соответствующие предполагаемым Ig-подобным доменам фибритина RB43. Центральный Ig - подобный домен, выделенный подчёркиванием, обнаруживается алгоритмом BLAST. Жирным шрифтом выделен конец участка, гомологичного фибритинам других фагов.

У фага PC42 С-концевой домен фибритина полностью deletирована полипептидная цепь обрывается в пределах участка гомологии с coiled coil регионом фага T4 (по видимому, в данном случае ген фибритина утратил функциональность - см ниже).

Точку рекомбинации у этих фагов можно указать лишь предположительно.

Интересно, что у фага RB43 имеется 10 а.к. мотив LTARVAALES, на котором заканчивается гомология с фибритином фага T4. Точно такой же мотив имеется и на С-конце фибритина фага PC42. Причины консервативности этого мотива у двух весьма сильно дивергировавших последовательностей, равно как и его расположения вблизи точки рекомбинации не известны. Возможно кодирующая его нуклеотидная последовательность представляет собой сайт распознавания какой-то системы сайт - специфической рекомбинации, опосредовавшей соответствующие события модульного обмена.

IV.2.1.3.3 Aeh I

У шизо - Т - чётного фага Aeh I ген was кодирует очень большой полипептид (1035 а.к.) причём только 423 а.к. на его N-конце обнаруживают сходство с фибритином T4. Длинный С-концевой домен этого белка обнаруживает слабую гомологию (23%

идентичных остатков) с предположительными рецептор-распознающими белками некоторых профиагов *E. coli*.

После этого большого химерного белка в геноме фага AehI следуют две рамки размером в 534 и 201 а.к. соответственно, обозначенные нами как ORF w.1 и ORF w.2, вслед за которыми начинается ген13 (Рис.19). У других фагов, родственных AehI и имеющих тот же тип фибритина (фаги *Aeromonas* 65, PX29, phiAS5), геномы которых имеются в GenBank, присутствует лишь гомолог W.1.

Рекомбинантный белок, кодируемый рамкой w.2 Aeh I при экспрессии в *E.coli* образует нерастворимые тела включения, причём нам не удалось подобрать условий рефолдинга этого белка. Имеющиеся данные указывают на то, что это скорее всего псевдоген. Функция белка W.1 была нами установлена экспериментально (см. ниже). Это шаперон, необходимый для корректного сворачивания фибритина AehI, очевидно, переданный в геном этого фага из иного генетического окружения в виде единого модуля с С-концевым доменом фибритина. Организация этого модуля весьма напоминает организацию ряда фаговых адгезинов, что позволяет предположить, что функция фибритина типа Aeh I может отличаться от таковой у пг wac фага T4.

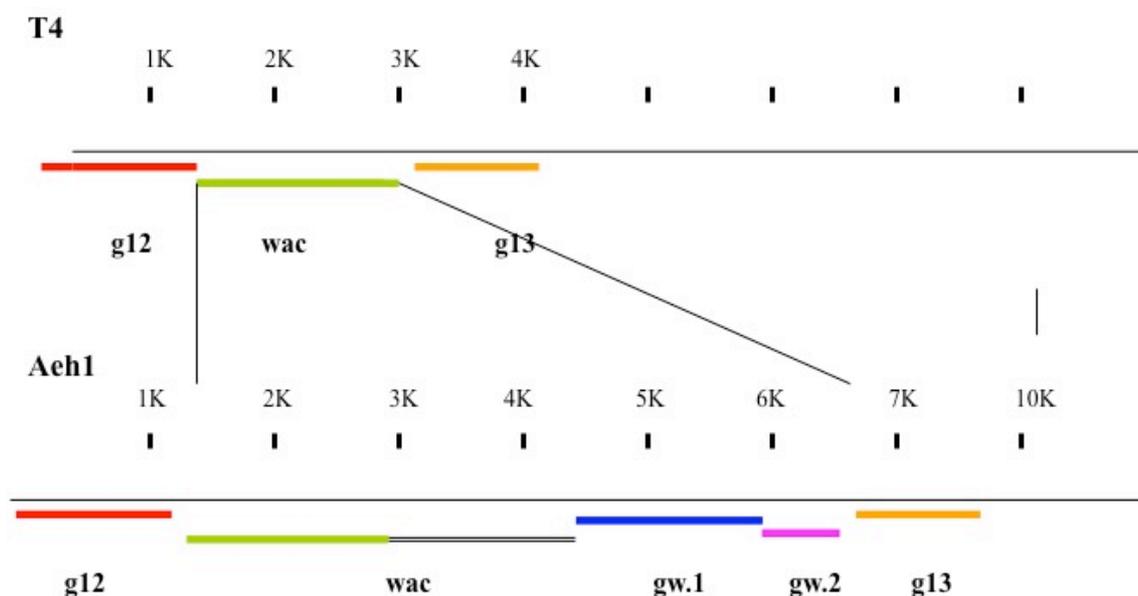


Рис. 19 Сравнение генетической организации региона гена *wac* у бактериофагов T4 и Aeh I.

Возможно, это дополнительный адгезин, взаимодействие которого с рецепторами не вызывает эжекции ДНК, но способствует удержанию фага вблизи

клетки хозяина, увеличивая процент эффективных соударений. Такой механизм может быть весьма важен при низкой концентрации клеток хозяина (см. обзор литературы). Подобная же функция была предположена также для ряда белков, расположенных на поверхности частиц различных фагов и несущих Ig-подобные домены, в том числе - для фибритинов типа RB43 (Fraser, 2007).

IV.2.1.4 JS98

C-концевая область фибритинов фага JS98⁶ отличается от других вариантов фибритинов тем, что вместо модульной замены фолдона на полностью гетерологичный домен в ней имеется тандемный повтор фолдоподобного мотива.

Длина всего C-концевого домена составляет 298 а.к. Нами был выделен близкородственный JS98 фаг, названный JS98C3. В фибритине этого фага также имеется «дополнительный» домен, однако его длина составляет только 54 а.к.

Последовательность C-концевой области пг was фага JS98C3 почти идентична C-концевой последовательности пг was фага JS98. Таким образом, по отношению к последнему пг was фага JS98C3 имеет внутреннюю делецию 237 а.к. (Рис.20).

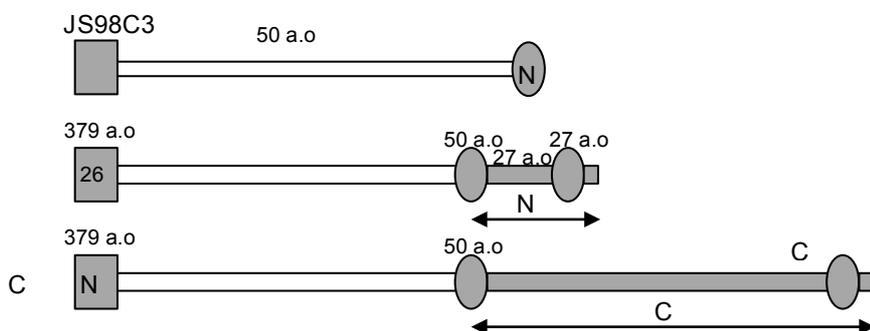


Рис.20. Схема строения фибритинов бактериофагов T4, JS98 и JS98C3.

Овалами отмечены аминокислотные последовательности фолдонов.

Для сравнения нуклеотидной последовательности генов was фагов JS98 и JS98C3 мы построили дот-плот диаграмму выравнивания этих последовательностей (рис. 21).

⁶ Исследование фибритинов этого типа проводилось совместно с О.Р. Латыповым (Латыпов 2007)

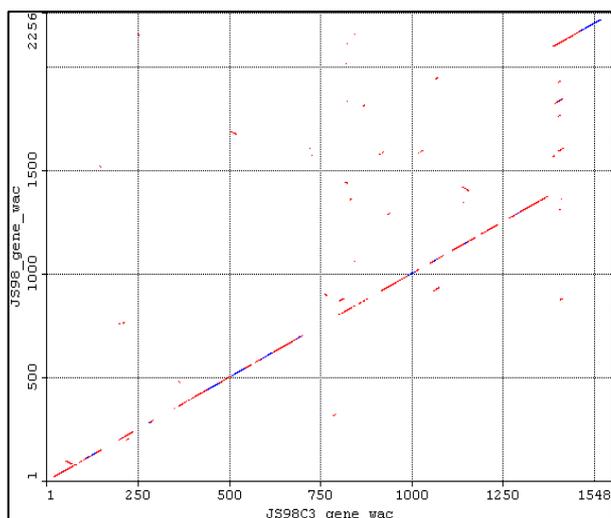


Рис. 21. Dot Plot диаграмма выравнивания нуклеотидных последовательностей генов *wac* фагов JS98 и JS98C3.

На этой диаграмме чётко виден регион (позиции 1800-2100), содержащий прямой тандемный повтор, что также видно на дот-плот диаграмме по обеим осям которой расположена последовательность гена *wac* фага JS98 (рис.22).

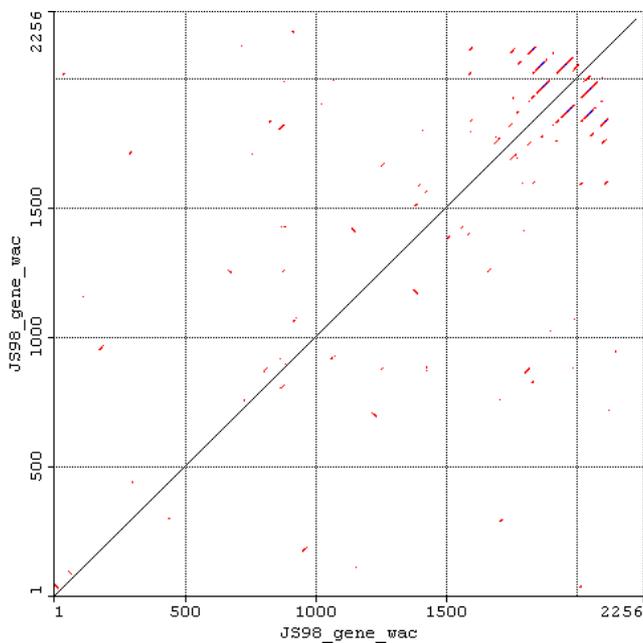


Рис. 22. Dot plot диаграмма выравнивания нуклеотидной последовательности гена *wac* бактериофага JS98 на саму себя.

Тандемные повторы в нуклеотидной последовательности бактериофагов, родственных Т4, имеющих сходный тип репликации ДНК (рекомбинационно-зависимый), являются горячей точкой рекомбинации, сопровождающейся делециями или дупликациями участков, фланкированных такими повторами. Поэтому такая организация может устойчиво наследоваться только в случае, если она дает бактериофагу заметное селективное преимущество.

Дот плот диаграмма нуклеотидной последовательности гена *wac* бактериофага JS98C3 “на саму себя” резко отличается от подобного выравнивания гена *wac* фага JS98 (рис.23).

Обращает на себя внимание практически полное отсутствие нуклеотидных повторов. Это говорит о том, что ген *wac* фага JS98C3 гораздо более стабилен, чем соответствующий ген бактериофага JS98. Возможно, вариации числе повторов в С-концевом домене служат для функциональной настройки фибритина (как компонента сенсора среды?) в зависимости от экологической ситуации.

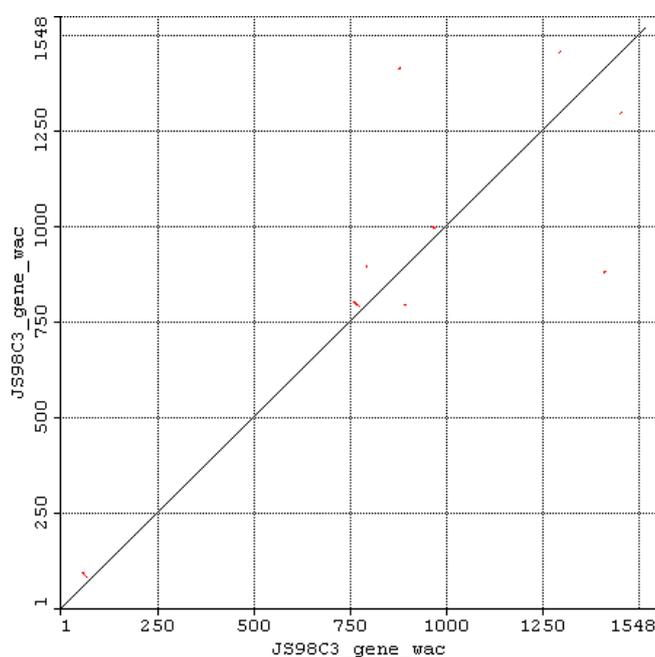


Рис. 23. Dot plot диаграмма выравнивания нуклеотидной последовательности гена *wac* бактериофага JS98C3 “на саму себя”.

Помимо поиска нуклеотидных повторов в последовательностях генов *wac* фагов

JS98C3 и JS98, мы провели поиск повторов аминокислотных последовательностей. Как показали результаты анализа обнаруженных аминокислотных повторов (Табл. 3), все выявленные нами ранее нуклеотидные тандемные повторы оказались в одной рамке считывания, а кодируемые ими аминокислотные последовательности имеют высокую степень гомологии.

Кроме того, в аминокислотной последовательности гена *wac* фага JS98C3 мы обнаружили короткий (17 а.к.) фрагмент, высоко гомологичный повторам из последовательности *pg wac* бактериофага JS98.

IV.2.1.5 KVP40

C-концевой домен фибритина типа KVP40 обнаружен нами при анализе базы данных. Этот ген был секвенирован в составе генома соответствующего фага. Домен имеет размер около 190 а.к. и не обнаруживает существенного сходства с белками с известной функцией. Биохимические исследования фибритина этого типа не проводились.

№	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ПОЛОЖЕНИЕ	РАЗМЕР, А.К.
1	KIAPLTTRVTTAEGKITTLETGLAAVKVESD	601	31
2	KVAGINTRLGTAEGDIGTLKTGLAEVKGESD	632	31
3	KVAAIDTRLGVVEGEVGTLETGLAAVKVESD	663	31
4	KVADLGTRLTAAEGKITALETELS-----	694	24
5	-----LLEAEGKITALETETEMAK-----	458	17

*Табл. 3. Аминокислотные повторы в *pg wac* бактериофага JS98. Серым цветом выделена строка с гомологичной аминокислотной последовательностью из *pg wac* фага JS98C3.*

IV.2.2 Экспрессия и физико-химическая характеристика гомологов фибритина фага T4.

IV.2.2.1 Фибритин фага RB49

Фибритин фага RB49, был первым дистантным гомологом фибритина T4, обнаруженным и секвенированным с момента идентификации этого гена. Поэтому он был охарактеризован нами наиболее подробно.

В первую очередь мы хотели установить, обладает ли фибритин фага RB49 свойствами, сходными с фибритином фага T4, и в частности, способен ли он автономно тримеризоваться и сворачиваться в нативную структуру. Мы создали рекомбинантную плазмиду pWRB49, которая обеспечивала высокий уровень экспрессии интактного пг was RB49 под контролем T7 промотора. Для того, чтобы установить происходит ли корректное сворачивание этого белка при экспрессии с плазмиды, мы использовали подход, разработанный ранее исследования фибритина фага T4 и его мутантных форм (Efimov et.al 1994, Letarov et al. 1999).

Нативный фибритин фага T4 обладает рядом легко идентифицируемых биохимических свойств. Этот белок растворим после экспрессии и осаждается при достаточно высоких (около 30% насыщения) концентрациях $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, однако преципитат легко растворяется в низкосолевого буфере. Фибритин связывается с гидроксид-апатитом, но элюируется при низких (10 мМ) концентрациях фосфатного буфера. При анализе этого белка методом ДСН-ПААГЭ без прогревания образца белок полностью остается в тримерном состоянии и мигрирует значительно медленнее, чем мономерная форма, которая образуется в прогретых образцах. Наконец, фибритин практически резистентен к обработке трипсином даже при отношении фермент/белок 1:20, в то время как денатурированные образцы гидролизуются до низкомолекулярных пептидов. Свойства мутантов фибритина с нарушенным фолдингом описаны выше в разделе IV.1.

Пг was RB49 экспрессируется с хорошей эффективностью (до 30% общего белка клеток). Рекомбинантный белок полностью растворим, и, будучи денатурирован, мигрирует в ДСН-ПААГЭ в соответствии с ожидаемой молекулярной массой около 65 кДа. В непрогретых образцах электрофоретическая подвижность белка резко уменьшается (Рис. 24).

Рекомбинантный белок осаждается $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при 35% насыщения и может быть легко растворён в 50 мМ Трис HCl (pH 7,5). Он элюировался с гидроксид-апатита в 50 мМ фосфатном буфере. Обработка грубого лизата экспрессирующих клеток трипсином в течение 30 мин при 37°C не оказывало никакого влияния на белок, заметного при ДСН-ПААГЭ анализе, но если образец прогревали при 95°C в течение 1 мин перед добавлением трипсина, наблюдался полный гидролиз белка (данные не приведены).

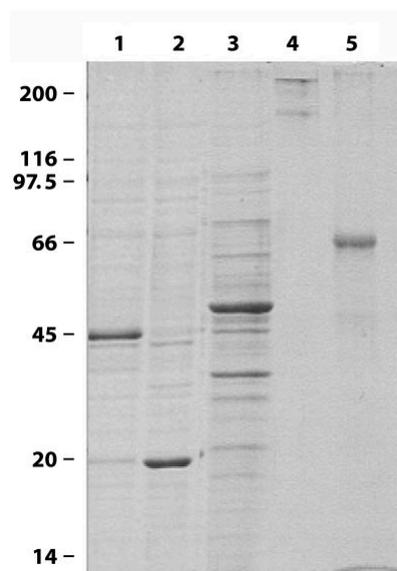


Рис.24. ДСН-ПААГЭ анализ пг was фага RB49 и его делеционных вариантов. Дорожки: 1- RBW-C, негретый образец; 2 - RBW-C, прогретый образец; 3 -RBW-N, негретый образец (подвижность белка RBW-N в прогретом образце не отличается); 4 пг was RB49 дикого типа, негретый образец; 5 пг was RB49, прогретый образец.

По данным КД-спектроскопии очищенного на гидроксил-апатите пг was RB49 было оценено содержание элементов вторичной структуры: 47% α -спиралей, 18% β -структуры, 13% поворотов и 22% другой структуры. Такое содержание элементов вторичной структуры хорошо согласуется с предположением, что пг was фагов T4 и RB49 имеют coiled coil регионы близкого размера. Таким образом, совокупность биохимических данных свидетельствует, что фибритин фага RB49 сворачивается в нативную структуру, содержащую протяжённый coiled coil регион.

Значение различных доменов пг was RB49 для олигомеризации и фолдинга молекулы были исследованы путём создания серии делеционных вариантов этого белка. Полученный нами белок RBW-C был лишён 358 N-концевых а.к. Он имеет размер в 238 а.к. начиная со стартового кодона, созданного на позиции 359 исходного белка.

Основываясь на модели доменной организации (Рис. 16) этот белок содержит C-концевой домен и 3 последних сегмента coiled coil исходного белка.

При суперэкспрессии белок RBW-C нарабатывается в растворимой форме, подвижность его мономера в ДСН-ПААГЭ соответствует молекулярной массе в 20 КДа, а в негретых образцах этот белок мигрирует как белок с массой 47 КДа (Рис. 24). При высаливании RBW-C осаждается при 37 % насыщения. Белок устойчив к трипсинолизу

также, как и полноразмерный фибритин. Эти данные свидетельствуют о том, что белок RBW-C образует структуру, близкую к нативной структуре этого региона в полноразмерном белке, что свидетельствует о том, что N-концевой регион не существенен для фолдинга фибритина RB49.

Мы также получили C-делетированный вариант белка, названный RBW-N. В этой конструкции амбер-кодон был введён в 20 а.к. правее конца участка гомологии с фибритином фага T4. таким образом, если фолдоподобный мотив, обнаруженный на стыке доменов (Рис. 17) сохраняет функциональность, можно было ожидать нормального фолдинга данного белка. Однако, в отличие от белка RBW-C, белок RBW-N был полностью нерастворим и образовывал тельца включения. При ДСН-ПААГЭ анализе телец включения не наблюдалось олигомерных полос в негретых образцах; белок был высоко чувствителен к гидролизу трипсином. Полученные данные свидетельствуют о том, что “дополнительный” С-концевой домен фибритина RB49 необходим для инициации фолдинга молекулы.

При тепловой денатурации фибритин RB49 не был способен спонтанно восстанавливать нативную структуру при больших концентрациях белка, как это происходит с препаратами фибритина T4. В этих условиях белок агрегирует. Однако, при солюбилизации его в 8М мочеvine оказывалось возможным добиться рефолдинга. Для этого препарат разбавляли в 100 раз 50 мМ Трис HCL pH7,5 и инкубировали в течение ночи при 15°C, после чего концентрировали с помощью ультрафильтрации на центриконах. Способность к относительно эффективному рефолдингу *in vitro* позволила нам получить доказательство тримерности этого фибритина путём получения гетеро-олигомеров полноразмерного пг was и белка RBW-C при их совместном рефолдинге. В результате этой процедуры были зафиксированы 2 типа гетеролигомеров и 2 типа гомолигомеров, что свидетельствует о тримерности белка.

IV.2.2.2 Фибритин фага PC42 (тип Δ)

Пг was фага PC42 полностью лишен С-концевого домена и не имеет очевидного замещающего элемента. При экспрессии в *E.coli* этот белок оказался полностью нерастворим и не образовывал ДСН-устойчивых олигомеров. Тем не менее, хотя этот белок не образовывал нативной структуры в условиях суперэкспрессии в *E.coli*, нельзя исключить, что в условиях инфекции *B. serasia* (хозяина фага PC42) этот белок сворачивается с достаточной эффективностью. Поскольку фаг PC42 практически не рос

в наших условиях⁷, мы не смогли получить его в количествах, достаточных для проверки присутствия этого белка в вирионе. Однако, наиболее вероятное объяснение состоит в том, что ген *wac* у данного вируса не функционален. Утрата С-концевых, а также Т-концевых доменов, наблюдаемое у нескольких фагов *Acinetobacter* свидетельствует в пользу такого предположения (см. раздел IV.2.5)

IV.2.2.3 Фибритин фага RB43

Экспрессия N-делетированного варианта фибритина фага RB43 (белок FL43), соответствующего С-концевому домену, содержащему Ig-подобные домены, приводит к образованию растворимого белка, образующего ДСН-устойчивые олигомеры. Этот результат свидетельствует, что и в случае фага RB43 “дополнительный” С-концевой домен обеспечивает тримеризацию полипептидных цепей.

IV.2.2.4 Фибритин фага JS98C3⁸

Ген *wac* фибритина фага JS98C3 был клонирован под контролем промотора T7-полимеразы и экспрессирован в *E.coli* (Рис. 25)

При гидролизе трипсином молекулярная масса пг *wac* несколько уменьшается, однако, даже при внесении трипсина до концентрации 0.05 мг/мл данный белок не гидролизуется полностью и остается олигомерным. Это свидетельствует об эффективном сворачивании с образованием компактной нативной структуры. Для установления влияния С-концевого домена на фолдинг пг *wac* фибритина фага JS98C3, нами был получен его делеционный вариант, оканчивающийся на С-конце стоп-кодомом в регионе, в котором происходит терминация трансляции гена *wac* бактериофага T4 (сразу же за первым фолдоном).

⁷ этот фаг был получен лабораторией Н.М. Krisch из канадского фагового референс-центра имени д'Эреля как фаг *B.серасiа*, однако позднее в базе GenBank появился геном фага Ac42 *Acinetobacter*, ген фибритина которого идентичен гену, амплифицированному нами из лизата фага PC42, присланного из коллекции. Вероятно, в аннотации д'Эреллевского центра имелось ошибочное указание хозяина этого вируса.

⁸ Биохимическая работа с этим белком выполнялась совместно с моим аспирантом О.Р. Латыповым

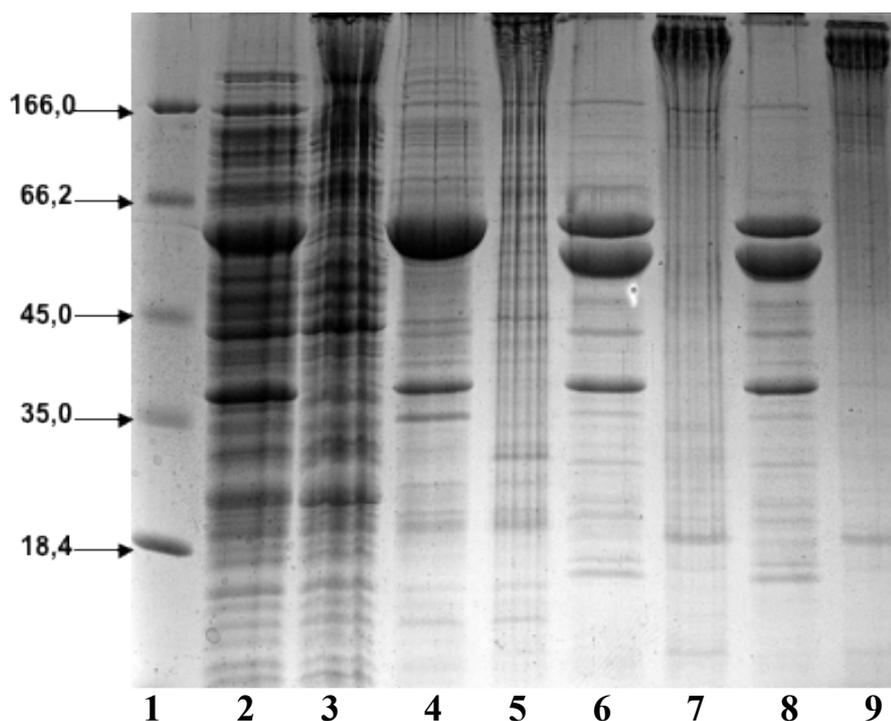


Рис. 25. Анализ экспрессии *p8 was* фага JS98C3 и его трипсинолиза в 10% ДСН-ПААГЭ: 1 – маркер молекулярного веса; 2 – лизат, прогретый образец; 3 – лизат, прогретый образец; 4 – высоленный препарат *p8 was*; 5 – тот же препарат, не прогретый перед нанесением; 6 – *p8 was* после обработки трипсином в концентрации 0,01 мг/мл; 7 – он же, не прогретый перед нанесением; 8 – *p8 was* после обработки трипсином в концентрации 0,05 мг/мл; 9 – тот же препарат, не прогретый перед нанесением.

Исходя из степени сходства между фолдоном фибритина бактериофага Т4 и аминокислотными мотивами, фланкирующими проклонированную нами последовательность, мы ожидали получить в результате экспрессии растворимый олигомерный ДСН-устойчивый продукт. Однако уровень экспрессии оказался крайне низким, на уровне мажорных клеточных белков. Мы предполагаем, что наличие этого аминокислотного мотива, гомологичного (но не идентичного) фолдону фибритина фага Т4 не обеспечивает быстрого принятия молекулой *p8 was* фага JS98C3 нативной конформации. По-видимому, относительно стабильный интермедиат фолдинга, близкий по своим свойствам расплавленной глобуле, оказывается уязвимым для клеточных протеаз, чем, возможно, объясняется низкий уровень накопления растворимого белкового продукта.

Для того, чтобы выяснить, способен ли С-концевой домен фибритина фага JS98C3 к самостоятельной тримеризации, мы проклонировали последовательность,

кодирующую С-концевой домен в плазмидный вектор в двух вариантах: как с мотивом, гомологичным фолдону фибритина фага Т4 на N-конце, так и без него.

В силу того, что небольшие размеры С-концевого домена представляют препятствие для его экспрессии и осложняют манипуляции по очистке, мы проклонировали кодирующие его последовательности в плазмидный вектор рЕТ-32а, в одной рамке считывания с тиоредоксином *E. coli*

Экспрессия С-концевого домена пг was в виде N-концевого трансляционного фьюза с тиоредоксином позволяет оценить его способность образовывать стабильные химерные тримеры.

Таким образом, нами были получены плазмидные конструкции рЕТCd (С-концевой домен обоими фолдонами) и рЕТCd2 (тот же домен без N-концевого фолдона). Соответствие нуклеотидной последовательности вставок расчетным последовательностям в обеих конструкциях было проверено секвенированием.

Белки, представляющие собой варианты С-концевого домена фибритина фага JS98C3, экспрессировались в *E. coli* в количестве, превышающем 40% суммарного клеточного белка. Их электрофоретическая подвижность в 15% ДСН-ПААГ в прогретых образцах соответствовала предсказанной молекулярной массе (рис. 26). Не прогретые перед нанесением образцы образовывали в ДСН-ПААГЭ высоко идущие полосы, характерные для олигомерных белков. Мы очистили эти белки с помощью аффинной хроматографии на Co-NTA, после чего удалили тиоредоксин посредством гидролиза тромбином и последующий дополнительной очистки на Co-NTA, при которой тиоредоксин остался связанным со смолой, в то время как целевые белки прошли через колонку в свободном объеме.

В процессе исследования свойств С-концевого домена фибритина фага JS98C3 лишённого N-концевого фолдона, нами было обнаружено его уникальное свойство: частично сохранять условно нативную конформацию после прогревания образца в присутствии ДСН до 90°C в течении 5-6 минут. Полная утрата олигомерной структуры происходила только при прогревании препарата этого белка в ДСН-содержащем буфере в течении 10-12 минут.

Подобное свойство, ранее показанное только для фолдона пг 5 бактериофага Т4 (К.А. Мирошников, личное сообщение) говорит об очень высокой энергии, необходимой для плавления данного домена, либо о его способности к очень быстрой эффективной тримеризации, и может быть использовано для конструирования

химерных тримерных белков.

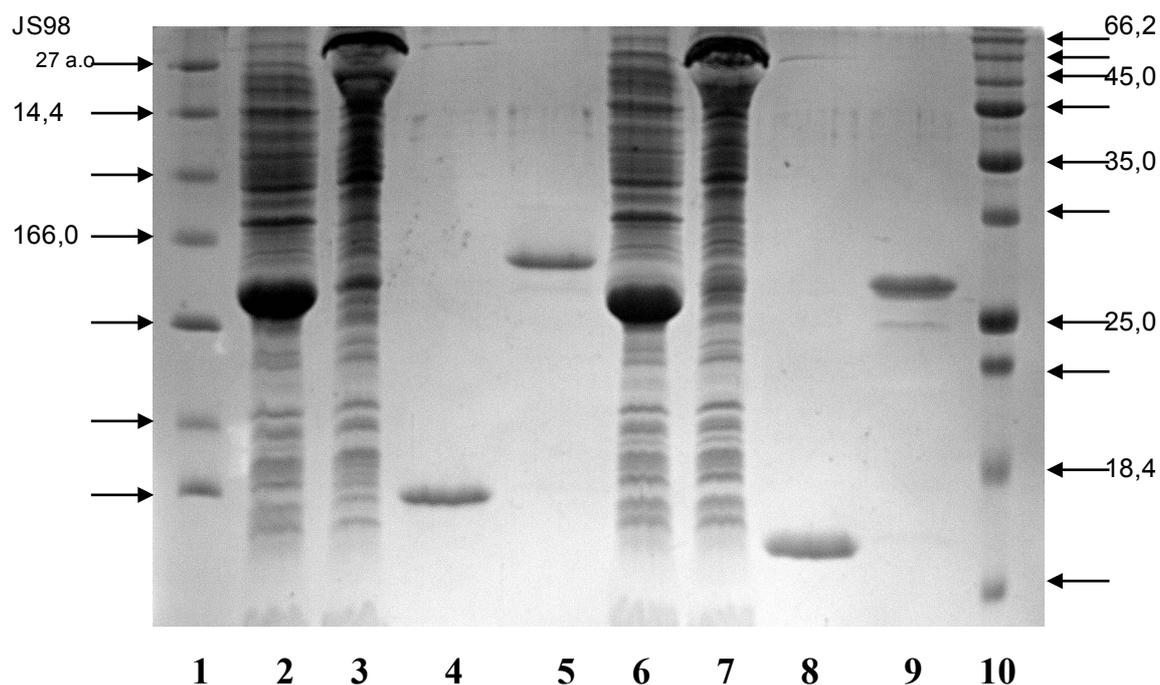


Рис. 26. Анализ очистки вариантов С-концевого домена фибритина бактериофага JS98C3 в 17% ДСН-ПААГ. Порядок нанесения: 1, 10 – маркеры молекулярной массы; 2, 6 – тотальный препарат белков: с двумя фолдонами и без первого фолдона соответственно; 3, 7 – те же препараты, не прогретые перед нанесением; 4, 8 – второй этап очистки на Со-NTA (после гидролиза тромбином) с двумя фолдонами и без первого фолдона соответственно; 5, 9 – те же препараты, не прогретые перед нанесением.

КД-спектроскопия хроматографически очищенных препаратов полноразмерного фибритина фага JS98C3 и его делеционных вариантов показала высокое содержание α -спиралей во всех исследованных образцах. Эти данные подтверждают наши предположения о высоком сходстве между вторичными и третичными структурами фибритинов бактериофагов T4 и JS98C3. Обращает на себя внимание резкое отличие в соотношениях α - и β -структур между двумя делеционными вариантами С-концевого домена фибритина. Достоверно большее содержание альфа-спиралей в варианте С-концевого домена фибритина с одним фолдоном свидетельствует о том, что отсутствующий в этом белке N-концевой фолдон действительно представляет собой бета-пропеллерную структуру (табл. 4), в то время как спейсер между фолдонами, по-видимому, принимает конформацию coiled coil.

Образец	Содержание элементов вторичной структуры, %			
	фа- спираль	бет а-лист	Бета- поворот	непериодическ ая
Полноразмерный фибрилин	38	16	18	28
С-концевой домен с двумя фолдонами	25	20	22	33
С-концевой домен с одним фолдоном	42	16	14	28

Табл. 4. Содержание элементов вторичных структур в целевых белках, рассчитанное по данным спектроскопии кругового дихроизма.

IV.2.2.4 Фибритин фага Aeh I

Фибритин фага Aeh I самым крупным из известных на данный момент гомологов фибритина: его полная длина составляет 1035 а.к. причём длина “альтернативного” С-концевого домена превышает размер области, гомологичной фибритину фага T4.

Интересной особенностью этого фага является также то, что у него имеются две дополнительные рамки считывания, расположенные между геном фибритина и геном 13, которые отсутствуют у всех иных фагов этой группы и, очевидно, составляют часть генетического модуля, включающего С-концевой домен фибритина.

Экспрессия гена *wac* фага Aeh I в клетках *E.coli* приводила к очень эффективному синтезу белка предсказанной молекулярной массы, который был полностью нерастворим и образовывал тела включения. Нам не удалось подобрать ни условий экспрессии, ни условий рефолдинга, позволяющих получить этот белок в нативной конформации. Однако, исходя из сходства генетической организации данного локуса с локусами адгезинов некоторых фагов, у которых за генами фибриллярного адгезина следует ген специфического шаперона, необходимого для фолдинга соответствующего белка, мы предположили, что *pg w.1* может выполнять эту функцию.

При экспрессии всей области *wac-w.1-w.2* в виде единого оперона под контролем промотора T7 полимеразы удалось получить до 10% растворимого фибритина,

который образовывал ДСН-устойчивые олигомеры (данные не приведены). Однако продукция белка w.1 с такой конструкцией была очень слабой, и мы предположили, что в условиях суперэкспрессии мощная трансляция гена was подавляет инициацию трансляции гена w.1. Для преодоления этого затруднения мы сконструировали двухплазмидную систему, в которой экспрессия этих двух белков осуществлялась с различных молекул ДНК. При проведении экспрессии этой системы при 20°C практически 100% фибритина находилось в нативной конформации (Рис. 27).

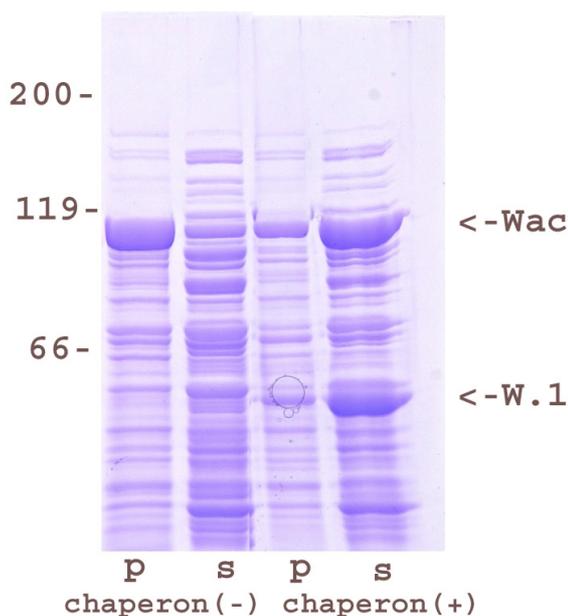


Рис 27. Экспрессия фибритина фага Aeh I в присутствии шаперона пг w.1 и без такового. p – осадок, s – супернатант.

Полученный таким образом белок был очищен дифференциальным высаливанием и хроматографией на гидроксил-апатите (элюция части белка происходила в 20 mM, а остального - в 50 mM фосфатном буфере). Он оказался устойчив к гидролизу трипсином. КД спектроскопия этого белка свидетельствовала о большом содержании α и β структуры, однако, в отличие от белков с преобладанием α спиралей, сколько-нибудь точный расчёт содержания этих структур выполнить не удалось, поскольку в базе данных программы деконволюции отсутствовали спектры белков, имеющих сходные особенности молекулярной организации.

Присутствие белка W.2 для эффективного фолдинга пг was не требовалось. Более того, при экспрессии этот белок оказывался нерастворим. Как было отмечено выше, его гомологи отсутствуют у других фагов, несущих сходный тип фибритина, что позволяет предположить, что рамка w.2 у фага Aeh I не является функциональным геном.

IV.2.3 Пластичность генов дистальной части ДХФ - потенциальной мишени связывания пг was.

Из вышеизложенных результатов следует, что в эволюционной истории бактериофагов, родственных T-чётным имели место множественные события модульной замены бифункциональных C-концевых сегментов фибритина: “альтернативные” C-концевые домены выполняют функцию инициации фолдинга, но при этом они, по-видимому, имеют иную специфичность связывания с лигандом. Мы предположили, что такие замены должны сопровождаться ответными модульными перестановками в области “колена” ДХФ - вероятном участке связывания фибритина.

Как было отмечено выше, этот участок взаимодействия ДХФ с фибритином расположен в районе перегиба («колена») ДХФ, который у T-чётных фагов сформирован дистальной C-концевой частью пг 34 (проксимальная половина фибриллы) и белками пг35 и пг36, формирующими проксимальную часть дистальной половины фибрилл. Анализ полиморфизмов этих участков у различных T-чётных и дистантно-родственного им бактериофага RB49 позволил предположить, что за взаимодействие с фибритином отвечает C-концевой домен пг36, отграниченный от предшествующей части молекулы консервативной последовательностью GDTMTG (Рис. 28)

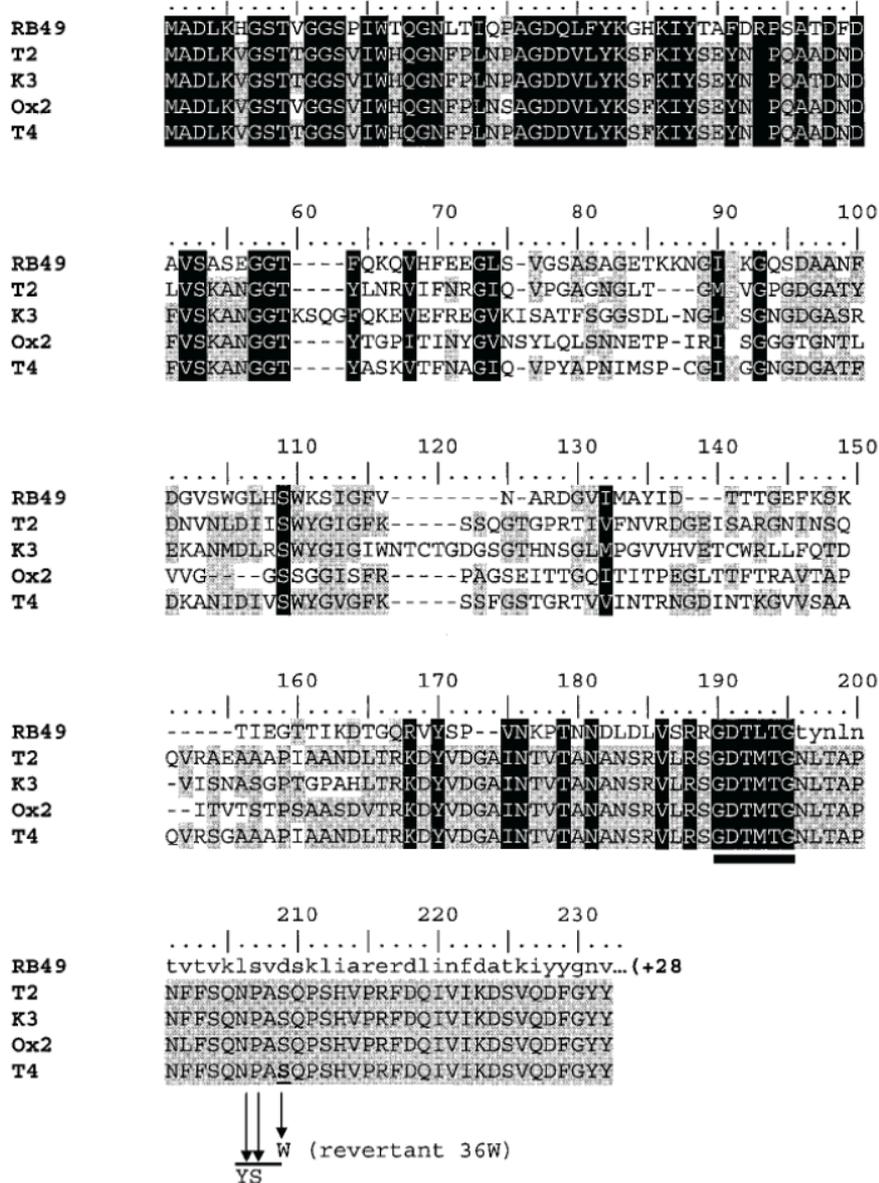


Рис. 28 Выравнивание аминокислотных последовательностей пг 36 ряда Т-чётных фагов и псевдо-Т-чётного фага RB49. После консервативного мотива GDTMTG у фага RB49 имеется большой 320 а.к. домен, негомологичный консервативному С-концевому домену пг 36 Т-чётных фагов, но имеющими гомологию с генами фаговых фибрилл. Стрелками показаны замены аминокислотных остатков у мутантов фага T4, сконструированных в нашей работе. Рис. взят из работы Letarov et al. 2005.

У многих фагов из групп псевдо-Т-чётных и шизо-Т-чётных нами была обнаружена несколько иная организация данного локуса: вместо генов 36 и 37, формирующих диктантную 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 (Рис. 29). Такая организация свойственна фагам RB42/43, фагу Aeh I, а также многим иным фагам данной группы, геномы которых были определены после нашей работы.

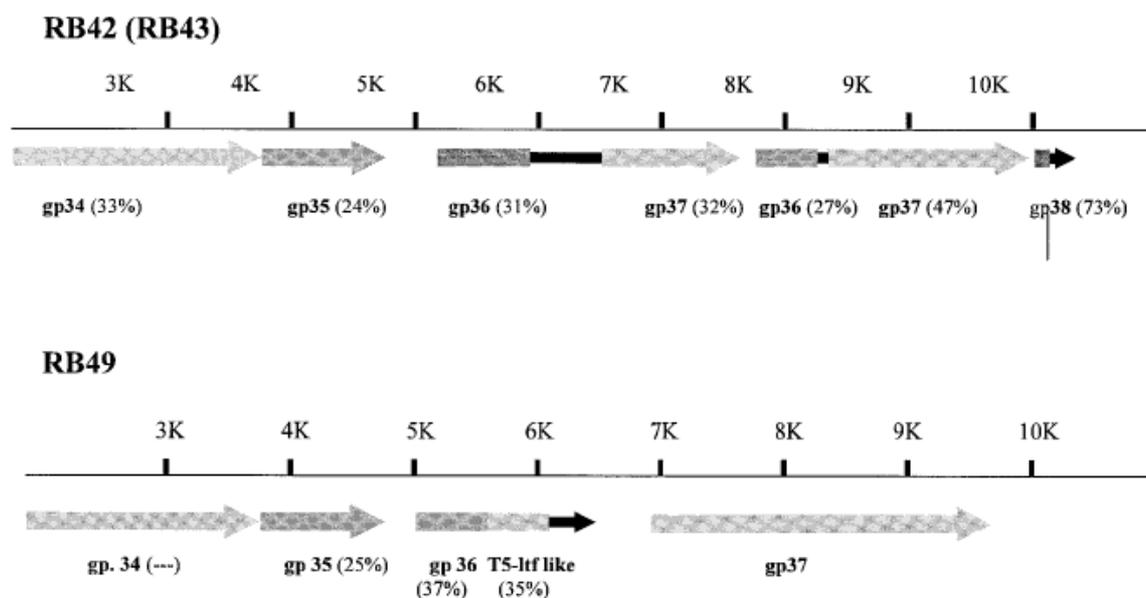


Рис. 29. Организация локуса ДХФ у фагов RB43/43 и RB49. В скобках - процент совпадения аминокислотных последовательностей различных доменов с соответствующими белками фага T2, для С-концевого домена пг 36 фага RB49 - с белком L-образных фибрилл фага T5. С изменениями из работы (Letarov et al. 2005)

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.

IV.2.4 Генетический анализ взаимодействия фибритин - ДХФ

Сопоставление первичных структур пг 36 (Рис. 28) обнаруживает наличие у Т-чётных фагов как минимум 3 потенциальных доменов. N-концевой консервативный домен, функция которого состоит во взаимодействии с пг 34 и/или пг 35, пластичный домен, последовательность которого отличается даже у близкородственных Т-чётных фагов, С-концевой консервативный домен, который имеет значительное сходство у

RB49 и T-чётных фагов в своей N-концевой области, но его C-концевая часть после консервативного мотива GDTLTG замещена на более длинный гетерологичный (по сравнению с T4) домен. Так как N-концевой домен пг 37, образующего дистальную часть дистальной половинки ДХФ, имеет значительное сходство у фагов RB49 и T4, логично предположить, что взаимодействие пг36 - пг 37 опосредуется N-концевым субдоменом C-концевого домена пг 36, в то время, как замещаемый C-терминальный субдомен, возможно отвечает за взаимодействие с фибритином. Это предположение хорошо согласуется и с данными о структуре локуса ДХФ у RB43 и других подобных фагов. В их генах дистальной части ДХФ произошло, по-видимому, объединение пг 36 и пг 37 в один полипептид, что обуславливает возможность потери C-концевого домена пг 36.

Таким образом, некоторые мутации в C-концевой части пг 36 у T-чётных фагов могут нарушать взаимодействие с фибритином, приводя к фенотипу, сходному с was-мутантами. Для фага RB49 фенотип was- не известен. Однако, у T4 мутанты по этому гену приобретают способность инфицировать клетки в присутствии ПЭГ (Follansbee et al, 1974), который нарушает работу молекулярного сенсора, блокируя ДХФ в неактивном, поднятом положении (см. обзор литературы). Подобным фенотипом обладали и ряд других мутантов, но именно картирование этих мутаций привело к открытию гена was (Follansbee et al. 1974).

Попытки получить вариант фага T4, полностью лишённый C-терминального субдомена пг36 потерпели неудачу: созданный нами амбер - мутант, S197am (остаток S 197 подчёркнут в последовательности пг 36 T4 на Рис. 28) оказался полностью нежизнеспособен на несупрессирующем хозяине. Возможно, делеция этой части белка нарушает фолдинг молекулы.

Однако нам удалось получить аминокислотные замены Ser 197 на Trp отбирая ревертантов исходной амбер мутации. Также мы получили ряд замен близлежащих аминокислотных остатков с помощью рекомбинации амбер-мутанта с клонами плазмидной библиотеки, несущей фрагмент гена 36 с рандомизированными нуклеотидами в выбранных позициях (см. Рис. 28).

Фенотип ПЭГ-устойчивости этих мутантов исследовали в сравнении с фагом T4 дикого типа, делеционным мутантом по гену was, полученным генно-инженерным способом (любезно предоставлен В.В. Месянжиновым) и ПЭГ-устойчивым мутантом, отобранным путём селекции в присутствии этого вещества, обозначенным как delta72.

Было обнаружено, что по гену 36 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%. Наш мутант delta72 также обладал полной устойчивостью к 6,4% ПЭГ (Рис. 30). Интересно, что у этого мутанта имелась делеция в рамке, укорачивающая *colied coil* регион фибритина на 72 а.к. Однако, анализ свойств делеционного мутанта по гену *wac*, созданного методами генной инженерии без отбора в присутствии ПЭГ также обнаружил фенотип частичной устойчивости.

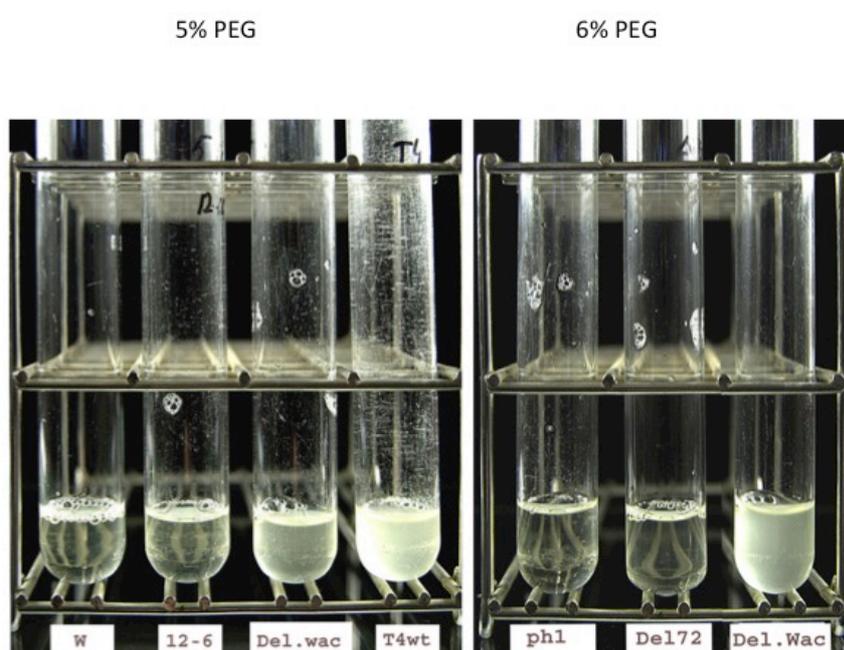


Рис. 30. Лизис культуры *E.coli Be/1* мутантами фага T4 по гену 36 (W, 12-6), ПЭГ-устойчивым мутантами (*del 72* и *ph1*), мутантом с делецией гена фибритина (*Del. Wac*) и фагом T4 дикого типа при различных концентрациях ПЭГ-6000 в среде.

По-видимому, в работе (Follansbee et al, 1974) был отобран множественный мутант, что было не замечено авторами (что, по-видимому, верно и для нашего мутанта delta72). В результате анализа этих данных и ранее опубликованных результатов (Follansbee et al. 1974, Brenner et al. 1962, Kostuchenko et al. 2004) нами была предложена двухстадийная модель срабатывания молекулярного сенсора фага T4 (Рис. 31.)

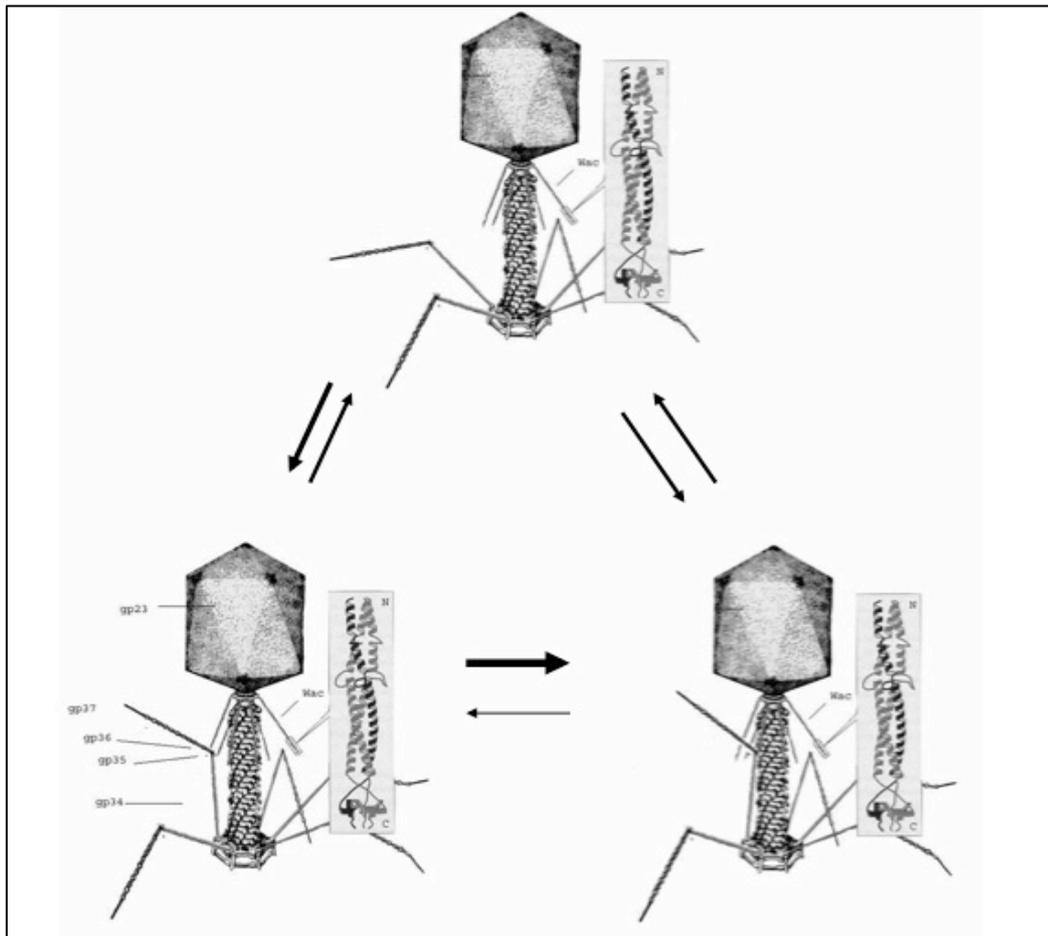


Рис. 31. Двухстадийная модель работы молекулярного сенсора фага Т4. ДХФ сначала «захватывается» фибритином в районе С-концевой части пг 36, а затем приводится в контакт с сократимым чехлом, где и фиксируется, обеспечивая блокировку инфекции. Последняя реакция может также осуществляться и напрямую, минуя взаимодействие фибритин-ДХФ, что объясняет частичную устойчивость к ПЭГ исследованных в работе мутантов фага. Из работы Letarov et al. 2005.

IV.2.5 Анализ эволюционной пластичности фибритина в контексте эволюции геномов бактериофагов, родственных Т-чёрным.

Эти работы проводились в рамках участия в проекте определения полных последовательностей геномов фагов, родственных Т-чёрным, 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 генома⁹, 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.

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, CVA120), 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 Т-чётным как индикаторов динамики сообщества в реальном масштабе времени не вполне ясен.

⁹ Следует отметить, что хотя автор принимал непосредственное участие в перечисленных исследованиях, формирование концепции кор-области геномов бактериофагов (не только Т-чётных) происходило в результате усилий большого числа исследователей и личный вклад автора не имел здесь определяющего значения. Соотнесение механизмов эволюции фибритина и остальной части геномов является, напротив, полностью результатом работы автора.

Полученные нами результаты позволяют предположить, что модульные перестановки С-концевых областей фибритина сопровождаются согласованными перестановками доменов или даже генов белков дистальной половинки ДХФ. Эти перестановки должны происходить практически одновременно, поскольку в противном случае произойдёт нарушение взаимодействия фибритин ДХФ, которое, хотя не является летальным для фага, но заметно уменьшает его приспособленность и, соответственно, такие фаги должны быть элиминировано отбором. Тот факт, что мы имеем свидетельства множества (не менее 6) таких событий, говорит о том, что либо существует достаточно мощный механизм сайт-специфических рекомбинаций, который может обуславливать направленное одновременное (или почти одновременное) изменение двух отдаленных локусов генома, либо о том, что селективное преимущество, получаемое фагом в результате замены соответствующих модулей очень велико. Для того, чтобы получить более строгие доказательства согласованности изменений в фибритине и ДХФ нужно обнаружить потомков недавнего рекомбинационного события такого рода и исследовать его последствия для физиологии фаговой инфекции.

Однако, 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 инсерций) повторяющихся аминокислотных мотивов между двумя мотивами, сходными с фолдоном фибритина Т4). 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 Т4, RB49, RB43, Aeh I, 44RR, JS98 (с двумя подтипами), KVP40 и фибритины, лишённые фолдона, как у фага PC42).

Мы построили филогенетическое дерево последовательностей главного капсидного белка фагов, у которых присутствуют гены фибритина (Рис.32).

Как видно из диаграммы, наличие фибритина того или иного типа хорошо коррелирует с филогенией главного капсидного белка gp23 этих фагов¹⁰. Таким образом, можно предположить, что активные модульные перестановки в данном

¹⁰ Следует отметить, что С-концевые домены типов 44RR и RB49 имеют сходную длину и проявляют слабую гомологию. Степень сходства аминокислотных последовательностей, однако, ниже, чем у coiled coil сегментов этих же белков, что позволяет считать эти типы разными.

локусе имели место в течение определённого периода эволюции данной группы, после чего по непонятным причинам стали значительно более редкими событиями.

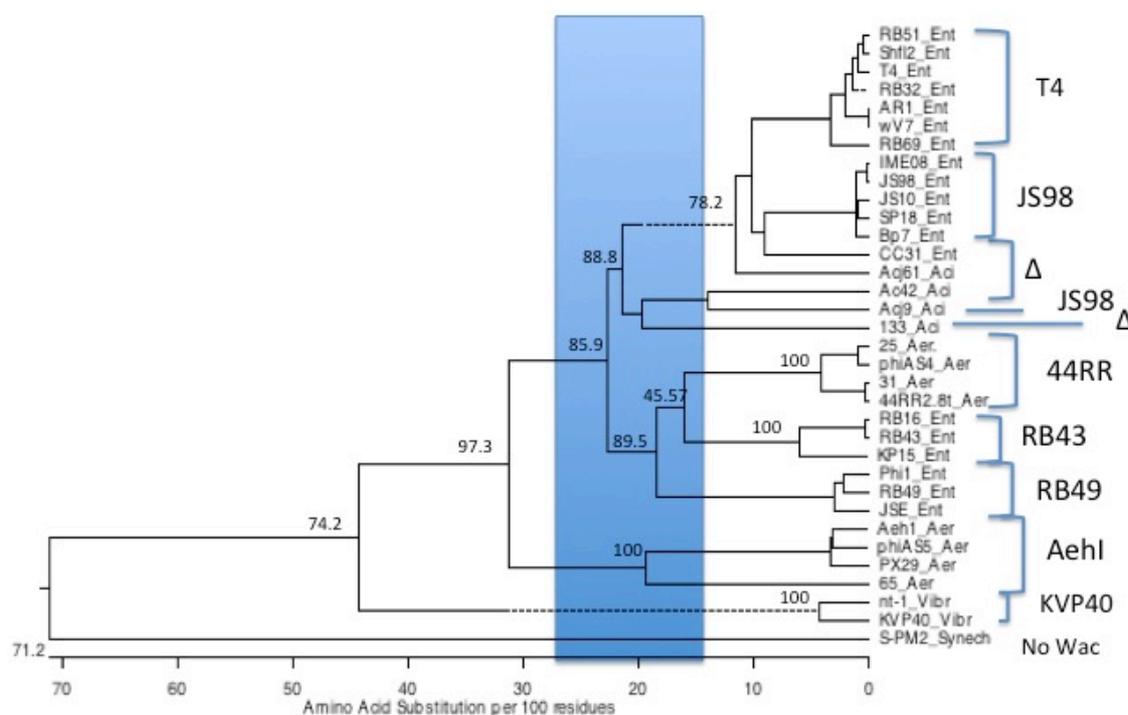


Рис. 32 Филогенетическое дерево последовательностей главного капсидного белка p23 (построено в программе ClustalW). Справа отмечены типы С-концевых доменов фибритинов, свойственных соответствующим фагам. Прямоугольником отмечен предполагаемый период, в течение которого происходили модульные перестановки этих доменов.

Природа селективных преимуществ, которые получили предковые формы фагов соответствующих линий от замен С-концевых доменов фибритина не известна. Как обсуждалось выше, существуют основания полагать, что функция этого белка может отличаться у различных фагов. В этой ситуации приобретения новой активности (например, связывание с клеточными рецепторами) может “окупать” потерю иной (например, элемента сенсора среды). В этом случае требование одновременной замены модуля ДХФ перестаёт быть столь существенным.

В любом случае, очевидно, модульные перестановки доменов в фибритине отражают, очевидно долговременную эволюционную динамику геномов

соответствующих фагов и не могут служить индикатором текущей экологической ситуации в микробном сообществе, откуда выделены эти вирусы.

IV.3 Исследование экологии и микроэволюции колифагов в природном микробном сообществе

Для того, чтобы охарактеризовать геномные полиморфизмы, отражающие современные (то есть такие, которые происходят *in situ* за промежутки времени, сопоставимые с временами полужизни вируса в соответствующей экосистеме) процессы адаптации фагов и могущие служить признаком интенсивной динамики (Red Queen dynamics) определённых природных сообществ необходимо было 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.

IV.3.1. Выбор модельного микробного сообщества

Ряд механизмов микроэволюционных адаптаций бактериофагов, в том числе модульных перестановок генов и белковых доменов, подобных описанным нами на примере фибриллярных белков фагов, родственных T-чёрным, могут обеспечивать адаптацию фаговых популяций в природных микробных сообществах *in situ*, в масштабах времени, сопоставимых с характерными периодами массообмена в этих сообществах. Как следует из современных теорий экологии бактериофагов (см. обзор литературы, а также работу Weitz et al. 2005), подобные полиморфизмы, наряду с менее масштабными мутационными изменениями, являются ожидаемыми признаками интенсивной динамической взаимной адаптации фагов и хозяев, которые могут быть выявлены при сравнении близкородственных изолятов фагов, полученных из одного и того же образца или из нескольких экологически связанных образцов.

Однако, до настоящего времени не существует хорошо разработанных и охарактеризованных модельных природных сообществ, которые бы: (1) включали вирулентные фаги (особенно желательны – вирулентные колифаги) в качестве своих автохтонных компонентов, (2) в которых реализовывалась бы интенсивная динамика взаимных адаптаций фаговых и (3) бактериальных популяций и которые были бы достаточно стабильны и доступны для исследования. До настоящего времени нет однозначного понимания, что является природным местообитанием различных групп вирулентных колифагов. Эти вирусы легко обнаруживаются в сточных водах, однако, во-первых, долговременно существующие резервуары сточных вод – это чисто техногенный феномен, существующий пренебрежимо короткое по меркам эволюции время, а во-вторых не вполне ясно, в какой степени вирулентные колифаги могут являться постоянным (автохтонным) компонентом какой-либо водной экосистемы. Проблема существования постоянных популяций колифагов в кишечных экосистемах животных также не была к моменту нашего исследования решена (см. обзор литературы, а также нашу работу Letarov and Kulikov 2009).

Тем не менее, поскольку, в отличие от вирулентных колифагов, природное 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. У лошадей переваривание целлюлозы – главного питательного компонента травы и сена, происходит в толстом кишечнике под воздействием сложного целлюлолитического микробного сообщества (Hintz and Cymbaluk 1994). При этом большой объём слепой и ободочной кишок уменьшает воздействие пристеночной микрофлоры на процессы, происходящие в просвете кишечника, что делает микробную систему несколько менее зависимой от физиологического состояния животного. Поскольку процесс гидролиза целлюлозы происходит именно в объёме кишечника, микроорганизмы, локализованные там, очевидно проявляют достаточную физиологическую активность, что отличает эту систему от кишечника мелких млекопитающих, например, мышей (Chibani-Chenouffi 2004). Наконец, промежутки между принятием пищи и между актами дефекации значительно короче, чем среднее

время удержания пищи в кишечнике лошади (около 48ч), что делает условия обитания микробного сообщества весьма стабильными по сравнению с кишечником человека или хищных животных.

Хотя прижизненное получение материала непосредственно из слепой кишки лошади крайне затруднительно (насколько нам известно, в мире поддерживаются только 2 группы фистулированных лошадей в Норвегии и Франции и нам не удалось установить коллаборацию соответствующими исследовательскими подразделениями), по имеющимся литературе данным (Milinovich et al. 2008) микробиом фекалий лошади в целом адекватно отражает микробное население слепой кишки с задержкой по времени около 24 ч.

Немаловажное преимущество лошадей как модельного объекта при исследовании экологии бактериофагов также состоит в том, что возможно отбирать большие по объёму образцы, соответствующие одной точке во времени, что сильно облегчает эксперименты, связанные с прямым выделением вирусного сообщества.

IV.3.1. Анализ морфологического разнообразия вирусоподобных частиц в фекалиях лошадей.

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.

Для выделения и очистки тотального вирусного сообщества мы использовали модифицированный метод осаждения вирусных частиц сквозь слой раствора глицерина, что позволяет эффективно отделять их от растворимых белков и полисахаридов. Этот метод даёт худшее качество очистки, чем широко употребляемая методика центрифугирования в градиенте хлористого цезия. Однако, некоторые бактериофаги не выдерживают условий подобной очистки (видимо, высокой ионной силы) и разрушаются. Поэтому для целей характеристики морфологического разнообразия мы решили избежать применения хлористого цезия. Для того, чтобы избежать механического повреждения мы использовали подложку из фреона 113. Это вещество не смешивается с водой и обладает плотностью >1.55 г/мл, что превышает

плавучую плотность частиц хвостатых бактериофагов. Поэтому при центрифугировании фаги не проникают в слой фреона, а остаются на его поверхности в виде пленки. При этом не происходит повреждения частиц, как в случае образования плотного осадка на дне пробирки.

Исследование очищенных из экстрактов фекалий образцов некультивируемого вирусного сообщества с помощью ТЭМ обнаружило присутствие большого количества фаговых частиц различных морфологических типов (Рис. 33).

Качество очистки было вполне удовлетворительным для целей ТЭМ. Однако, общее количество частиц не очень велико - их вероятная концентрация в исходном материале находится в пределах $10^8 - 10^9$ частиц/г, поэтому для накопления достаточного числа изображений, необходимых для количественного анализа состава некультивируемого сообщества, требуется сделать порядка 20 снимков. По этой причине для сравнительных исследований, при которых необходимо исследовать препараты некультивируемых вирусных сообществ из нескольких образцов, целесообразно применить дополнительные модификации процедуры - в частности, обеспечить большую эффективность адсорбции частиц на подложки сеток.

Мы охарактеризовали состав некультивируемого сообщества в двух образцах, полученных от разных животных. При этом к одному морфологическому типу относили частицы, которые не могли быть в наших условиях наблюдения различены по морфологическим деталям или размерам (см. например две частицы типа S8; рис.33). В случае мелких фагов (как типы P9 и P10; Рис.33), бедных морфологическими деталями, в один тип вполне могли быть объединены и генетически различные вирусы, но в случае крупных, морфологически необычных (например, типы M7, M19, S18 - Рис. 33) фагов это представляется маловероятным. В каждом образце было изучено около 100 индивидуальных изображений частиц или теней фагов.

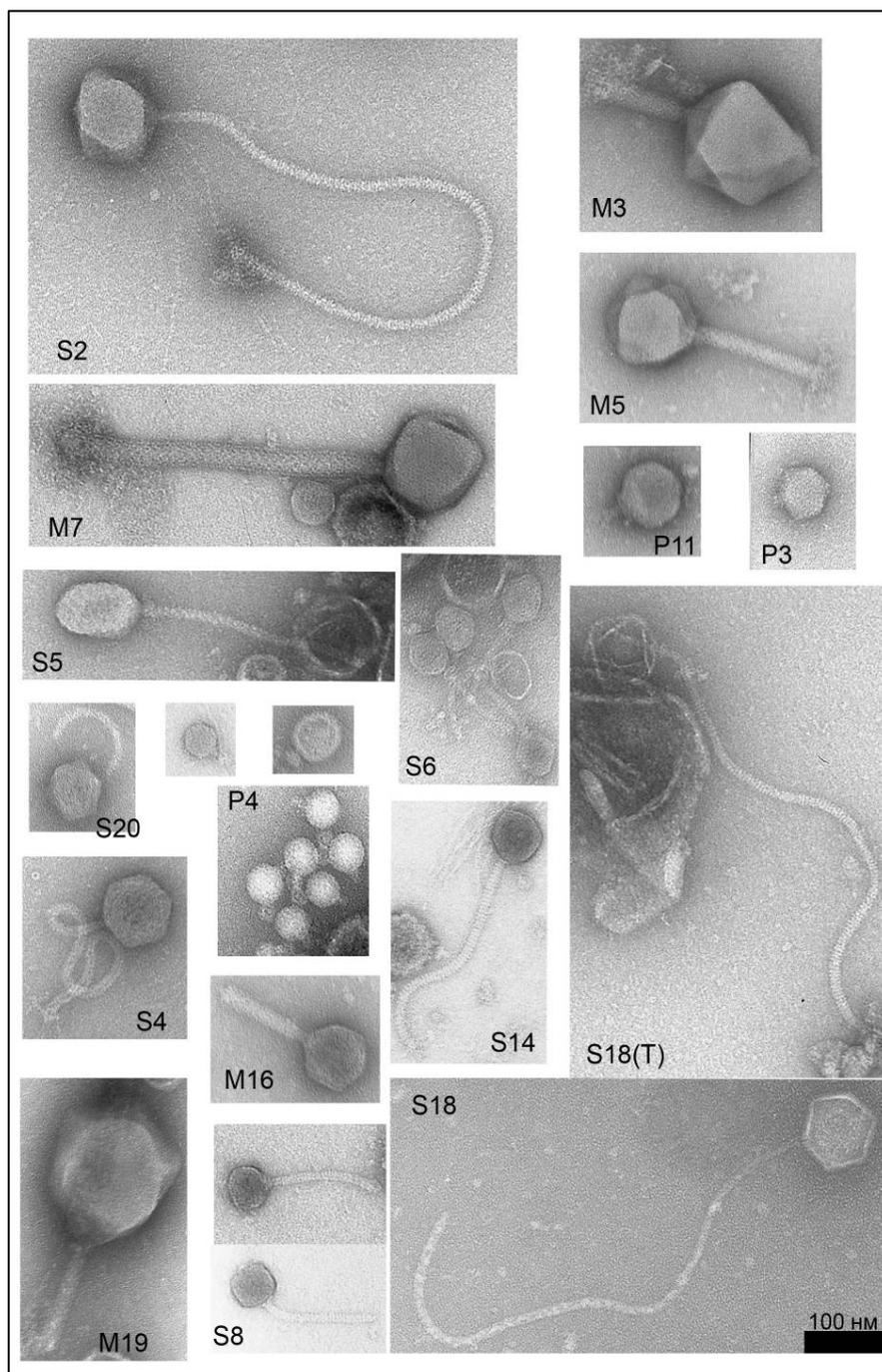


Рис 33. Морфологическое разнообразие вирусных частиц в некультивируемом вирусном сообществе лошади. *S-Siphoviridae*, *M – Myoviridae*, *P – Podoviridae*. Рисунок взят из нашей работы (Куликов с соавт. 2007)

Качество очистки было вполне удовлетворительным для целей ТЭМ. Однако, общее количество частиц не очень велико - их вероятная концентрация в исходном материале находится в пределах $10^8 - 10^9$ частиц/г, поэтому для накопления

достаточного числа изображений, необходимых для количественного анализа состава некультивируемого сообщества, требуется сделать порядка 20 снимков. По этой причине для сравнительных исследований, при которых необходимо исследовать препараты некультивируемых вирусных сообществ из нескольких образцов, целесообразно применить дополнительные модификации процедуры - в частности, обеспечить большую эффективность адсорбции частиц на подложки сеток.

Мы охарактеризовали состав некультивируемого сообщества в двух образцах, полученных от разных животных. При этом к одному морфологическому типу относили частицы, которые не могли быть в наших условиях наблюдения различены по морфологическим деталям или размерам (см. например две частицы типа S8; рис.33). В случае мелких фагов (как типы P9 и P10; Рис.33), бедных морфологическими деталями, в один тип вполне могли быть объединены и генетически различные вирусы, но в случае крупных, морфологически необычных (например, типы M7, M19, S18 - Рис. 33) фагов это представляется маловероятным. В каждом образце было изучено около 100 индивидуальных изображений частиц или теней фагов.

Подавляющее большинство наблюдаемых фагов относятся к порядку Caudovirales (хвостатые фаги). Было отмечено лишь несколько частиц, предположительно относящихся к семейству Microviridae. Частицы, похожие на вирусы животных, были отмечены только на одном снимке в составе небольшого агрегата. Исследованное некультивируемое вирусное сообщество весьма разнообразно по своему составу. Об этом свидетельствует тот факт, что большинство морфологических типов фагов были представлены единственной частицей. Однако, некоторые типы представлены несколькими частицами. Часть из них находилась в составе агрегатов, или несколько частиц обнаруживались рядом друг с другом лишь на одном снимке (например, типы P4 и S6 на Рис.33). В этих случаях их повышенная представленность в выборке может не отражать реального состава сообщества, и быть связанной со случайным обнаружением агрегата. Другие доминирующие типы обнаруживались в нескольких удалённых участках сеток, что свидетельствует об их высокой представленности в исследуемом образце. Интересно, что в исследованных сообществах встречается много фагов с очень длинными гибкими несократимыми хвостами, напоминающими пожарный шланг. Только у одного животного мы обнаружили 4 различных типа таких фагов (см. S2, S4, S18; рис.33). Фаги типа S18 обладают хвостом длиной около 700 нм. Этот морфотип являлся доминирующим у обоих животных и составлял около 10% всех

подсчитанных частиц. По-видимому, частицы фага S18 достаточно лабильны, так как большая их часть наблюдалась в виде теней (S18(T); Рис. 33), но нами было найдено также несколько интактных частиц. Обращает на себя внимание также обилие крупных бактериофагов с сократимыми хвостами, и диаметром головки 100-190 нм. Ни один из них не представлен более, чем 2 частицами. На рис. 34 представлено распределение числа описанных морфотипов фагов в зависимости от диаметра головки для одного из животных.

Всего у данного животного обнаружен 61 тип морфологически различимых фагов. Как видно из гистограммы, наиболее представлены классы фагов с диаметрами капсидов 55-75 нм, однако доля крупных фагов достаточно высока. Морфотип S18, численно преобладающий у обоих исследованных животных, является единственным типом с диаметром капсида около 100 нм.

Важнейшим результатом этого исследования является обнаружение большой доли вирусных частиц с большими размерами головки и, соответственно, генома. Фаги такой морфологии практически никогда не бывают умеренными, что означает, что в микробном сообществе кишечника лошади присутствует значительный процент вирулентных бактериофагов (с высокой долей уверенности можно предположить, что и доминировавший у них тип S.18 также является вирулентным фагом). Следовательно, физико-химические условия в кишечнике лошади не препятствуют размножению фагов в литическом цикле (как это можно предположить у людей или мелких млекопитающих - см. обзор литературы) и выбранное микробное сообщество характеризуется, вероятно, более активной динамикой взаимной адаптации фагов и их хозяев (Red Queen dynamics).

Полученные нами данные о разнообразии и встречаемости морфологических типов в целом согласуются с оценками Cann et al. [6]. Судя по низкой встречаемости большинства морфотипов и их разнообразию (мы выделили более 60 морфологически различимых типов), сообщество действительно насчитывает до нескольких сотен индивидуальных типов фагов. При этом доминирующие типы составляют 5-10% от общего числа частиц. Обращает на себя внимание обилие фагов с необычно длинным хвостом (типы S2, S4, S8, S17; Рис. 33).

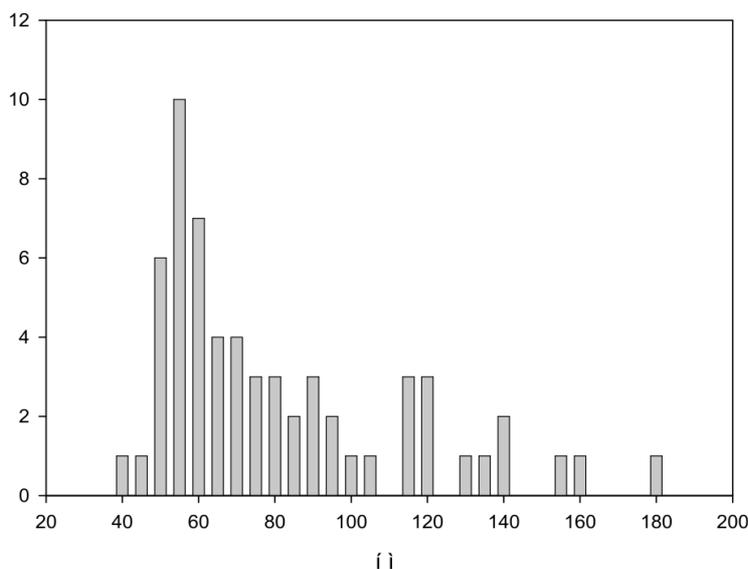


Рис. 34. Распределение количества описанных морфотипов бактериофагов из некультивируемого вирусного сообщества фекалий лошадей по классам в зависимости от диаметра капсида. Ширина класса 5 нм. Из работы Куликов с соавт. 2007.

Возможно, что в вязкой среде химуса толстого кишечника относительно крупные фаги получают значимое селективное преимущество, если их адсорбционный аппарат способен «сканировать» значительную область пространства вокруг капсида в поисках бактерии хозяина.

Можно отметить, что классический метод характеристики разнообразия вирусов в некультивируемом сообществе с применением ТЭМ даёт не меньший объём биологически значимой информации, чем секвенирование ограниченных (до 1000) выборок случайных клонов вирусной ДНК (т. н. «метагеномов»). Наличие банков микрофотографий высокого качества бактериофагов из различных естественных сообществ, снабжённых достоверными шкалами размеров, могло бы существенно облегчить сравнительные исследования. По нашему мнению, дорогостоящие исследования метагеномов должны непременно сопровождаться созданием библиотек микрофотографий, полученных на тех же образцах. Препаративная очистка доминирующих типов фагов из препаратов некультивируемого сообщества под контролем ТЭМ с их последующей генетической характеристикой позволила бы достоверно сравнивать представленность этих фагов в различных местообитаниях, например, в кишечнике особей животных одного вида, разделённых географически.

IV.3.2. Анализ временной динамики популяций колифагов в фекалиях лошадей культуральными методами¹¹

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.

Для решения задачи мы осуществили эксперименты по мониторингу титров колифагов, определяемых на тест-культурах лабораторных штаммов *E.coli*. Предварительные эксперименты с использованием штаммов: NM522, С600 и Ve/1 обнаружили, что титры колифагов в фекалиях лошадей, определяемые на этих тест-культурах хорошо коррелируют, причём максимальные титры определяются на штаммах С600 и NM522 (Рис. 35)

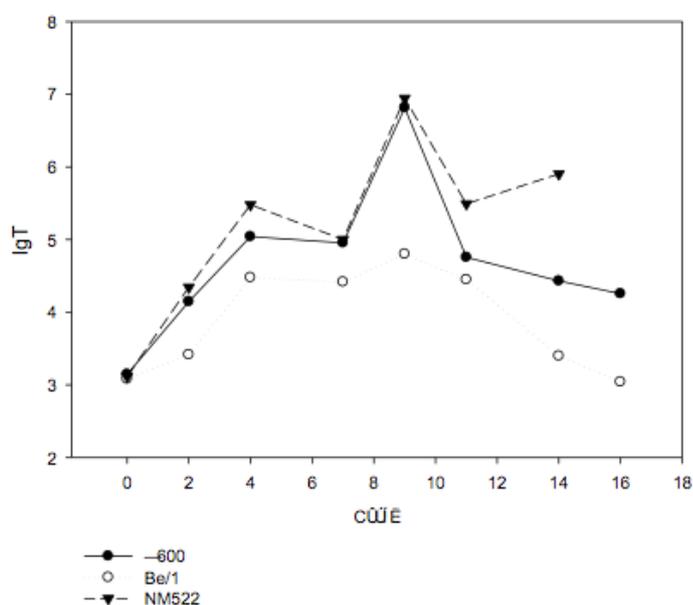


Рис. 35. Динамика титров колифагов, определённых посевами на штаммы *E.coli* С600, NM522 и Ve/1, у одного из исследованных животных (из работы Куликов с соавт. 2007).

¹¹ Эта часть работы проведена совместно с А.К. Голомидовой, которая выполняет кандидатскую диссертационную работу под научным руководством автора. При написании раздела использованы материалы статей: Golomidova et al. 2007, Куликов с соавт. 2007, Исаева с соавт. 2010.

Также в ходе пилотных экспериментов впервые были обнаружены колебания титров фагов на несколько порядков в течение достаточного короткого периода. Параллельно были оценены уровни разнообразия колифагов, высеваемых на данных штаммах из разных образцов. Поскольку у нас не было никаких предварительных предположений о возможном уровне этого разнообразия, мы использовали морфологический подход. Фаги получали с использованием накопительной культуры на чашках. Для этого предварительно оттитрованный экстракт фекалий высевали двуслойным методом с таким расчетом, чтобы на чашку приходилось $(1-3) \times 10^4$ б.о.е. После инкубации в течение ночи при 37°C слой верхнего агара отделяли, размельчали стеклянным шпателем, и экстрагировали равным объёмом физиологического раствора на качалке в течение 2 часов. После этого экстракт осветляли центрифугированием в тех же условиях, что и экстракт фекалий. В этих условиях посева образуется картина “сетчатого лизиса” газона. При этом различные фаги в течение большей части периода роста не конкурируют за клетки хозяина, что позволяет уменьшить вытеснение штаммов, растущих более медленно в условиях *in vitro*. Исследование препаратов таких накопительных культур методом ТЭМ обнаружило присутствие не более 2-4 морфологических типов колифагов в образце.

В совокупности полученные данные позволяли ожидать выявления согласованной динамики популяций колиформных бактерий по типу колебаний хищник-жертва.

Мониторинг численности колифагов, способных расти на лабораторном штамме *E.coli* C600, и сопряжённый мониторинг числа колиформных бактерий в фекалиях 4 лошадей проводился нами в течение 14-18 сут., причём образцы отбирались каждые 2 суток. Титры фагов определялись путём прямого посева экстракта фекалий или его разведений на газон индикаторного штамма, а титры колиформных бактерий - путём высева на селективную среду LTA, содержащую ДСН.

Эксперимент проводили на иной популяции лошадей, содержащейся на расстоянии около 10 км. В опыт были взяты 4 животных, у которых при первичном исследовании были обнаружены детектируемые на штамме C600 бактериофаги.

В результате нам удалось обнаружить сходную динамику титров колифагов с большой амплитудой изменений этого параметра за период наблюдения (Рис. 36). В то же время колебания численности потенциальных хозяев были выражены значительно слабее и не проявляли заметной корреляции с колебаниями титров фагов.

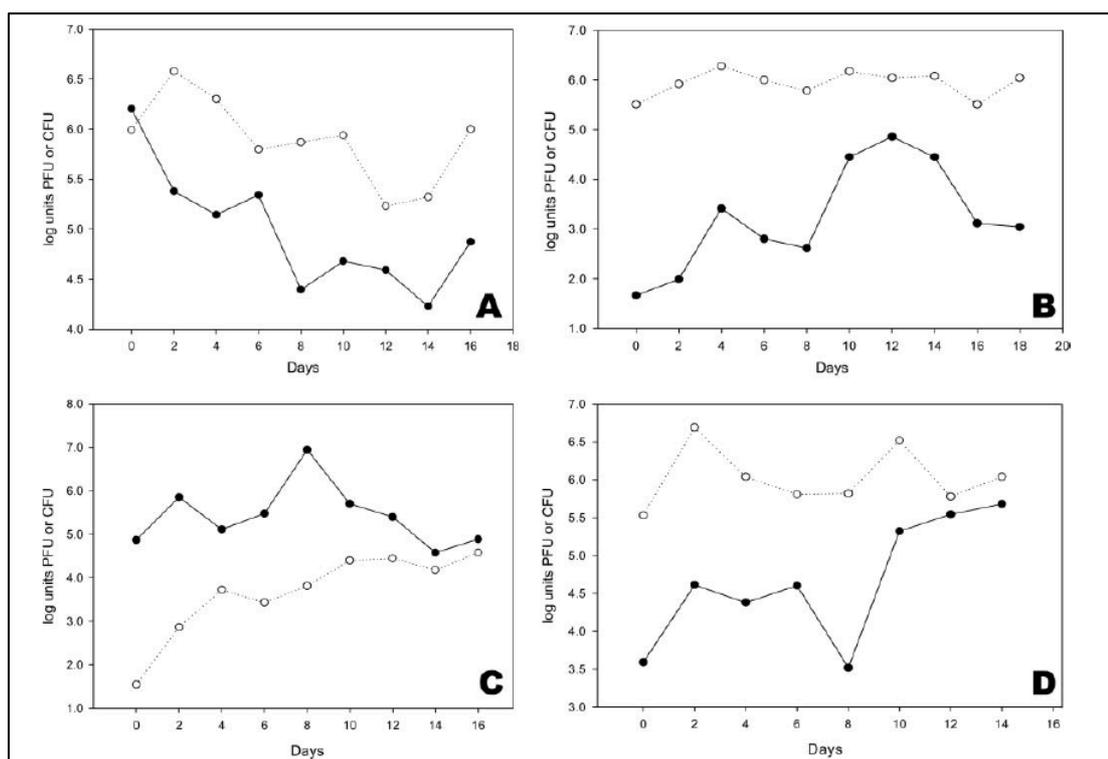


Рис. 36. Динамика численности колифагов, определяемых на индикаторном штамме *E.coli* S600 (тёмные кружки) и колиформных бактерий на среде LTA (светлые кружки) у 4 лошадей, обозначенных А, В, С и D (из работы Golomidova et al. 2007)

Для выяснения причин отсутствия взаимосвязи между колебаниями численности колифагов и их потенциальных хозяев необходимо было выяснить уровень внутривидовой гетерогенности

IV.3.3. Разработка метода высокоразрешающей дифференциации штаммов колиформных бактерий и анализ внутривидовой гетерогенности их популяций у лошадей¹².

Для выяснения причин отсутствия взаимосвязи между колебаниями численности колифагов и их потенциальных хозяев необходимо было выяснить уровень внутривидовой гетерогенности индивидуальных популяций колиформных бактерий у

¹² Данный этап работы проводился совместно с А.С. Исаевой, выполнявшей кандидатскую диссертационную работу в аспирантуре ИНМИ РАН под руководством автора.

экспериментальных животных. Однако для этой цели необходимо было применить достаточно производительный и при этом высокоразрешающий метод типирования, поскольку даже весьма близкие штаммы *E. coli* могут заметно различаться по чувствительности к различным бактериофагам.

Существующие в настоящее время методы типирования штаммов микроорганизмов, основанные на определении фаговой чувствительности и антибиотикорезистентности, имеют характерные и труднопреодолимые недостатки. Например, фаготипирование бактерий – это весьма трудоёмкий и материалоемкий процесс, не пригодный для массового скрининга изолятов, требующий создания и поддержания типизирующих коллекций бактериофагов, что сложно осуществимо в виду огромного штаммового разнообразия индигенной флоры (Daly et al. 2000, Dombek et al. 2001, Johnson and Clabots 2000, Johnson and O'Bryan 2000, Seurinck 2003) Гены резистентности к антибиотикам зачастую содержатся в плазмидах, легко теряющихся или приобретаемых в ответ на изменения окружающей среды и на появление новых штаммов микроорганизмов в системе, что вызывает вопросы о стабильности ряда «классических» фенотипических признаков для различных штаммов, и зависимости факторов резистентности от состояния окружающей среды.

Для молекулярной дифференциации штаммов в настоящее время широко используются универсальные системы ДНК-фингерпринтинга, такие, как риботипирование и ПЦР-анализ повторяющихся экстрагенных BOX (rep-ПЦР) и интрагенных (ERIC) последовательностей геномной ДНК (Johnson and O'Bryan 2000, Seurinck 2003). BOX-фингерпринтинг с праймером BOXA1R, специфичным к нуклеотидной последовательности локуса *boxA*, так же, как и ERIC-ПЦР, применяется для определения источников загрязнения воды, для классификации изолятов *E. coli*, выделенных из сточных вод, фекалий лошадей, коров и собак (Dombek et al. 2000, Johnson et al. 2004). Сравнительно высокое (70 %) содержание GC-пар в праймерах для BOX и ERIC-ПЦР (Johnson and Clabots 2000, Johnson and O'Bryan 2000) приводит к тому, что, что при используемой температуре отжига (52°C) эти праймеры могут гибридизоваться и инициировать синтез ДНК с частично комплементарной последовательности нуклеотидов. Такой неспецифический отжиг праймеров нестабилен, сильно зависит от температуры, следовательно, высокочувствителен к незначительным отклонениям от режима амплификации, что делает результаты сильно зависящими от качества используемого ДНК – амплификатора. Метод может

быть усовершенствован путем повышения температуры отжига, однако тогда параметры BOX и ERIC-ПЦР утрачивают свою универсальность, и праймеры должны быть оптимизированы для каждого рода бактерий в отдельности [10]. Эти особенности делают затруднительным сравнительный анализ профилей BOX и ERIC, полученных различными исследователями, и в различных сериях.

Риботипирование аутоштаммов *E.coli* основано на объединении штаммов в группы (риботипы) по признаку общности последовательностей генов 16S рРНК, которые являются универсальными генетическими маркерами (Daly et al. 2001). Варианты этого метода включают системы с анализом профилей гидролиза ПЦР-амплифицированного гена 16S рРНК эндонуклеазами рестрикции, и системы с секвенированием этих же амплификатов. Гены, кодирующие рРНК, весьма консервативны внутри каждого вида бактерий, что делает практически невозможной внутривидовую дифференциацию. Этот метод не обладает достаточной для вышеизложенных целей разрешающей способностью, зачастую не позволяет получать информацию о таксономическом положении исследуемого микроорганизма глубже видовой принадлежности, равно как и затруднителен с технической точки зрения, например, стоимость исследования, количество стадий, интерпретация получаемых данных.

Целью данного этапа работы было создание надежного и удобного в использовании универсального молекулярного метода экспресс-дифференциации штаммов энтеробактерий, основанного на ПЦР-амплификации последовательностей их геномной ДНК.

IV.3.1.1 Система IS1-фингерпринтинга.

Нами была разработана оригинальная система геномного ПЦР-фингерпринтинга, основанная на интерсателлитной амплификации ДНК между копиями инсерционного элемента IS1, наиболее широко представленного в геноме энтеробактерий (Golomidova et al. 2007). Реакция выполняется на целых клетках, разрушенных нагреванием, без предварительного выделения ДНК. В ней используется только один олигонуклеотид, отжигающийся на инвертированных терминальных повторах инсерционного геномного элемента причём 3'-конец праймера направлен вовне элемента. Таким образом, происходит амплификация ДНК, находящейся между копиями элемента IS1, и/или присутствующими в геноме сайтами потенциальной гибридизации праймера, не

связанными с копиями IS1, которые, возможно, являются остатками утраченных инсерционных элементов (Рис.37)

Длина получаемых в реакции продуктов специфической амплификации определяется взаимным расположением IS-элементов и (или) других сайтов гибридизации праймера в хромосоме бактерии, и лимитируется максимально возможной длиной фрагмента, синтезируемого в данных условиях ПЦР. Продукты, получаемые в ходе реакции, могут быть разделены и проанализированы обычным ДНК-электрофорезом в агарозном геле.

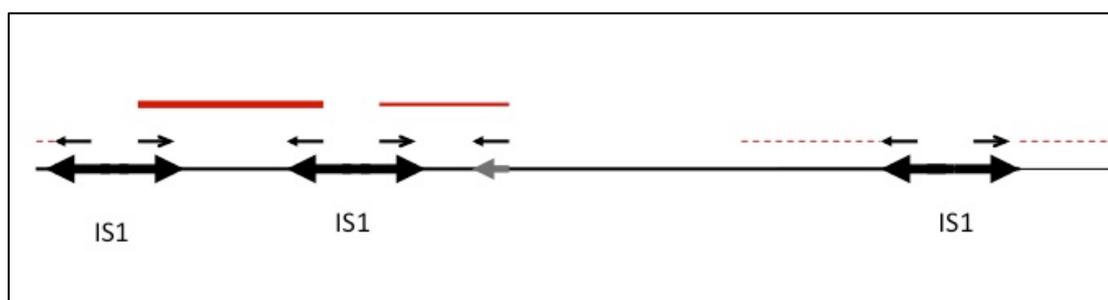


Рис. 37. Принцип геномного ПЦР фингерпринтинга с использованием праймера, гибридизующегося с терминальными повторами инсерционного элемента IS1 и сходными с ними участками ДНК.

Анализ результатов ПЦР с праймером IS1 показал, что для каждого исследованного аутоштамма колиформных бактерий характерен определенный паттерн полос ПЦР-продукта. Все получаемые полосы хорошо разделяются в агарозном геле. Их число в среднем составляет от двух до десяти, что упрощает процесс сравнения спектров между собой для выявления идентичных или близкородственных IS1-профилей. Так, например, среди аутоштаммов, выделенных из первого образца фекалий обнаружено 2 идентичных профиля (рис. 38, дорожки 12, 19), а среди выделенных из второго образца - 2 пары идентичных спектров (рис. 38 дорожки 28, 31; дорожки 37, 39).

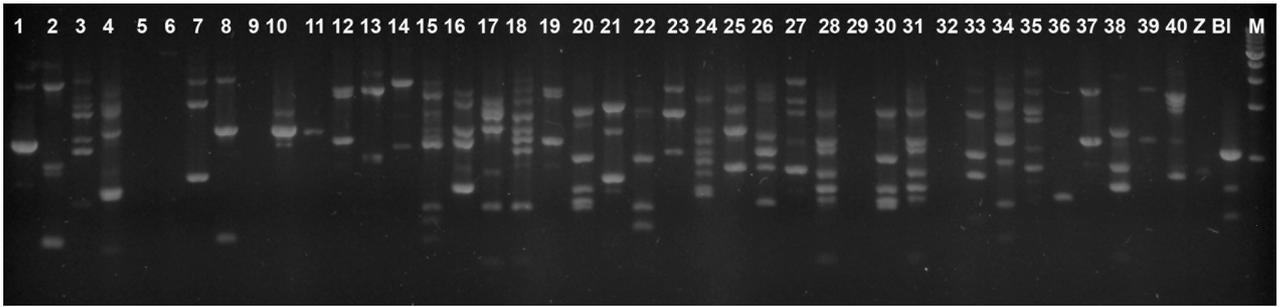


Рис. 38 Профили IS1 фингерпринтинга серий изолятов колиформных бактерий, полученных из двух разных образцов фекалий лошади (дорожки 1-20 и 1-40), показаны также профили лабораторных штаммов E.coli Z85 b BL21. M - маркер. Из работы Исаева с соавт. 2010.

Кроме этого, можно отметить 2 одинаковых паттерна между аутоштаммами из первого и второго образца фекалий (рис.38 дорожки 20, 30).

Для оценки воспроизводимости и помехоустойчивости созданной системы фингерпринтинга нами были поставлены несколько экспериментов.

Проверка устойчивости амплификации геномной ДНК-матрицы к различным физико-химическим факторам показала, что прогревание матрицы при 100°C в течение 10 минут не оказывает влияние на результат IS1-фингерпринтинга по сравнению с контролем, таким образом, возможные отклонения от режима прогрева при приготовлении образцов не будут иметь существенного влияния на результат. Можно отметить, что матрицы на протяжении всего эксперимента (около 3-х месяцев) хранились в морозильной камере и часто подвергались оттаиванию и замораживанию – качество и количество ПЦР-продукта IS1-фингерпринтинга при этом не менялось, равно как не менялся и получаемый паттерн полос. Вместе с тем, следует отметить, что внесение чрезмерно большого количества лизированной нагретом биомассы бактерий может приводить к ингибированию ПЦР, что требует постановки положительного контроля в каждой серии матриц с использованием штамма, заведомо дающего специфический паттерн.

Для проверки стабильности IS1-профилей при пассировании штамма был проведен следующий эксперимент: был выбран аутоштамм с легко читаемым IS1-паттерном, который затем провели через 5 последовательных пассажей в жидкой

среде LB. Разведения культуры из первого и последнего пассажей были рассеяны шпателем на чашках с твердой средой LB для получения отдельных колоний. IS1-ПЦР случайной выборки клонов (по 20 шт.) показал отсутствие изменений в паттернах субклонов по сравнению с исходным штаммом. Отсутствие различий между геномными паттернами исходного штамма и его потомков при небольшом числе генераций (около 50) делает предлагаемую систему пригодной для долгосрочных исследований динамики численности отдельных бактериальных штаммов в экотопах кишечника и в других системах.

Система IS1-фингерпринтинга устойчива работает на различных амплификаторах. Профили не отличались при использовании в ДНК амплификатора производства компании BIO-RAD (MJ mini Personal Thermal Cycler), и широко распространенного в России прибора «Терцик» компании ДНК-Технология. Как выход ПЦР-продукта, так и получаемые паттерны полос вполне совпадают. Использование различных видов полимераз Taq и Pfu, а также их смеси не повлияло на результат (данные не приведены). Таким образом, кинетические характеристики приборов для проведения ПЦР-амплификации не имеют определяющего значения для получаемого результата, что представляется преимуществом перед существующими альтернативными системами штаммового типирования микроорганизмов, такими как ВОХ-ПЦР, более требовательными к качеству используемого оборудования и реактивов. Самый первый коммерчески доступный ПЦР-амплификатор Perkin-Elmer Cetus (год выпуска — 1989) дал сходный выход и идентичный паттерн полос ПЦР-продуктов.

Сравнительная характеристика методов IS1-фингерпринтинга, ВОХ-фингерпринтинга и риботипирования энтеробактерий. Новый метод геномного IS1-фингерпринтинга мы сравнивали с уже существующими методами молекулярного ВОХ-фингерпринтинга и риботипирования. Для этого были использованы те же ДНК-матрицы, что и для IS1-ПЦР, и рекомендованные авторами метода (Rademaker and Bruijn 1997) сложные оптимизированные программы амплификации. Анализ результатов ВОХ-ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле показал, что амплифицированные фрагменты ДНК слабо разделяются, и их число составляет в среднем от 15 до 20 полос, что затрудняет поиск идентичных профилей без использования специального программного обеспечения. Выход ПЦР продукта получается меньше, чем при IS1-ПЦР. При оценке профилей были выявлены 4

идентичные группы (по 2-7 профилей) среди аутоштаммов, выделенных из третьего образца фекалий (Рис. 38). Таким образом, дискриминирующая способность этой системы, равно как и ее чувствительность, оказываются ниже, чем у предложенной нами системы.

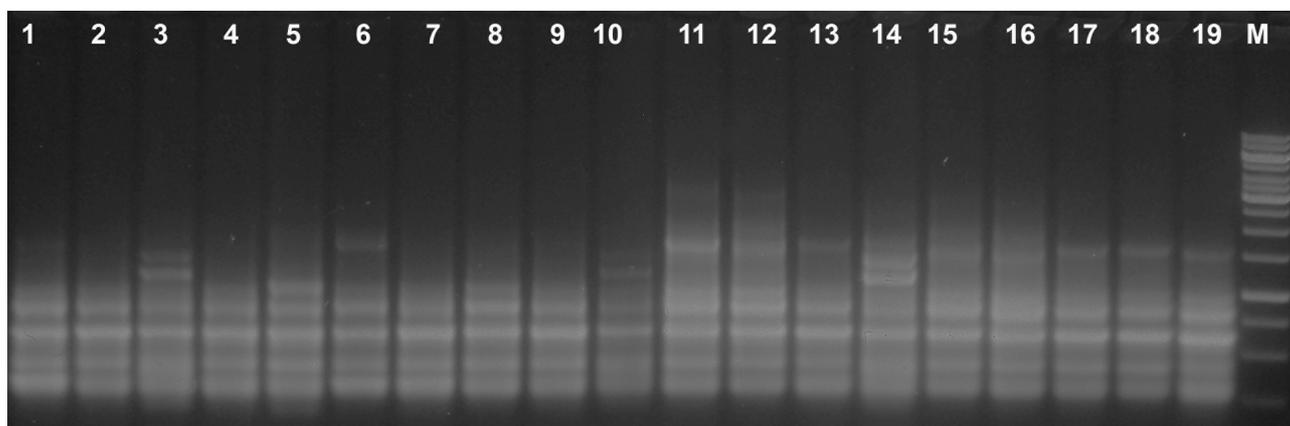


Рис. 38 Паттерны ВОХ-ПЦР тех же изолятов E. coli (см. рис. 37, дорожки 1 -19). Из работы (Исаева с соавт. 2010)

Проведение риботипирования оказалось наиболее трудоемким и требующим материальных затрат процессом по сравнению с ПЦР-системами - ВОХ- и IS1-фингерпринтингом. Этот метод включает в себя как ПЦР-амплификацию необходимого участка ДНК, так и последующий ферментативный гидролиз обессоленного ПЦР - продукта. Полученный результат не дал возможности выделить отдельные группы в пределах данной серии полевых изолятов E. coli, что свидетельствует о низкой разрешающей способности метода. Это связано с консервативностью последовательности гена 16S рРНК у отдельных штаммов одного вида бактерий, равно как и с неполным учётом возможных мутаций локуса – при рестрикционном анализе оказывается возможным обнаружить только мутации, затрагивающие тот или иной сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции, анализа всей последовательности, таким образом, не происходит. Альтернативой рестрикции в этом случае может служить секвенирование ДНК – дорогой и медленный метод исследования.

Использование IS1-ПЦР для различения близких штаммов, отличающихся по

чувствительности к бактериофагам. Восприимчивость к инфицированию отдельными расами фагов является одним из наиболее динамичных свойств бактерий, быстро эволюционирующим как в естественных, так и в лабораторных микробных сообществах. Для того, чтобы определить, достаточна ли разрешающая способность системы IS1-фингерпринтинга для надёжного различения близкородственных природных изолятов, различающихся по чувствительности к фагам, присутствующим в тех же сообществах, нами был поставлен следующий эксперимент.

Были выбраны четыре пары аутоштаммов энтеробактерий, выделенных из фекалий лошади: 2 пары идентичных по IS1 – профилям (в то же время они имеют одинаковые BOX-профили), и две – идентичных по профилям BOX – ПЦР. Эти аутоштаммы были протестированы на чувствительность к панели из 20 различных по специфичности фагов, ранее выделенным из фекалий лошадей в нашей лаборатории [6]. Зоны фагового лизиса были обнаружены только у изолятов, идентичных по IS1-профилям под действием колифагов № 12 и № 17. Следующим шагом было выделение собственных фагов из тех же образцов фекалий, из которых ранее были высеяны исследуемые аутоштаммы энтеробактерий. Было проведен посев экстрактов фекалий на газоны исследуемых штаммов двуслойным методом на среде LB, в результате которого было отобрано 200 фаговых бляшек. Каждый аутоштамм был протестирован на чувствительность к этой выборке фагов. Эксперимент показал, что штаммы имеющие идентичные профили по BOX – ПЦР, обладают разной чувствительностью к данной выборке фагов и, что интересно, имеют различные IS1-профили. При этом штаммы идентичные по IS1-профилям проявляют одинаковую чувствительность к бактериофагам. Данное утверждение справедливо только для природных изолятов, поскольку отбираемые в лаборатории фагоустойчивые мутанты имеют слишком малые генетические различия, не детектируемые методами фингерпринта

IV.3.1.2 Разработка усовершенствованных вариантов типирования.

Штаммы колиформных бактерий, не дающие ПЦР-продукта с нашей системой, относительно редки, и составляют в образцах высокогетерогенных сообществ фекалий лошадей лишь 5-10% от всех проанализированных штаммов. Однако, штаммы, дающие небольшое количество полос, иногда не могут быть дифференцированы с достаточной уверенностью.

Для того чтобы увеличить количество полос в паттерне и тем самым улучшить,

дифференцирующую способность системы, нами были разработаны праймеры, специфичные к инвертированным концевым повторам других, менее распространенных в геноме колиформных бактерий, инсерционных элементов (IS2, IS3, IS4, IS5, IS30), а также праймеры TR8D, TR8R и TR8834, комплементарные последовательностям нуклеотидов в гене транспозазы, который представлен значительным числом копий в геномах многих штаммов *E.coli*.

Постановка ПЦР с этими праймерами проводилась согласно методике, описанной выше. Реакции были поставлены с различными комбинациями олигонуклеотидов, однако наилучший результат был получен при использовании одновременно праймеров IS1 и TR8834. Аутоштаммы, дававшие при IS1-фингерпринтинге 2-3 полосы на электрофореze ПЦР-продукта (Рис. 39А), после ПЦР с парой праймеров IS1+TR8834 могли быть намного легче дифференцированы благодаря паттернам из 5-7 полос (Рис. 39В). Программа ПЦР с данной комбинацией праймеров не отличается от программы использованной для IS1-фингерпринтинга.

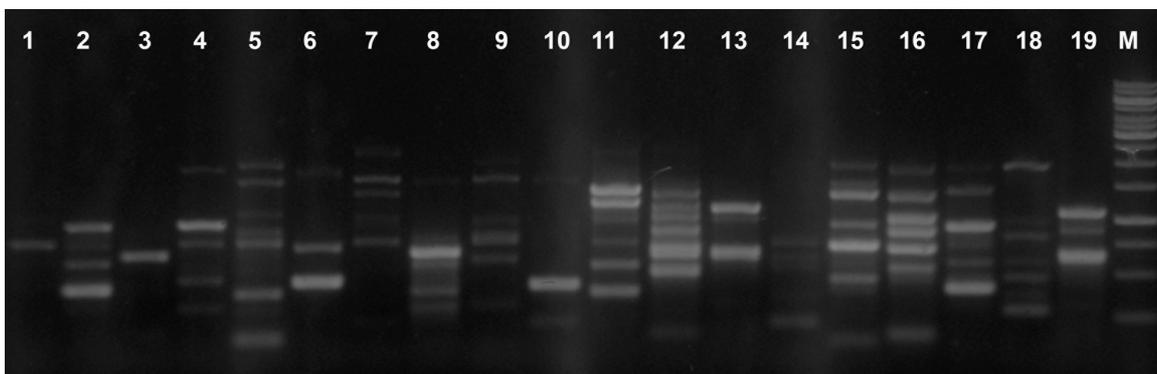
Высокая разрешающая способность системы маскирует более дистантное родство всё же генетически родственных штаммов. Это обстоятельство делает практически невозможным классификацию профилей IS1 фингерпринтинга на операционные таксономические единицы (OTUs) или построение на их основе филогенетических деревьев. Это ограничивает применимость нашей системы для ряда приложений, таких, как поиск санитарно-показательных штаммов энтеробактерий, указывающих на источник фекального загрязнения (Dombek et al, 2000).

Кроме того, IS1 – профилинг, ориентированный на энтеробактерий группы кишечной палочки, является менее универсальным по спектру исследуемых микробов, чем вышеперечисленные системы. Несмотря на введённые нами усовершенствования, имеется определённая небольшая доля штаммов, нетипируемых нашим методом (ПЦР – амплификация отсутствует).

В то же время, высокая разрешающая способность разработанной нами системы, сравнимая с фаготипированием, делает её «методом выбора» при исследовании микроэкологии бактериофагов энтеробактерий в естественных микробных системах, таких, как кишечник животных или сточные воды. В таких местообитаниях часто создаются условия, способствующие быстрой совместной микроэволюции фагов и их хозяев, что приводит к необычно высокой степени гетерогенности популяций бактерий на штаммовом уровне (Poullain et. al. 2008, Weitz et al. 2005). В результате,

даже близкородственные штаммы могут существенно различаться по чувствительности к присутствующим в экосистеме бактериофагам (Holmfeld 2007, см. также наши данные в этой работе). Очевидно, что высокая разрешающая способность системы, наряду с отличной воспроизводимостью результатов, могут быть крайне полезны и для целого ряда других задач, например, при прослеживании эпидемиологических цепочек распространения штаммов патогенных энтеробактерий среди людей или животных.

А.



В.

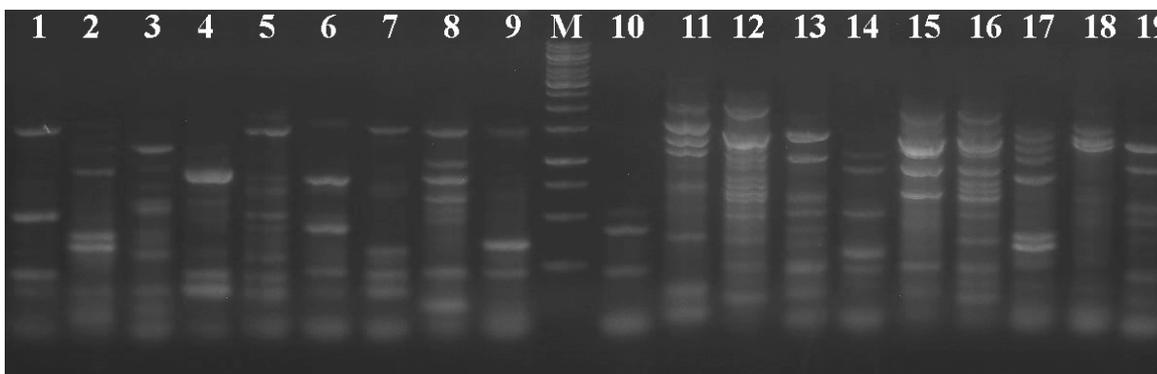


Рис. 39. ПЦР фингерпринтинг серии изолятов *E.coli* с использованием праймера *IS1* (А) и комбинации праймеров *IS1* и *TR8834* (В). Из работы (Исаева с соавт. 2010)

IV.3.4 Оценка уровней внутривидового разнообразия колиформных бактерий в индивидуальных микробиомах лошадей.

С помощью системы IS1-нами была проведена оценка уровня разнообразия колиформных бактерий в индивидуальных микробиомах лошадей, на которых осуществлялся эксперимент по мониторингу динамики титров колифагов и их потенциальных хозяев.

Для этой цели были получены серии по 30 случайно выбранных изолятов от каждого животного (из образцов, отобранных на 4 день). Были получены IS1 для всех этих изолятов. В образце А все 30 были разными. В образцах С и D имелось по одной паре идентичных профилей, а в образце В - две пары. Эти результаты свидетельствовали об исключительно высоком уровне разнообразия штаммов колиформных бактерий (в дальнейшем выборочное определение изолятов до вида показало, что подавляющее большинство их относится к виду *E.coli*). Для получения более точной количественной оценки мы проанализировали 63 дополнительных изолята из образца В. На основании данных по 93 типированным изолятам непараметрический критерий Chao1 (Chao 1984), рассчитанный с помощью программы Chao1 estimator (<http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>), предсказывает наличие более 1000 (от 684 до 1500 при $P < 0,05$) штаммов, различимых данным методом, в образце. Мы проанализировали также 3 дополнительных образца от животного В (от дней 2, 6 и 60), по 30 изолятов в каждой точке. Результаты качественно не отличались от вышеописанных, причём штаммы, явно преобладающие, отсутствовали.

Таким образом, отсутствие видимой взаимосвязи между колебаниями численности бактериофагов и колиформных бактерий, которое мы наблюдали, может быть логично объяснено тем, что доля популяции бактерий, чувствительных к фагам, определяемым на выбранных тест-культурах незначительна, поэтому колебания общей численности колиформ не обязательно должны отражать колебания числа фактически доступных хозяев для каждого отдельного типа колифага. Однако для более строгого подтверждения этой гипотезы необходимо было провести исследование разнообразия и широты хозяйского спектра колифагов, присутствовавших в исследованных нами образцах.

IV.3.5 Исследование разнообразия колифагов в индивидуальных микробиомах лошадей.

Нами были проведены также оценки разнообразия выделяемых колифагов. Зная по результатам пилотных экспериментов, что ожидаемое разнообразие не велико, мы

использовали более точный метод его характеристики, а именно выделения серий изолятов из отдельных бляшек, полученных при первичном посеве с их дальнейшим культивированием и исследованием.

Нами были исследованы 10 изолятов, полученных от 4 животных нашей экспериментальной группы в один и тот же день. Генотипы фагов дифференцировали с помощью рестрикционного анализа геномной ДНК. Среди 10 исследованных изолятов обнаружено 4 различных генотипа (Рис. 40)

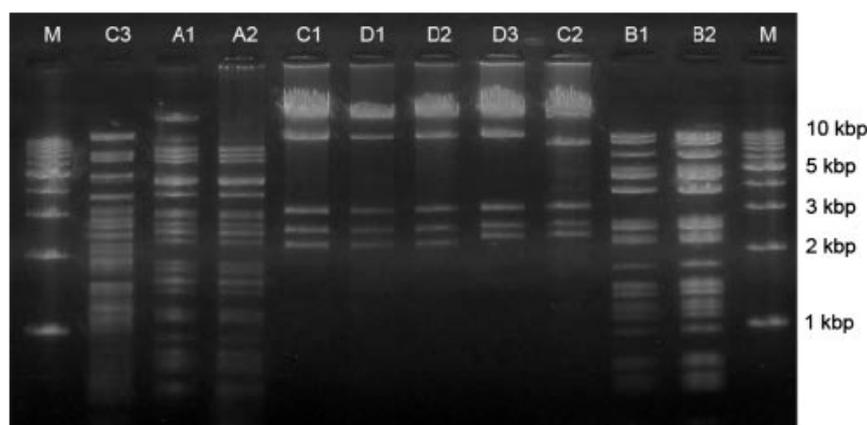


Рис. 40 Анализ профилей рестрикции геномной ДНК 10 фаговых изолятов, полученных на штамме *E. coli* С600 с помощью фермента *Eco* RV. Буквы А, В, С и D в обозначениях изолятов указывают на одно из четырёх животных, от которого получен данный изолят (из работы Golomidova et al. 2007)

Дополнительный рестрикционный анализ с помощью фермента *Dra* I позволил разделить некоторые генотипы на подтипы (Табл. 5). Окончательная идентификация этих фагов до уровня филогенетических групп (имеющих уровень рода в современной таксономии бактериофагов) производилась с помощью секвенирования случайных фрагментов генома и морфологического исследования методом ТЭМ с негативным контрастированием.

Для всех 10 изолятов были найдены близкородственные фаги с полностью известными геномами. Уровни сходства определенных нами нуклеотидных последовательностей с этими геномами были более 92%, что в сочетании с совпадающей морфологией вирионов даёт уверенность в точности идентификации. Кроме того, идентификация была подтверждена путём амплификации и

секвенирования гена главного белка капсида всех 6 изолятов, отнесенных к типам I и II.

Ге нотип	П одтип	Изол яты	Диа метр гол овки, нм	Дл ина хвоста, нм	Семейс тво	группа (ближайший родственный геном)
I		C3	100 x75	10 0	Myoviri dae	псевдо-T4- четные (колифаг JS98)
II	1	C1, D2	70	19 0	Siphovi ridae	T5- подобные (колифаг T5)
	2	C2, D3				
	3	D1				
III	1	A1	65	11 0	Myoviri dae	Felix01 - подобные (колифаг Felix01)
	2	A2				
IV		B1, B2	65	11 0	Myoviri dae	Felix01 - подобные (колифаг Felix01)

Табл. 5 Генотипы фагов, выделенных на штамме *E. coli* C600 (из работы Golomidova et al. 2007)

Интересно, что все 10 изолятов относятся к различным группам вирулентных колифагов.

Мы также исследовали разнообразие фагов, выделяемых при использовании в качестве тест-культур собственных штаммов колиформных бактерий (далее аутоштаммов), выделенных из тех же образцов.

Оказалось, что при использовании аутоштаммов, различающихся по IS1 профилю в качестве хозяев для выделения фагов от того же животного, что послужило источником этого штамма, обнаруживаются различные типы бактериофагов (Рис. 41)

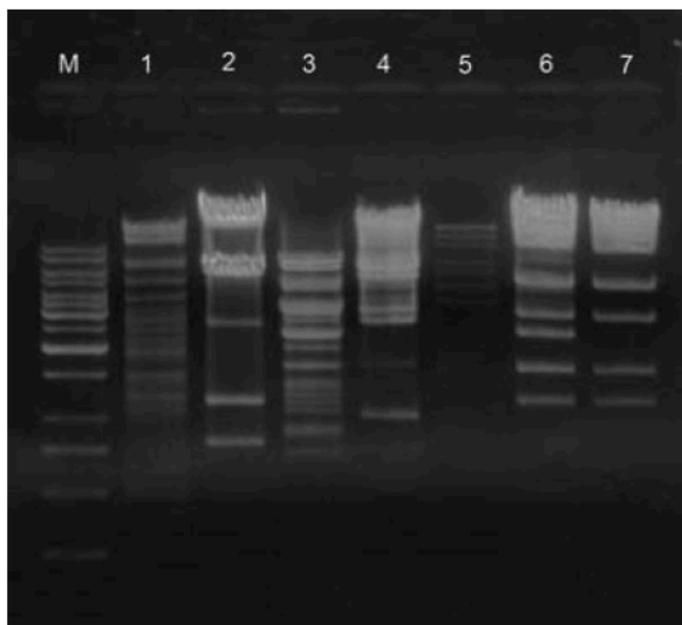


Рис. 41 Рестрикционный анализ (*EcoRV*) бактериофагов, выделенных с использованием 5 аутоштаммов, полученных из того же образца фекалий лошади. Изоляты 1 и 2 получены штамме, изоляты 6 и 7 - на втором, прочие изоляты на своих индивидуальных штаммах. Из работы (Golomidova et al. 2007).

Интересно, что уровень разнообразия фагов, выделяемых на каждом отдельном аутоштамме оказывается крайне невысоким и как правило ограничивается одним (или несколькими очень близкими по рестрикционному профилю), редко двумя генотипами. Этот вывод был подтвержден в нескольких экспериментах, в которых мы выделили и охарактеризовали серии из нескольких изолятов, полученных на одном штамме. Так, при анализе 5 серий, включающих по 6 изолятов, которые были получены на 5 аутоштаммах из трёх образцов фекалий от трёх животных из нашей экспериментальной группы. Все эти серии оказались гомогенны. При ретроспективном (с использованием замороженных образцов) с разверткой во времени состава колифагов, выделяемых на одном из аутоштаммов у животного В (были проанализированы образцы от дне 0, 4, 8, 12 и 16 по 10 изолятов в каждой точке во

времени) было обнаружено, что изменения доминирующего генотипа не происходит, несмотря на колебания титра фага до 3 порядков.

Некоторые изоляты бактериофагов, полученные на аутоштаммах лошадей в ходе вышеописанного эксперимента по мониторингу, так и вне его рамок, были определены по методике, описанной выше для изолятов колифагов, инфицирующих *E.coli* C600. Всего (включая вышеописанные) было определено около 30 изолятов (Табл. 6). Для 5 из этих фагов нами были определены и аннотированы полные последовательности геномов. Все изоляты (за исключением одного фага, принадлежность которого к известной группе установить не удалось) относятся к ранее описанным родам (в некоторых случаях статус рода формально еще не установлен) вирулентных фагов. Умеренные фаги в пуле свободных частиц колифагов у лошадей не были обнаружены.

Этот результат является важным свидетельством того, что в условиях экосистемы кишечника лошади, в отличие от аналогичного экотопа человека и некоторых других животных (мыши, собаки - см. обзор Letarov and Kulikov 2009, а также обзор литературы в этой работе), происходит активное размножение бактериофагов в литическом цикле.

С учётом приведённых выше данных о высоком внутривидовом разнообразии *E.coli* в индивидуальных микробиомах этих животных можно высказать предположение, что селективное давление фаговой инфекции может быть одним из факторов, формирующих и поддерживающих это разнообразие за счёт действия механизма 'kill the winner' (см. обзор литературы). Строгое доказательство этого предположения потребовало бы согласованного мониторинга динамики популяций определенного штамма и его фагов, а с учётом вероятной ретикулярной организации взаимосвязей фаг-хозяин в этой системе, задача может оказаться еще более сложной. На данном этапе нам не удалось найти методический подход, который бы позволил успешно решить эту проблему. Однако косвенное подтверждение этой гипотезы может быть получено из исследования спектров хозяев и генетической пластичности полученных изолятов колифагов.

IV.3.1.4 Анализ спектра хозяев выделенных вирусов.

Спектр хозяев изолятов фагов, полученных в ходе мониторинга был исследован с использованием набора тест-культур, включавшего несколько лабораторных штаммов *E.coli* так и ряд полевых изолятов колиформных бактерий.

Все полученные изоляты бактериофагов (за исключением серий изолятов, упомянутых выше, которые нами не анализировались) обнаружили различные паттерны хозяйской специфичности (Табл. 7). Все аутоштаммы, использованные для выделения и тестирования фагов были идентифицированы с помощью секвенирования гена 16S РНК и ближайший гомолог во всех случаях оказался E.coli. Единственным исключением был штамм Sc5, который был отнесен к роду Klebsiella.

Ближайшие родственные фаги с известным геномом (Семейство)	Полевые изоляты
T5 и BF23 (Siphoviridae)	<u>DT57C, DT57-1/2</u> , 25c-600, 27c-600, 30c-600, 9g6c-600R, MPC600
N4 (Podoviridae)	<u>G7C, G8C, ALT-63, St10y, 4sGβ</u>
T4 (Myoviridae)	JS98C3
φEco32 (Podoviridae)	10Gy, 4c7S
T7-подобный Фаг Cd1 <i>Caulobacter</i> (Podoviridae)	φКТ, φКТ30-70
Фаги , K1-капсульных штаммов <i>Escherichia coli</i> (Siphoviridae)	Lc3, Gos1, <u>DLL</u> , SLC1, 10Gx, 86
rv5 (Myoviridae)	δ1y
Felix01 (Myoviridae)	12 c-600, 17 c-600, 32 c-600, 35 c-600
не идентифицирован	9gc-600

Табл. 6. Результаты идентификации полевых изолятов колифагов, полученных из фекалий лошади. Жирным шрифтом выделены фаги, для которых нами определены полные последовательности геномов. Из работы (Golomidova et al. 2007).

Интересно, что фаги 1с и 7с, инфицирующие этот штамм, также были способны расти на некоторых лабораторных штаммах и полевых изолятах E.coli. Наличие заметных различий в спектрах хозяев очень близких в генетическом отношении

колифагов, полученных из экологически связанных образцов, отражает, по-видимому, высокую пластичность фаговых детерминант хозяйской специфичности в процессе адаптации бактериофагов *in situ*.

Test strain	Result for bacteriophage isolated on indicated strain																
	ICS								<i>E. coli</i> C600								
	Sc5		Sc7	Sc8	Sc6	Sc4			A1	A2	B1	B2	C1	C3	C2	D1	D2
1c	2c	4c	5c	6c	7c	8c											
Sc4	-	±	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
Sc5	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sc6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sc7	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sc8	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S1/7	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
S1/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
S4/2	-	-	-	±	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
S3/104	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S3/117	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
S2/33	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
S2/34	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C600	+	-	+	±	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Be/1	±	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
BL21	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Z85	-	-	-	±	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Табл. 7. Тестирование хозяйской специфичности изолятов колифагов на лабораторных штаммах и полевых изолятах колиформных бактерий. Буквы А,В,С и D в обозначениях штаммов, полученных на *E.coli* C600 обозначают животное, послужившее источником выделения данного фага. + - хороший рост; +/- - слабый рост, с бляшкой почти не выходящей за границы укола зубочистки, значительно меньшей, чем на штамме, использованном для выделения; - - отсутствие роста. Из работы (Golomidova et al. 2007).

В большинстве случаев фаги, выделенные на аутоштаммах *E.coli*, обладали сравнительно узким спектром хозяев. В связи с этим возникает вопрос: насколько велика часть общей популяции колиформных бактерий, способных давать рост на среде LTA, которая может инфицироваться средним изолятом бактериофага, полученного на одном из этих штаммов?

Для ответа на этот вопрос мы проводили два типа экспериментов. В одном из них серия случайно выбранных штаммов бактерий использовалась для выделения фагов, после чего выборка первичных бляшек с каждого из газона тестировалась с помощью пересева на свежие газоны всех штаммов. Во втором эксперименте выбранный фаговый изолят использовали для приготовления фагового агара, на который переносили по несколько сотен колоний со среды LTA. В обоих экспериментах получали от 0 (ниже порога детекции) до 4% чувствительных штаммов. Таким образом

концентрация доступных хозяев колифагов составляет около $10^3 - 10^4$ Б.О.Е./г, что находится на грани концентрации, обеспечивающей воспроизведение фага (Wiggins et al. 1983). В этой ситуации можно предположить, что популяции отдельных штаммов фагов находятся постоянно на грани исчезновения из данной экосистемы, поскольку плотность доступных хозяев не обеспечивает их размножения со скоростью большей, чем скорость выноса частиц с фекалиями. Однако проведенные нами исследования говорят о том, что отдельные штаммы фагов сохраняются как минимум в течение нескольких недель. В ряде случаев при повторных исследованиях тех же лошадей, мы обнаруживали соответствующие штаммы фагов спустя 2-3 месяца, и даже через 2 года (LC3 - подобные фаги, N4 - фаги). В то же время T5 подобные фаги исчезли из экосистемы конюшни, в которой мы проводили исследования через два месяца после завершения эксперимента по мониторингу.

Нужно также отметить, что фаги, выделенные спустя длительные промежутки времени (1-3 года) существенно отличались, хотя были весьма близкородственными ранее выделенным изолятам. Это может отражать микроэволюционные изменения, происходящие *in situ*. Таким образом, некоторые бактериофаги обладают способностью к длительной персистенции в микробиоме кишечника лошади (или в связанных между собой путями латеральной передачи вирусов микробиомах нескольких животных) в течение весьма длительного времени. Механизмы подобной персистенции нуждаются в отдельном экспериментальном исследовании.

Таким образом можно выделить следующие основные особенности экологии природных кишечных колифагов у исследованных нами лошадей:

- Свободные вирусные частицы природных колифагов, присутствующие в кишечном вириоме клинически здоровых лошадей, представлены преимущественно вирулентными фагами.
- Популяции отдельных штаммов фагов, титр которых можно определять на заранее выбранном индикаторном штамме, подвержены резким колебаниями численности, что отражает, по-видимому, экологические события в данной микробной системе.
- Природные кишечные колифаги имеют достаточно узкий спектр активности в отношении индигенных штаммов колиформных бактерий, присутствующих в тех же образцах, что обуславливает конкуренцию вирусов за доступные клетки хозяев. Этот процесс находит отражение в низком разнообразии фагов, выделяемых на любом

выбранном аутоштамме при высоком разнообразии, наблюдаемом при использовании различных тест-культур.

- Выделение сходных штаммов фагов от животных содержащихся на одной конюшне, свидетельствует о возможности эффективной передачи фагов (и, вероятно, их хозяев) фекально - оральным путём. В этой ситуации в качестве среды, в которой происходит микроэволюция этих вирусов следует рассматривать не микробное сообщество кишечника отдельной особи, но метамикробиом локальной популяции лошадей.

В совокупности эти данные позволяют заключить, что в микробной системе кишечника лошади колифаги оказывают селективное давление на популяции своих хозяев. При этом происходит активная взаимная адаптация вирусной метапопуляции (то есть, совокупности фагов, потенциально способных инфицировать колиформных бактерий) и метапопуляции колиформ (в значении совокупности присутствующих в данной экосистеме штаммов). По-видимому, фаговая инфекция является одним из факторов, обуславливающих установление и поддержание высокого уровня внутривидового разнообразия колиформных бактерий. В целом с точки зрения экологии колифагов, микробная экосистема кишечника лошади является высокодинамичной как в отношении численности отдельных популяций, так и пластичности геномов фагов. Эта экологическая ситуация резко отличается от той, которая по данным литературы (см. обзор литературы) имеет место у людей, а также ряда иных видов млекопитающих.

IV.4 Исследование полиморфизмов генов адсорбционного аппарата у экологически связанных изолятов колифагов.

По-видимому, одновременное присутствие в кишечном микробиоме лошадей очень близких, но различающихся по спектру хозяев вирусов, отражает быструю динамику геномов в процессе адаптации (микроэволюции) *in situ*. Это утверждение подкреплено детальным анализом динамики и разнообразия популяций колифагов, которые обсуждены выше. Однако необходимо было подтвердить экспериментально наличие экологически значимых последствий обнаруженных генетических изменений для физиологии фаговой инфекции (в особенности - их влияния на спектры хозяев). Это исследование также необходимо для проверки обратного утверждения - что

наблюдаемые полиморфизмы являются индикаторами экологических взаимоотношений по типу Red Queen dynamics. В качестве подобных индикаторов модульные перестановки белковых доменов или целых генов представляют особый интерес, поскольку их легче детектировать, чем точечные мутации и при соответствующей локализации такие полиморфизмы реже бывают криптическими.

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

IV.4.1 Модульные перестановки генного уровня в адсорбционном аппарате изолятов N4-подобных бактериофагов.

Базовым геномом для исследования N4- подобных фагов послужил бактериофаг G7C. Этот вирус был выделен в ходе работы по исследованию разнообразия колифагов у лошадей, которая описана выше. Одновременно с ним был получен близкородственный изолят G8C (Рис. 41, дорожки 6 и 7 соответственно). Хозяином этих изолятов является аутоштамм E.coli 4s, полученный от того же животного (С). В целом геном этого вируса обнаруживает значительное сходство с геномом колифага N4, уровень идентичности аминокислотных последовательностей в среднем 60-80%. Морфологически частицы фага G7C весьма сходны с фагом N4, но в строении адсорбционного аппарата имеются заметные отличия (Рис. 41).

Однако, в области ранних генов имеются существенные отличия (Рис. 42), но 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 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 CVA120 - миовирусов, белки адсорбции которых подобны хвостовым шипам подовирусов (Kutter et al. 2011, Walter et al, 2008), что позволяет предполагать химерное происхождение их геномов.

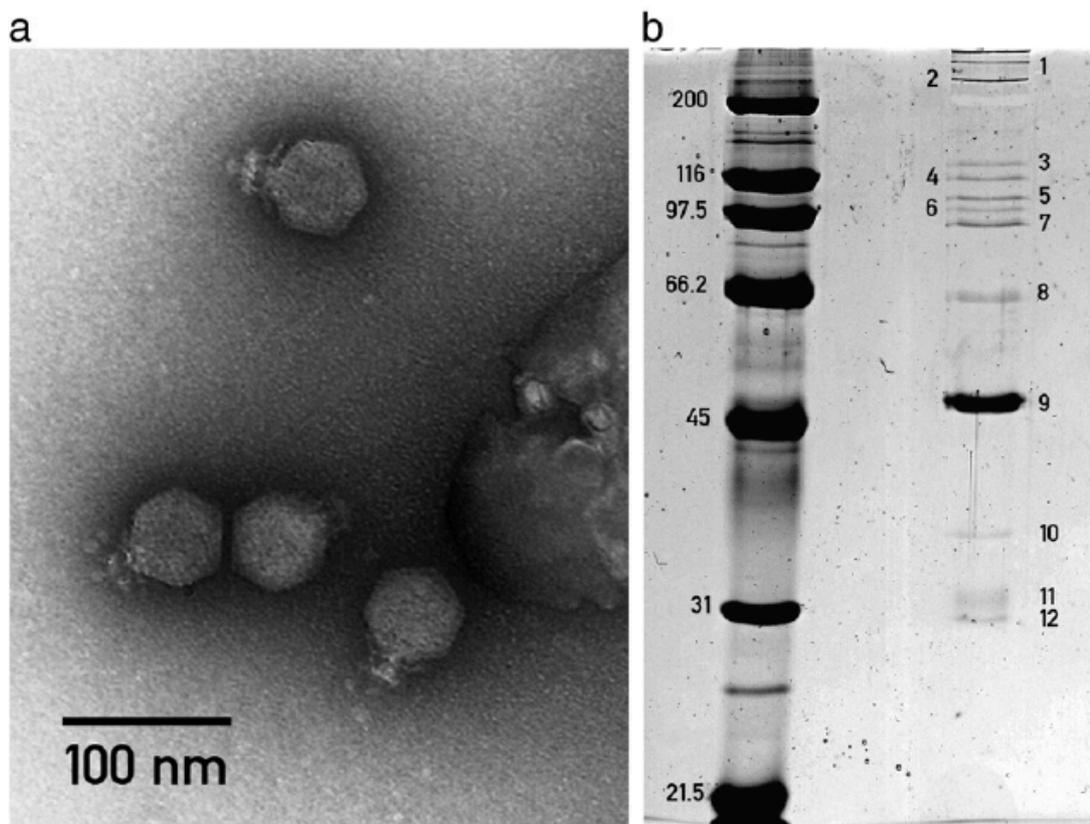


Рис. 42. “а” Электронная микрофотография частиц бактериофага G7C. Увеличение **x25 000**. “б” ДСН-ПААГ электрофорез белков вириона фага G7C. Белки идентифицированы с помощью MALDI-TOF спектроскопии: 1- неидентифицированный белок; 2 - пг 50 - вирионная РНК полимераза; 3 -пг 63.1 - белок адсорбции; 4 пг 66 - белок адсорбции; 5 - пг 59 - портальный белок; 6 - пг 56 - главный белок капсида (вероятно, димер), 7 - пг 63.1; 8 - пг 51; 9 - пг 56; 10 - пг 54; 11 - пг 17 - декорирующий белок капсида и пг 67 - предположительно белок хвоста; 12 - клеточный белок Отр А, соочищающий с фаговыми частицами. Рисунок из работы (Kulikov et al., 2012)

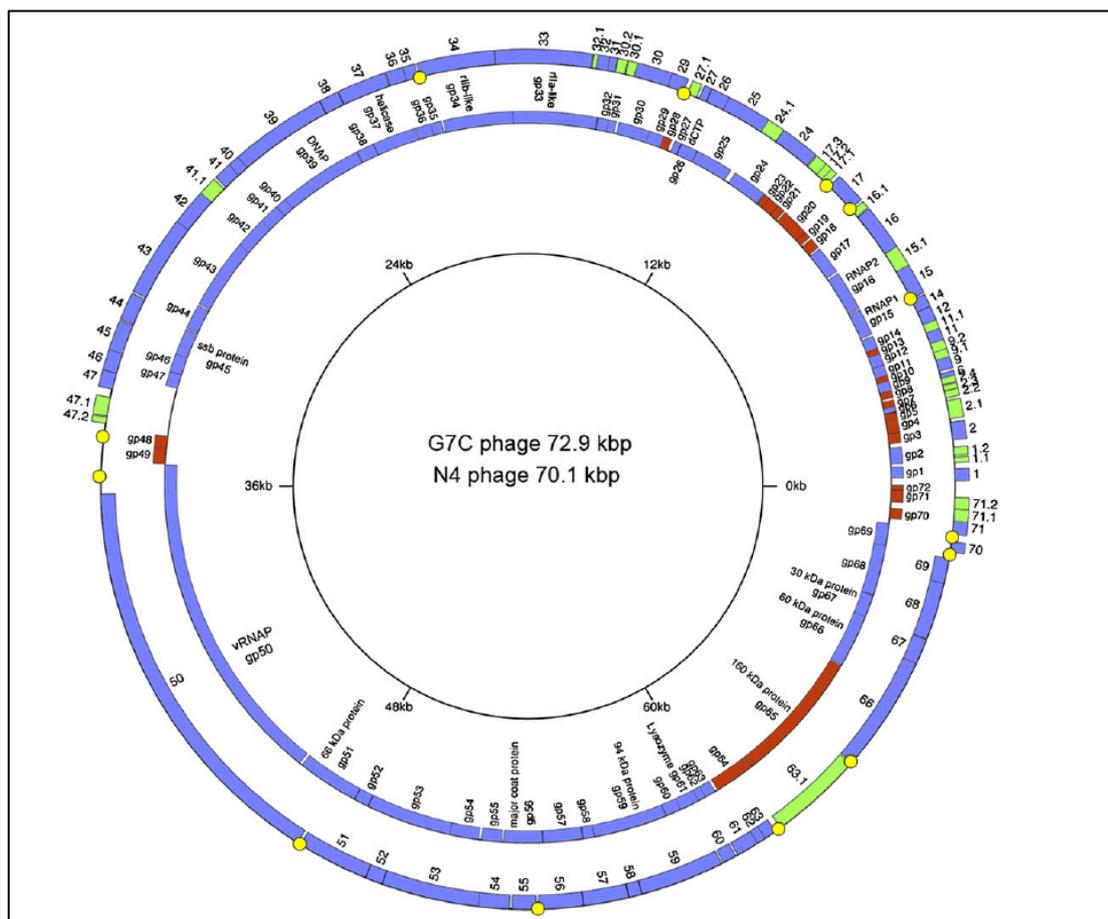


Рис. 42 Сравнение геномных карт бактериофагов G7C (внешний круг) и N4 (внутренний круг). Геномы представлены в кольцевой форме для компактности рисунка. Гены, присутствующие у G7C, но отсутствующие у N4 показаны зелёным, гены N4 гомологов которых нет у G7C – красным. Жёлтые кружки отмечают потенциальные терминаторы транскрипции в геноме G7C которые отсутствуют у N4. Рисунок из работы (Kulikov et al. 2012).

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. 43). 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.

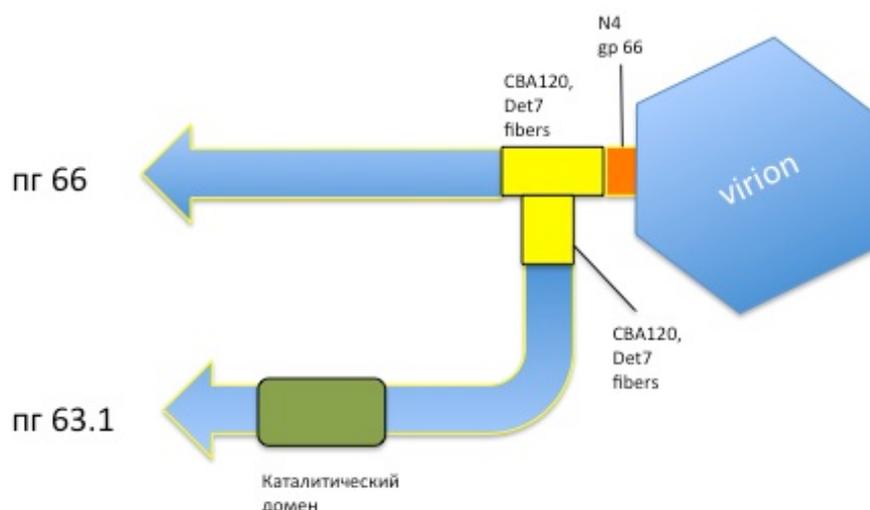


Рис. 43. Схема предполагаемого соединения фибрилл фага G7C с вирионом. Отмечены участки гомологии аминокислотных последовательностей с пг 66 фага N4 и с фибриллярными белками фагов Det7 и CBA 120.

С помощью алгоритма поиска консервативных доменов программы BLAST (ncbi.nlm.nih.gov) в последовательности белка пг 63.1 предсказывается наличие каталитического гидролазного (липазного или эстеразного) домена. Присутствие каталитических доменов, гидролизующих дистальные части полисахаридов ЛПС весьма характерно для подовирусов грам-отрицательных бактерий (Casjens and Molineux 2012), однако такая активность не была обнаружена у частиц фага N4. Функции пг 66 фага N4 - его единственного фибриллярного белка не известны.

Гетерологичная экспрессия белков адсорбционного аппарата фага G7C 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. 44).

Связывание 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. Таким

образом этот фибриллярный белок фага G7C непосредственно участвует во взаимодействии с клеточными рецепторами хозяина.

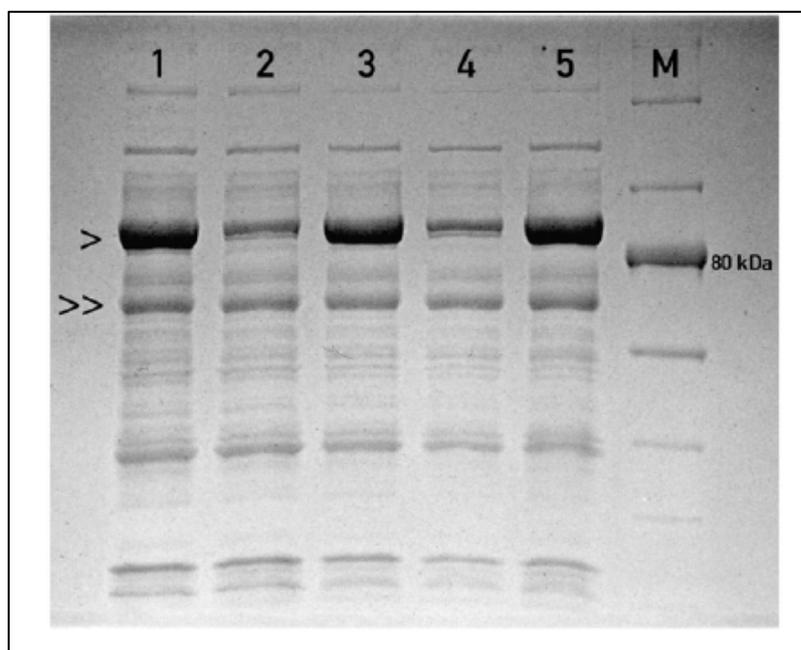


Рис. 44. Транзитное связывание пг 63.1 фага G7C с клетками *E.coli* 4s.

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.

Белок пг 66 экспрессируется значительно слабее, чем пг 63.1, но тем не менее он получен в растворимом нативном состоянии. Связывание этого белка с клетками не наблюдалось. Таким образом, его роль в адсорбции фага остается неизвестной. Вполне возможно, что функция пг 66 чисто структурная (является частью разветвленного адгезина и обеспечивает присоединение пг 63.1 к вириону), однако детальное экспериментальное исследование данного вопроса выходит за рамки этой работы.

При секвенировании генома фага G7C наряду с основной последовательностью генома нами был получен дополнительный контиг, содержащий гены, гомологичные генам 63.1 и 66, но достаточно отдаленные от них в филогенетическом отношении по

кодируемой последовательности аминокислот. С праймеров, отжигающихся в пределах этого контига удавалось секвенировать (используя тотальную геномную ДНК в качестве матрицы) последовательности, идентичные фланкирующим область генов белков адсорбции областям генома G7C. Эти результаты однозначно указывают, что отправленная на секвенирование ДНК фага G7C содержала значительную примесь ДНК другого очень близкого бактериофага, отличающегося модулем адсорбции. Этот фаг был нами назван ALT. Каталитические домены в белках ALT не обнаруживаются. Ген *b6-alt* не имеет участка гомологии с *pg 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 *pg 63.1-alt*, но его *pg 66* не отличался от *pg 66* G7C. Этот фаг был назван ALT63. Спектр хозяев ALT63 отличается от фага G7C, в частности, он растёт на культурах 4sR отобранных на устойчивость к G7C. Секвенирование ряда фрагментов генома ALT63 общей протяженностью около 5 т.п.н. выявило 100% идентичность нуклеотидных последовательностей с фагом G7C, что свидетельствует о том, что один из этих фагов возник из другого в результате очень недавнего рекомбинационного события.

От животного, послужившего источником фага G7C и от другого животного, содержавшегося на той же конюшне, нами были выделены также другие близкородственные, но имеющие определённые отличия вирусы (Рис. 45). Таким образом группа близкородственных G7C фаговых штаммов персистировала в данной экосистеме не менее 3 лет.

Таким образом, нами охарактеризованы геномные полиморфизмы адсорбционного аппарата у N4-подобных фагов, заключающиеся в полной замене всего модуля адсорбции на неродственный, а также в модульной замене отдельных генов в пределах одного типа данных модулей (фаги G7C-ALT63-ALT). При этом, если первая модульная замена, имевшая место на отрезке эволюционного пути от общего предка фагов N4 и G7C, произошла в неизвестный момент времени и под влиянием не известных нам селективных факторов, то последние имели место в весьма недавнем прошлом от нескольких дней до первых лет до момента выделения соответствующих изолятов и могут быть атрибутированы как результат микроэволюции во вполне определённых экологических условиях кишечной микробной экосистемы лошади.

Некоторые из этих полиморфизмов достоверно связаны с переключением спектра хозяев, что подтверждено экспериментально.

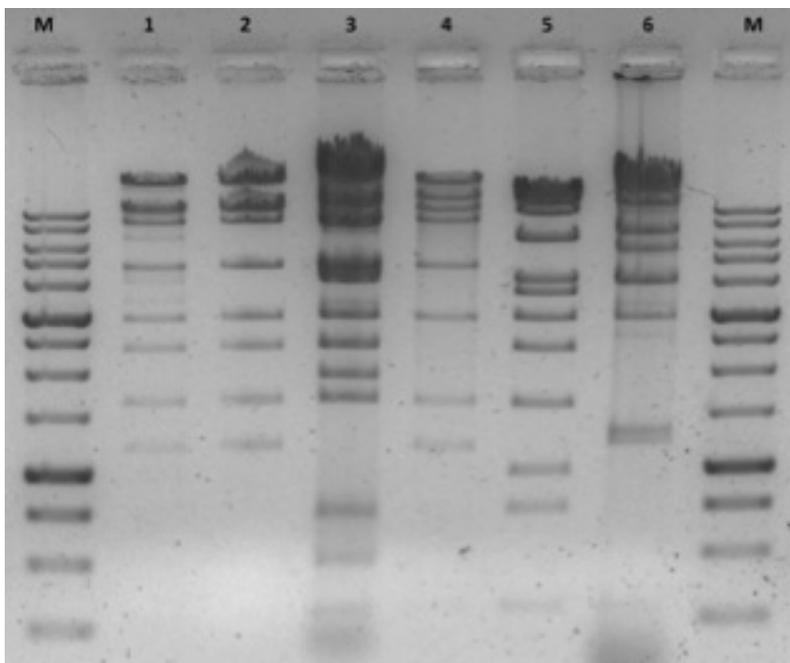


Рис. 45. Рестрикционные профили изолятов фагов, родственных G7C (*EcoRV*). 1- G7C; 2- 9C; 3 - ALT63; 4-G8C; 5 - St103y; 10Gβ

IV.4.1 Модульные перестановки субгенного уровня в адсорбционном аппарате изолятов T5-подобных бактериофагов.

В процессе исследований разнообразия и динамики колифагов у лошадей, а также в ходе последующей работы нами были выделены 8 близкородственных изолятов T5-подобных бактериофагов. Эти вирусы оказались значительно ближе в эволюционном отношении к прототипу группы - колифагу T5 по нуклеотидной последовательности (уровень идентичности до 98%). В то же время эти изоляты имели достоверные различия в спектрах хозяев. Генетические причины этих различий были исследованы 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, но в

последовательности аминокислот имеются области существенной дивергенции белков BF23 и наших изолятов (Рис. 46)

DT57C	1	MGFFAGKYS DGKTVLSLNTASGGDINAHKNPSTNTIFHSDMPFVLVESTYESALSSAGNG	60
		MGFFAGKYS DGKTVLSLN +GGDINAHK P+ NTIFHSDMPFVLVESTYESALS+AGNG	
BF23	1	MGFFAGKYS DGKTVLSLNVGGDINAHKTPNANTIFHSDMPFVLVESTYESALS+AGNG	60
DT57C	61	FYVCQMPSDIVNLKSNDPGRVILTAIEVNGTHRGLNGTQSQVQFLSSTQADPY-RSFA	119
		F+VCQMP S I NLKSNDPGRVILTA+E+NGTHRGLNGTQSQVQFL+ + P R+ A	
BF23	61	FFVCQMP SVIANLKSNDPGRVILTAVEINGTHRGLNGTQSQVQFLAFFEDPPIGRAGA	120
DT57C	120	SLSQTAGFAFGNSLASGTYSYNSSLGHEESIARSGTGGTVLHSTYHGVRPGGGAPVGAT	179
		+ T+ FA GNSLA GTY+Y+SSLGHEESIAR GTGGT+ ++ + RP G A	
BF23	121	EVGLTSAFASGNSLAHGTYTYSSSLGHEESIARQGTGGTISQASGFNLYRP-GRAYAAKA	179
DT57C	180	VAETFKQLGYPIGSSSVPISSGDYYWNPWNMAPMGAGKRGHEWFYVCNSNIRGYVGKQ	239
		+ + G+P G+S V I+SG+ +W+PNW AP+GAGKRGH WFYVCNSNIRGY G K	
BF23	180	MGRAWTLAGFPAGASKVSINSGNVDFWHPNWQAPIGAGKRGHTWIFYVCNSNIRGYAGKKG	239
DT57C	240	TIPSNIVQHFS DG---GNRYVCRGSATKLASQSANTKIVQDGYVTPTKVIWYVLNLRYS	296
		T PSN+ ++ YVCRGS + LASQ+A + VQD Y +TPTKVIWYVLNLRYS	
BF23	240	TTPSNVSVLYNSSTY PDKVYVCRGSTSNLASQA AKKQYVQDSYNITPTKVIWYVLNLRYS	299
DT57C	297	NGGMSVSSNPFTGSDIIISPSNFTIKGVKLSTTSWKFINQNALGNLTSRADMEYIGVNAA	356
		NGGMSV+SNPFTGSDI ISPSNFTIKGV L TS+KFINQNA GN L R DMEYIG N A	
BF23	300	NGGMSVASNPFTGSDIRISPSNFTIKGVSLPNTSYKFINQNAFNLGYRPMYIGNVVA	359
DT57C	357	HDGVFGDPTGRCEFCVSNKGSIWAPVNYSGTRAQLSIYKFSAGKTWYVNSNNNTIGNENG	416
		+ GVFGD T RCE V SNKGS+W+PVNY G+++Q+SIYKFSAGK WYVNSNNNTIGNE+G	
BF23	360	YTG VFGD TTARCEIVGSNKGS LWSPVNYGGSKSQIS IYKFSAGKQWYVNSNNNTIGNEHG	419
DT57C	417	VVWGPSSVPLRLLSGNVASAYIGNDITPTYPGTGNVYKSLATVGLGLPNNNSTVILTSEI	476
		VVWGPSSVPLRLL NVAS YIG+DI P+YPGTGN Y +L+TV LGLPN NSTVILT+E+	
BF23	420	VVWGPSSVPLRLLPNNVASTYIGDDINPSYPGTGNKYVALSTVSLGLPNANSTVILTTEV	479
DT57C	477	LSGNLNVAGLPVNTWNGSVFQVQGRKSQSYTGGDAIFHQILVLPKLVPFHTTSAYKYT	536
		++GNLN AG P+ T+ G+ +QVQGR+ QSYTGGD IFHQIL LPP LVPFHTT++Y YT	
BF23	480	VAGNLNTAGGPIRTYGGTAWQVQGRRQSYTGGDGFIFHQILTLPNHLVLPFHTTASYSYT	539
DT57C	537	-----PDSGAFSRNSFIYTIKNLGNGNAELGVILHVSLGSAVFLPRLRR-----	580
		PD F R+ FIYTIKNLGNGNAELGV++H + +AVFLPRLR	
BF23	540	QRWASRPDDLTFRRSGFIYTIKNLGNGNAELGVVIHANESAAVFLPRLRVTIQRLT	595

Рис 46. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков Hrs фагов DT57C и BF23.

Рецептор-блокирующий липопротеин *lpr* у обоих наших фагов оказался почти идентичен (имеется единственная аминокислотная замена) таковому фага BF23. Этот ген был клонирован в вектор pGEM-T под контролем собственного сайта связывания рибосомы. При этом были выбраны клоны, ориентация вставки в которых обеспечивала экспрессию гена с промотора РНК - полимеразы фага T7. Для проверки

влияния экспрессии этого гена на различные бактериофаги использовали штамм JM109(DE3) для наших изолятов и фага T5 и штамм BL21(DE3) для фага BF23. Газон соответствующих штаммов, содержащих плазмиду с геном *lpr* и контрольных культур, содержавших вектор, готовили обычным способом без добавления индуктора так как фоновая экспрессия РНК полимеразы T7 была достаточна для проявления эффекта гена. В результате этих экспериментов было обнаружено, что ген *lpr* наших изолятов обеспечивал устойчивость клеток к нашим изолятам и фагу BF23, но не к T5. Таким образом, мы доказали, что полиморфизмы, наблюдаемые между генами *Hrs* BF23 и наших изолятов не влияют на специфичность адсорбции. Ключевым рецептором, связывание с которым инициирует эжекцию ДНК у фага BF23 является белок *BtuB* (Mondigler et al. 2006). По-видимому, этот же рецептор используется и нашими изолятами. Однако это не объясняет причин различий в спектрах хозяев фагов DT57C и DT57-1/2, которые имеют идентичные белки *Hrs*.

Как обсуждалось выше, возможными кандидатами на участие в экспрессии бактериофагов являются разнообразные белки поверхности, содержащие Ig-подобные домены. T5 подобные фаги также имеют подобный белок (Pb10), являющийся декорирующим белком головки. У наших изолятов не было обнаружено различий в последовательностях этих белков, однако их сравнение с ближайшими гомологами выявило интересные модульные перестановки доменов. Pb10 фага T5 имеет один Ig-подобный домен на N-конце. Аналогичным образом устроен и декорирующий белок фага *Salmonella* EPS7, но последовательность аминокислот у этих двух фагов существенно различается. У фага BF 23 белок Pb10 сильно укорочен с C конца и лишен Ig-подобного домена. У наших изолятов декорирующий белок капсида несёт два тандемно расположенных Ig-подобных домена, причём первый (считая от N-конца) близок к соответствующему белку фага EPS7, а второй - T5 (Рис. 47)

Очевидно, что различия в хозяйском спектре наших фагов не связаны с белком Pb10. Тем не менее, обнаруженные перестановки доменов представляют определённый интерес, поскольку хорошо согласуются с гипотезой о функционировании подобных белков как дополнительных адгезинов.

Помимо белков *Hrs* (*Oad*) T5-подобные фаги обладают ещё одной рецептор-узнающей структурой - боковыми фибриллами хвоста (LTF). Интересно, что хвостовые фибриллы фага T5 считают несущественными для жизнеспособности в лабораторных условиях.

```

      |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...|
      5      15      25      35      45      55
gp10_DT57C MIDYNGLKTI FGEKLPESHI FFATVAAHEY VPSYAFLRRE LGLSSAHTNR KVVWKKFVEAY
gp10_T5     MIDYSGLRTI FGEKLPESHI FFATVAAHKY VPSYAFLRRE LGLSSAHTNR KVVWKKFVEAY
gp10_EP7    MIDYDGLKAI FGEKLPESHI FFATVAAHKF VPNYAT-RKE FGMTTAHTNR KVVWKKFKEVY

      |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...|
      65      75      85      95      105     115
gp10_DT57C DKAFFP-----LAFTKDL-DSTLAVDTGA-AINLSVTVSG GTAPYTY AWTKDGSPLE ASG---P
gp10_T5     GKAIAPPAPPAPP-LTLSKDL TASMSVEEGA ALTLSVTATG -----
gp10_EP7    EVTAPVVP----ALAFKTNL AKTLAVDTGA AINLGVTVTG GTAPYTY AWTKDGSPLE---SGVTGP

      |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...|
      125     135     145     155     165     175
gp10_DT57C NFTKAT AAAEDAGTYK VVVTDSKQAS ITSVECVTTV IPPLTLSTD L AASMSVEEGA ALTLSVTATG
gp10_T5     ----- APPLTLSKDL TASMSVEEGA ALTLSVTATG
gp10_EP7    NFNKAT AAAEDAGTYK VVVTDSKSTS ITSNECVTTI NPAPEA*

      |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...| |...|
      185     195     205     215     225     235     245
gp10_DT57C GTGPYTYAWT KDGSPIPDAS EATYTKPAAA AEDAGSYKVT VTDSKQVSKD STTCAVTVNP TVPGE*
gp10_T5     GTGPYTYAWT KDGSPIPDAS GATYTKPTAA AEDAGSYKVT VTDSKQVSKD STTCAVTVNP TVPGG*
gp10_EP7

```

Рис. 47 Выравнивание аминокислотных последовательностей декорирующего белка головки фагов DT57C, T5 и EPS7. Цветом выделены повторяющиеся аминокислотные мотивы Ig-подобных доменов.

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 (Рис. 48).

Мы сконструировали плазмиды, содержавшие регионы дивергенции обеих фибрилл обоих фагов фланкированные участками, идентичными у этих вирусов. 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.

DT57-1/2	1	MALKTKIIVQQILNIDDDTTTASKEYPKYTVVLGNSISSITAGELTAAVEASAGSAAAARG	60
		MALKTKIIVQQILNIDDDTTTASKEYPKYTVVLGNSISSITAGELTAAVEASAGSAAA+G	
DT57C	1	MALKTKIIVQQILNIDDDTTTASKEYPKYTVVLGNSISSITAGELTAAVEASAGSAAAAG	60
DT57-1/2	61	SEIAAKDSENNAKDSEIQAGIHAGASEASATQSAASATESERQAGLAQSSADNSAASAQE	120
		SEIAAK+SE NAKDSE +A I AGASE SA+QSAASA ESERQAGL++ SADNSAASAQE	
DT57C	61	SEIAAKESELNAKDSENEAAISAGASEESASQSAASAAESERQAGLSKGSADNSAASAQE	120
DT57-1/2	121	SEGFSDAELAAQNAEQSRLLAEQAKTAAQQAQIAAEAAKTGAETAKDGADAAATTAGEH	180
		SEGFSDAELAAQNAEQSRLLAEQAKTAAQQAQ AAEAAKTGAETAKDGADAAATTAGEH	
DT57C	121	SEGFSDAELAAQNAEQSRLLAEQAKTAAQQAQTAAEAAKTGAETAKDGADAAATTAGEH	180
DT57-1/2	181	AAAAAQSELNAKISETNAAGSATEAGDKAIDATTEADRAKAEADRATQIVDSKLDKVDIS	240
		AAAAAQSELNAKISETNAAGSATEAGDKAIDATTEADRAKAEADRATQIVDSKLDKVDIS	
DT57C	181	AAAAAQSELNAKISETNAAGSATEAGDKAIDATTEADRAKAEADRATQIVDSKLDKVDIS	240
DT57-1/2	241	GFIKVKYKTKAEADADVNRVLDEKVLVWNQTNISKYGWYKVGTAETPVLELVETEQLVS	300
		GFIKVKYKTKAEADADVNRVLDEKVLVWNQTNISKYGWYKVGTAETPVLELVETEQL S	
DT57C	241	GFIKVKYKTKAEADADVNRVLDEKVLVWNQTNISKYGWYKVGTAETPVLELVETEQLTS	300
DT57-1/2	301	VNNVRADDGQNVQITLPGGNPSLWLGVEVTFWPFYDKDSGVGYPGVLPADGREVLRADYDPT	360
		VNNVRADD GNVQITLPGGNPSLWLGVEVTFWPFYDKDSGVGYPGVLPADGREVLR DYPDT	
DT57C	301	VNNVRADDAGNVQITLPGGNPSLWLGVEVTFWPFYDKDSGVGYPGVLPADGREVLRVDYDPT	360
DT57-1/2	361	WEAIEAGLIPSVPEAEWQAGASLYFSTGDGSTTFRLPDMMQQAFRAPTKGEEDAGVIKD	420
		WEAIEAGLIPSV EAEWQAGASLYFSTGDGSTTFRLPDMMQQAFRAPTKGEEDAGVIKD	
DT57C	361	WEAIEAGLIPSVSEAEWQAGASLYFSTGDGSTTFRLPDMMQQAFRAPTKGEEDAGVIKD	420
DT57-1/2	421	QIPYVVTVNGISPDDITGNVEIDTSLQGTVSINQGGTGATTKEDARIALELYSTTEVDSA	480
		QIPYVVTVNGISP D ITGNVEIDTSLQGTVSINQGGTGATTKEDARIALELYSTTEVDSA	
DT57C	421	QIPYVVTVNGISPDAITGNVEIDTSLQGTVSINQGGTGATTKEDARIALELYSTTEVDSA	480
DT57-1/2	481	LADKADIATTYTKMEVDSALADKADIATTYTKMEVDSALADAKTQSDTDYLLKANNSDL	540
		LADKADIATTYTK EVDSALADKADIATTYTK+EVDSALADAKTQSDTDYLLKANNSDL	
DT57C	481	LADKADIATTYTKTEVDSALADKADIATTYTKVEVDSALADAKTQSDTDYLLKANNSDL	540
DT57-1/2	541	ADRAAAWLNVRPVGSTPLAGDPVGDYDAVTKRWVENKINTGTGVPMTMNGVMNYGVGDFHL	600
		ADRAAAWLNVRP+GSTPLAGDPVGDYDAVTKRWVENKINTGTGVPMTMNGVMNYGVGDFHL	
DT57C	541	ADRAAAWLNVRPIGSTPLAGDPVGDYDAVTKRWVENKINTGTGVPMTMNGVMNYGVGDFHL	600
DT57-1/2	601	RDSRAYIQPYEVVSDGQLLNRADWPELWAYAQMLSPISDADWLADPWRHQYSTGDGSTT	660
		RDSRAYIQPYEVVSDGQLLNRADWPELWAYAQMLSPISDADWLADP R QYS GDGSTT	
DT57C	601	RDSRAYIQPYEVVSDGQLLNRADWPELWAYAQMLSPISDADWLADPTRKGOYSLGDGSTT	660
DT57-1/2	661	FRVPDRNGTQTGSIKGLFGRGDAGGNY--GGILENGLPDISGDF-----TSYSYLAGA	711
		FRVPDRNG QTGSI LFGRGD G + G IL++ P+I+G F T Y A	
DT57C	661	FRVPDRNGVQTGSI SALFGRGDGGASSTGGTILDSAAPNITGSFGRLYVYASTGTIYEANT	720
DT57-1/2	712	PSGAFAS--SNNGTSAIS-LSNAEGSNARY-NTYTFRASRVNAAYGRAS-EVRPNSFVGV	766
		+GAF++ S +S +S A+G+ A Y + + F AS + YGR S EVRP +F GV	
DT57C	721	GTGAFSAVLSQAKYKRLSEISAADGTAATYPSGF EFFASNSSPVYGRGSTEVPRKFAFTGV	780
DT57-1/2	767	WVIRASGGFVAANTSWSVINGDATLPPATTSVTGGRVTSEYRVGGQLEGSADFRMVGTIG	826
		WVIRASGGFVAANTSWSVINGDAT P T+ GG + S Y V G E +R+ IG	
DT57C	781	WVIRASGGFVAANTSWSVINGDATRPADGTTADGGEIISRYNVNGVREAOQMSWRIRAQIG	840
DT57-1/2	827	GTYAARISVYNSTLGVTRSFDFNSSG----DLVTPGNMIAKGNIVRITGSGSYTSGFL	880
		+ AR++VYN+T T +DFN G +L + G + + GN+ ++ G	
DT57C	841	AEHYARLNVYNATANRTAVYDFNDLGTFS AENLHSGAIYS DGNLTIQNGWPGINFKSN	900
DT57-1/2	881	DFVSPSGAMYGRVYSERNGMTIMTSVSGSTPRYFQFMQAGNAV----CPGG---WSTTS	933
		+ +P+ + G E +G ++ V+ R QAG + GG TS	
DT57C	901	RYNTPATQIGGSTIIIEVSGTDGNVSGVN-LIRRRGDGNQAGQIIIVSFPTTGGAIALQGT	959
DT57-1/2	934	DERIKEDVVRIPDPLGAMRTIKG---VSWRVKQDNSKR-NYGFIAQDVENRFPDAI-FNA	988
		K+DV D AM I G V++ K D +R +G IA++ E P I N	
DT57C	960	GIEYKDVTD-ADAQEAMDRINGQRLVNFVYKDDDEQERVRFGVIAEEAELIAPQYIKHNQ	1018

```

DT57-1/2    989 GSM-NLRD-----GEVVPDVKGVDTYGVAAALHHEAILALMDKVEALEAKITELEAK- 1039
              S  ++ D      GE  D  VD  +  L    + AL  K+ ALEA+I ELE+K
DT57C      1019 VSYEDILDEEGNKIGEKTRDRPSVDVNPPIVMDLMG-CVQALNAKIAALEARIAELESKE 1076

```

Рис. 48. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков *Ltf-2* фагов DT57C и DT57-1/2 (алгоритм ClustalW)

Аналогичные результаты были получены и в обратном эксперименте (клетки, с плазмидами, содержащими фрагменты генов *ltf* фага DT57-1/2 инфицировали фагом DT57C). рекомбинационный перенос протяженного участка гена *ltf-2* был подтверждён секвенированием соответствующего локуса у рекомбинанта DT57-1/2 x *ltf2*DT57C

Таким образом, одной из детерминант хозяйской специфичности, необходимой для роста наших фаговых изолятов по меньшей мере на некоторых штаммах хозяев. 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.

IV.5. Заключение

Эволюция геномов бактериофагов происходит за счёт двух важнейших механизмов. Первый путь - это латеральное перемещение генетических модулей, определяемых как гены, группы генов или части генов (как правило, кодирующих отдельные белковые домены), расположенные единым блоком на генетической карте, отвечающие за реализацию единой физиологической функции, которые могут быть переданы в другое генетическое окружение с сохранением функции. Второй путь - это дивергентная эволюция путём постепенного накопления мутаций. Соотношение вкладов этих механизмов отличаются у разных групп фагов, а также в разных регионах генома. Тем не менее, при исследовании микроэволюции фагов в природных микробных сообществах полиморфизмы модульного типа представляют особенный интерес, поскольку они легче выявляются, чем точечные мутации (особенно важно, что точечные мутации могут накапливаться и селектироваться достаточно быстро в лабораторных условиях в процессе выделения и очистки полевых изолятов) и гораздо реже бывают молчащими. Поэтому полиморфизмы модульного типа являются наиболее перспективными как для исследования механизмов экологической адаптации фагов в реальных природных и техногенных микробных сообществах, так и в качестве индикаторов активных адаптационных (микроэволюционных) процессов.

В результате проведённых исследований нами охарактеризованы процессы перестановок генетических модулей субгенного (доменного) и генного уровней в белках адсорбционных аппаратах бактериофагов, нескольких различных филогенетических групп (родов). Впервые детально исследован вопрос об эволюции фибритина бактериофагов, родственного Т-чётным - фибриллярного coiled coil белка, являющегося частью молекулярного сенсора условий среды, регулирующего инфекционность фаговой частицы. В том числе уточнены соотношения процесса обмена модулей доменного уровня с консервативным путём фолдинга белка. На основе эволюционных данных сделаны предположения о локализации участка взаимодействия ДХФ-фибритин, которые были проверены экспериментально, что привело к формулировке уточненной модели срабатывания сенсора.

Вопреки имевшимся ожиданиям, обнаруженные модульные перестановки С-концевых доменов этих фагов, по-видимому, не участвуют в настройке сенсора применительно к конкретным условиям окружающей среды, а отражают достаточно древние эволюционные события, вероятно, связанные с изменениями функции фибритина у различных подгрупп бактериофагов, родственного Т-чётным.

Для проверки гипотезы о существенной роли модульных событий оказалось необходимым провести исследование пластичности геномов вирулентных фагов в природной микробной системе, в которой они являются индигенными компонентами, и в которой имеются иные, помимо геномной пластичности фагов, признаки интенсивной ко-эволюции этих вирусов и их хозяев. Однако, к моменту начала нашей работы не существовало хорошо охарактеризованного природного сообщества, отвечающего требованиям, которые можно предъявить к такой модельной системе. Нами найдена и охарактеризована удобная модельная система для целей исследования процессов адаптации вирулентных бактериофагов *in situ* – 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*.

V. 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 в следствие 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-четных фагов по характеру эволюционной изменчивости занимают промежуточное положение между кон-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

VI. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

VI.1 Список работ по теме диссертации, опубликованных в научных журналах, рекомендованных ВАК

1. Letarov A.V., Krisch H.M. The episodic evolution of fibritin: traces of ancient global environmental alterations may remain in the genomes of T4-like phages. *Ecol Evol.* 2013 3(10):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 3(23), 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. (2012)*Virology* 426, 93-99.

5. Letarova, M., Strelkova, D., Nevolina, S., Letarov, A. (2012) A test for the "physiological phagemia" hypothesis-natural intestinal coliphages do not penetrate to the blood in horses. *Folia Microbiol (Praha)* 57, 81-83

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

7. Летаров А.В., Голомидова А.К., Тарасян К.К. 2010г. Экологические основы рациональной фаговой терапии. *Acta naturae*, 2 (1), 66-79

8. Исаева А.С., Куликов Е.Е, Тарасян К.К., Летаров А.В. 2010 Новый метод высокоразрешающего геномного ПЦР-фингерпринтинга энтеробактерий. *Acta naturae*, 2 (1), 82-87

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

10. Golomidova, A., Kulikov, E., Isaeva, A., Manykin, A. and Letarov, A., 2007, The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5975-5981
11. Латыпов О.Р., Голомидова А.К., Летаров А.В. 2007 «Характеристика продукта гена *wac* бактериофага JS98C3, близкородственного фагу JS98» Вестник КГУ, 149, кн.4, 1-11
12. Куликов Е.Е., Исаева А.С., Роткина А.С., Манькин А.А. и Летаров А.В. 2007. Биоразнообразие и динамика бактериофагов в фекалиях лошадей. *Микробиология.* 76, 271-278
13. Comeau, A.M., Bertrand, C., Letarov, A., Tetart, F. and Krisch, H.M. 2007. Modular architecture of the T4 phage superfamily: A conserved core genome and a plastic periphery. *Virology.* 362, 384-396
14. Letarov, A., Manival, X., Desplats, C. and Krisch H.M. 2005, gpwac of the T4-type bacteriophages: structure, function, and evolution of a segmented coiled-coil protein that controls viral infectivity. *J Bacteriol.* 187(3):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. 2005, The genome of S-PM2, a "photosynthetic" T4-type 288bacteriophage that infects marine *Synechococcus* strains. *J Bacteriol.* 187(9):3188-3200
16. Boudko, S.P., Londer, Y.Y., Letarov, A.V., Sernova, N.V., Engel, J., and Mesyanzhinov, V.V., 2002 Domain organization, folding and stability of bacteriophage T4 fibritin, a segmented coiled-coil protein. *Eur. J. Biochem.* . 269, 833-841.
17. Летаров А.В., Лондер Ю.Я., Будько С.П. и Месянжинов В.В. (1999) Карбокси-концевой домен инициирует тримеризацию фибритина бактериофага Т4. *Биохимия* 64, 817-823
18. Летаров А.В. (1998) Реконструкция возможных путей возникновения и морфологической эволюции бактериофагов. *Генетика* 34, 1461-1469.

VI.2 Некоторые публикации в других изданиях.

19. A. Letarov (2012) Bacteriophages as a part of the human microbiome. in *Bacteriophages in Health and Disease* (Human and Abedon eds). 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. (2013) 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. г. Ульяновск 2013. 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. (2013) 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. г. Ульяновск 2013. Т.1 с. 54 – 59

22. Прохоров Н.С., Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Летаров А.В. (2013) 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. г. Ульяновск 2013. Т. 1. с. 195 – 198.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Адамс М. 1961 Бактериофаги. М. Изд-во. иностр. лит. 527с.
- Боговазова Г.Г., Ворошилова Н.Н., Бондаренко В.М. (1991) Эффективность бактериофага *Klebsiella pneumoniae* при терапии экспериментальной клебсиеллезной инфекции. *Журн. микробиол.эпидемиол. иммунобиол.* (4), 5-8
- Бычкова В.Е., Птицын О.Б., (1993), Состояние расплавленной глобулы для белковых молекул становится скорее правилом, чем исключением. *Биофизика*, **38**, 58-66.
- Домарадский И. В., Хохоев Т. Х, Кондракова О. А., Дубинин А. В., Вострухов С. В., Бабин В. Н. 2002. Противоречивая микроэкология. *Российский химический журнал*, **46**, 80-89
- Иванитский Г.Р., Медвинский А.Б., Деев А.А., Кхузаинов А.А., Циганов М.А. (1995), Существует ли таксис у бактериальных вирусов? *Биофизика*, **40**, 60-73;
- Курочкина Л.П., Месянжинов В.В. (1996), Фолдинг белка в клетке. *Успехи биол. химии*, **36**, 49-86
- Латыпов О.Р. (2008) Характеристика новых бета-пропеллерных белковых доменов, гомологичных фолдону фибритина бактериофага Т4. Дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. Казань. 76с.
- Летаров А.В. (1999) Изучение пути фолдинга фибритина бактериофага Т4. Дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. Москва. 125с.
- Лондер Ю.Я. и Месянжинов В.В., (1999), Термостабильность делеционных мутантов фибритина бактериофага Т4. *Биоорганическая химия*, **25**, 257-263
- Лондер Ю.Я., Будько С.П., Месянжинов В.В.,(1999), Суперспиральные (coiled coil) белки: структура, фолдинг и функции. *Успехи биол. химии*, **39**, 45-76
- Николаев Ю.А., Плакунов В.К. (2007) Биопленка – “город микробов” или аналог многоклеточного организма? *Микробиология*, **76**, 149–163.
- Перепанова Т.С., Дарбеева О.С, Котлярова Г.А., Кондратьева Е.М., Майская Л.М., Малышева В.Ф., Байгузина Ф.А., Гришкова Н.В., (1995) Эффективность препаратов бактериофагов при лечении воспалительных урологических заболеваний. *Урология и нефрология №5*, 14-17
- Птицын О.Б. (1998), Сворачивание белков и компактные интермедиаты. *Биохимия*, **63**, 435-443.
- Птицын О.Б. (1973), Стадии и механизм самоорганизации белковых молекул. *Докл. АН СССР*, **210**, 1213-1215
- Субботин А.В. Функер М.Г., Урман Э.С., Горовиц Ю.Н., Маслов О.В., Одинцова О.В.,

(2006) Применение секстафага в комплексной антибактериальной терапии инфицированного панкреонекроза. *Здоровье и образование: Ма*

Тараканов Б.В. (2006) Феномен бактериофагии в рубце жвачных. М. Научный мир. 184с.

Токарев М.В., Давидов М.И., Функнер Е.В., Лечение острого пиелонефрита бактериофагами. 2005. *Актуальные вопросы клинической медицины. Сборник научных трудов, посвященный 130-летию Пермской ГКБ№6. Пермь.*

Шнейдер М.М. Исследования структуры фибритина бактериофага Т4 и роли карбоксиконцевого домена в фолдинге белка. (1997). Дисс. На соискание уч. ст. канд. биол. наук, Москва, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. 110с.

Abedon, S.T. (2009) Phage evolution and ecology. *Adv Appl Microbiol.* **67**, 1-45.

Abedon, S.T. (2011) Bacteriophages and biofilms. *In: (Bailey, W.C ed.) Biofilms: Formation, Development and Properties.* Nova Science Publishers, Hauppauge, New York.

Abedon, S.T., Thomas-Abedon, C. (2010) Phage therapy pharmacology. *Curr Pharm Biotechnol.* **11**, 28-47.

Abkhevich V.I., Gutin, A.M. Shakhnovich E.I. (1991), Specific nucleus as the transition state for protein folding: evidence from the lattice model. *Biochemistry*, **33**, 10026-10036

Abrescia, N.G.A., Grimes, J.M., Fry, E.E., Ravantti, J.J., Bamford, D.H. and Stuart, D.I. (2010). What does it take to make a virus: the concept of the viral "self". *In: Emerging Topics in Physical Virology (ed P.G.Stockley and R.Twarock).* Imperial College Press, UK. 35-58.

Ackermann, H.-W. (1999), Tailed bacteriophages. The order *Caudovirales*. *Adv. Virus Res.*, **51**, 135–201.

Ackermann, H.-W. (2005) Bacteriophage classification *In Bacteriophages: biology and applications (Kutter, E. and Sulakvelidze, A. eds).* CRC press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 510p., 67-90

Ackermann, H.W. (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.* **152**, 227-243

Adriaenssens, E.M., Ackermann, H.W., Anany, H., Blasdel, B., Connerton, I.F., Goulding, D., Griffiths, M.W., Hooton, S.P., Kutter, E.M., Kropinski, A.M., Lee, J.H., Maes, M., Pickard, D., Ryu, S., Sephehrizadeh, Z., Shahrabak, S.S., Toribio, A.L. and Lavigne, R. (2012) A suggested new bacteriophage genus: "Viunalikevirus". *Arch Virol.* **157**, 2035-2046

Ackermann, H.W. (2012) Bacteriophage electron microscopy. *Adv Virus Res.* **82**, 1-32

Adams, M.H. and Park, B.H.(1956) An enzyme produced by a phage-host cell system. II. The

properties of the polysaccharide depolymerase. *Virology*. **2**, 719–736.

Alexander, F., Davies M. E., and Muir A. R. (1970) Bacteriophage-like particles in the large intestine of the horse. *Res Vet Sci* **11**, 592-593.

Anderson, G.G., O'Toole, G.A. 2008 Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*.**322**, 85-105

Anfinsen C.B., Haber M., Sela M., White F.H., (1961), The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1309-1314

Antonio, M. A. D. and Hillier, S. L. (2003) DNA fingerprinting of *Lactobacillus crispatus* strain CTV-05 by repetitive element sequence-based PCR analysis in a pilot study of vaginal colonization. *J Clin Microbiol* **41**, 1881-1887.

Antonio, M. A. D., Hawes, S. E. and Hillier, S. L. (1999) Identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *The J Inf Diseases* **180**, 1950-1956.

Apostolovic, B., Danial, M. and Klok HA. (2010) Coiled coils: attractive protein folding motifs for the fabrication of self-assembled, responsive and bioactive materials. *Chem Soc Rev*. **39**, 3541-3575

Araujo, R., Muniesa, M., Méndez, J., Puig, A., Queralt, N., Lucena, F. and Jofre, J. (2001) Optimisation and standardisation of a method for detecting and enumerating bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*. *J. Virol. Meth.* **93**, 127-136.

Ashelford, K.E., Day, M.J. and Fry, J.C. (2003) Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 285–289.

Atterbury, R. J., Dillon, E., Swift, C., Connerton, P. L., Frost, J. A., Dodd, C. E. R., Rees, C. E. D. and Connerton, I.F. (2005) Correlation of *Campylobacter* bacteriophages with reduced presence of hosts in broiler chicken caeca. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4885-4887.

Azeredo, J., Sutherland, I.W. 2008. The use of phages to removal of infectious biofilms. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **9**, 261-266

Bamford, D. 2003. Do viruses form lineages across different domains of life? *Res. in Microbiol.* **154**, 231-236.

Battesti, A., Majdalani, N., Gottesman, S. (2011) The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 189-213.

Bergh, O., Borsheim, K.Y., Bratbak, G. and Heldal, M., (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**, 467–468.

- Blackwell, A. L. (1999) Vaginal bacterial phaginoses? *Sex Transm Infect* **75**, 352-353.
- Bohannan, B.J.M., Lenski, R.E. 2000 Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage. *Ecology Lett.* **3**, 362-377.
- Borsheim, K.Y.(1993) Native Marine Bacteriophages. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102**, 141–159.
- Botstein, D. (1980) A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann NY Acad Sci* **354**, 484–491.
- Boudko, S.P., Strelkov, S.V., Engel, J. and Stetefeld, J. (2004) Design and crystal structure of bacteriophage T4 mini-fibritin NCCF. *J Mol Biol.* **339**, 927-935
- Bourikas, L. A., Kourberti, I. S., Koutsopoulos, A.V. and Kotroubakis, I. E. (2008) Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* **57**, 424-425.
- Breitbart, M. (2012) Marine viruses: truth or dare. *Ann Rev Mar Sci.* **4**, 425-448.
- Breitbart, M., Haynes, M., Kelley, S., Angly, F., Edwards, R.A., Felts, B., Mahaffy, J.M., Mueller, J., Nulton, J., Rayhawk, S., Rodriguez-Brito, B., Salamon, P. and Rohwer, F. (2008) Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Res. Microbiol.* **159**, 367–373.
- Breitbart, M., I. Hewson B., Felts, J., Mahaffy M., Nulton J., Salamon P. and Rohwer F. (2003) Metagenomic Analyses of an Uncultured Viral Community from Human Feces. *J Bacteriol* **185**, 6220-6223.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. and Dubois-Brissonnet, F. (2011) Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling.* (9) 1017-1032.
- Brokhurst, M. A., Bukcling, A. and Rainey, P. B. (2005) The effect of the bacteriophages on diversification of the opportunistic bacterial pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc R Soc B* **272**, 1385-1391.
- Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J. 2008 Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science.* **321**, 960-964
- Brown, S. P., Le Chat, L., De Paepe, M. and Taddei, F. (2006) Ecology of microbial invasions: amplification allows virus carriers to invade more rapidly when rare. *Curr Biol* **16**, 2048-2052.
- Brussow, H. and Kutter, E. (2005a) Genomics and evolution of tailed phages. *In Bacteriophages: biology and applications* (Kutter, E. and Sulakvelidze, A. eds). CRC press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 510p., 129-164
- Brussow, H. and Kutter, E. (2005b) Phage ecology. *In Bacteriophages: biology and applications* (Kutter, E. and Sulakvelidze, A. eds). CRC press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 510p., 91-128
- Brussow, H.(2005) Phage therapy: the *Escherihia coli* experience. *Microbiology* **151**, 2133-

2140.

Burrowes, B., Harper, D.R., Anderson, J., McConville, M., Enright, M.C. (2011) Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **9**, 775-85.

Bystricky, V., Drahos, V., Mulczyck, M., Przondo-Hessek, A., Slopeck, S. 1964 On the structure of some bacteriophages. *Acta Virol.* **176**, 369-372

Cairns, B., Timms, A.R., Jansen, V.A.A., Connerton, I.F., Payne, R.J.H. 2009. Quantitative models of *in vitro* bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy. *PLoS Pathog* **5**(1): e1000253. doi:10.1371/journal.ppat.1000253

Calci, K. R., Burkhardt III W., Watkins, W. D. and Scott. R.R. (1998) Occurrence of male-specific bacteriophage in feral and domestic animals wastes, human feces, and human-associated wastewaters. *Appl Environ Microbiol* **64**, 5027-5029.

Calendar, R. ed. (2006) The bacteriophages. 2nd edition, Oxford university press, New York. 746P.

Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L. and Brüssow H. (2003) Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* **6**, 417-424.

Cann, J. A., Fandrich S. E. and Heaphy S. (2005) Analysis of the virus population present in equine faeces indicates the presense of hundreds of uncharacterized virus genomes. *Virus genes* **30**, 151-156.

Caporaso, J.G., Knight, R. and Kelley, S.T. (2011) Host-associated and free-living phage communities differ profoundly in phylogenetic composition. *PLoS One* **6**, e16900.

Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P., Iannelli, D. 2007. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrobiol. Agents Chemother.* **51**, 2765-2773

Capparelli, R., Ventimiglia, S., Roperto, S., Fenizia, D., Iannelli, D. 2006 Selection of an *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage for persistence in the circulatory system of mice infected experimentally. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 248-253

Carlson, K. and Miller, E.S. (1994) Working with T4. In *Molecular Biology of Bacteriophage T4* (Karam, J.D. ed.), ASM Press, Washington, DC, pp. 421-426

Casjens, S., Hatfull, G. and Hendrix, R. (1992) Evolution of dsDNA tailed-bacteriophage genomes. *Semin in Virol* **3**, 383-397,

Casjens, S.R. and Molineux, I.J. (2012) Short noncontractile tail machines: adsorption and DNA delivery by podoviruses. *Adv Exp Med Biol.* **726**, 143-179

Cerca, N., Olivera, R., Azeredo, J. 2007 Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis*

planktonic cells and biofilms to the lytic action of staphylococcus bacteriophage K. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 313-317

Chao, A. (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in population. *Scand. J. Stat.* **11**, 265-270.

Chibani-Chenoufi, S., Sidoti, J., Bruttin, A., Kutter, E., Sarker, S. A. and Brussow, H. (2004b) In vitro and in vivo bacteriolytic activity of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy. *Antimicrob Agents Chemotherapy* **48**, 2558-2569.

Chibani-Chenoufi, S., Sidoti, J., Bruttin, A., Dillmann, M.-L., Kutter, E., Qadri, F., Sarker, S. A. and Brussow, H. (2004a) Isolation of *Escherichia coli* bacteriophages from the stool of pediatric diarrhea patients in Bangladesh. *J Bacteriol* **186**, 8287-8294.

Cochran, P.K. and Paul, J.H. (1998) Seasonal abundance of lysogenic bacteria in a subtropical estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2308-2312.

Cole, D., Long, S. C. and Sobsey M. (2003) Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6507-6514.

Comeau, A. M., Bertrand, C., Letarov, A., Tetart, F. and Krisch, H. M.. (2007) Modular architecture of the T4 phage superfamily: a conserved core genome and a plastic periphery. *Virology* **362**, 384-396.

Comeau, A. M., Buenaventura, E. and Suttle, C. A. (2005) A persistent, productive and seasonally dynamic vibriophage population within Pacific oysters (*Crassostera gigas*). *Appl Environ Microbiol* **71**, 5324-5331.

Comeau, A.M., Hatfull, G.F., Krisch, H.M., Lindell, D., Mann, N.H., Prangishvili, D. (2008) Exploring the prokaryotic virosphere. *Res Microbiol.* 2008 **159**, 306-13

Conley, M.P. and Wood, W.B. (1975) Bacteriophage T4 whiskers: a rudimentary environment-sensing device. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **9**, 3701-3705

Constantini, T.V., Putnam, J.G., Sawada, R., Baird, A., Loomis, W.H., Eliceiri, B.P., Bansal, V., Coimbra, R. 2009 Targetting the gut barrier: identification of a homing peptide sequence for delivery into the injured intestinal epithelial cell. *Surgery* **146**, 206-212

Cornax R., Morinigo M. A., Gonzalez-Jaen F., Alonso M. C. and Borrego J. J. (1994) Bacteriophages presence in human faeces of healthy subjects and patients with gastrointestinal disturbances. *Zentralbl Bakteriol* **281**, 214-224.

Creighton T.E. (1994), Mechanisms of protein folding (Ed. Pain R.H.) Oxford: Oxford Univ. Press, 1-54

- Crick F.H.C. (1953) The packing of a-helices: Simple coiled-coils. *Acta Crystallog.* **6**, 685-697
- d'Herelle F. (1921) La bactériophage. Son rôle dans l'immunité. Paris. Cited after Russian edition (1926), Moscow – Leningrad : State Editor.
- d'Herelle F., 1917 Sur un microb invisible, antagoniste des bacilles desenteriques. *Compt.rend.* **165**, 373
- Dabrowska, K., Switala-Jelen, K., Opolski, A., Weber-Dabrowska, B and Gorski, A. (2005) Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Applied Microbiol* **98**, 7-13.
- Dabrowska, K., Zembala, M., Boratynski, J., Switala-Jelen, K., Wietrzyk, J., Opolski, A., Szczauraska, K., Kujawa, M., Godlewska, J. and Gorski, A. (2007) *hoc* protein regulates the biological effects of T4 phage in mammals. *Arch Microbiol* **187**, 489-98.
- Daly, K., Stewart, C.S. and Flint, H.J. (2001) Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, **38**, 141-151
- Danovaro, R. and Serresi, M. (2000) Viral density and virus-to-bacterium ratio in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1857–1861.
- Demerec M. and Fano U. (1945) Bacteriophage-Resistant Mutants in Escherichia Coli. *Genetics.* **30**, 119-136
- Dennehy, J. J., Friedenber, N. A., Yang, Y. W. and Turner, P. E. (2007) Virus extinction via ecological traps. *Ecol Lett* **10**, 230-240.
- Desplats, C. and Krisch, H.M. (2003) The diversity and evolution of the T4-type bacteriophages. *Res Microbiol.* **154**, 259-267.
- Dey, S., Basu, A. and Datta S. (2012) Characterization of Molten Globule PopB in Absence and Presence of Its Chaperone PcrH. *Protein J.* May 15. [Epub ahead of print]
- Dhillon, E. K. S., Dhillon, T. S., Lam, Y. Y. and Tsang, A. H. C. (1980) Temperate coliphages: classification and correlation with habitats. *Appl Environ Microbiol* **39**, 1046-1053.
- Dhillon, T. S., Dhillon E. K., Chau H. C., Li W.K. and Tsang, A.H. (1976) Studies on bacteriophage distribution, virulent and temperate bacteriophage content of mammalian feces. *Appl Environ Microbiol* **32**, 68-74.
- Dickson R., Barnes S., Eiserling F. (1970) Structural proteins of bacteriophage T4. *J Mol Biol.* **53**, 461-474
- Doermann, A. H., Pao A., and Jackson P. (1987) Genetic control of capsid length in bacteriophage T4: clustering of *ptg* mutations in gene 23. *J. Virol.* **61**, 2823–2827
- Dombek, P.E., Johnson, L.K. and Zimmerly, S.T. (2000) Use of repetitive DNA sequences and

the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2572-2577.

Doolittle, M.M., Cooney, J.J. and Caldwell, D.E. (1995) Lytic infection of *Escherichia coli* biofilms by bacteriophage T4. *Can. J. Microbiol.* **41**, 12-8.

Doolittle, M.M., Cooney, J.J. and Caldwell, D.E. (1996) Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. *J. Ind. Microbiol.* **16**, 331-341.

Dubos, R., Straus, J.H., Pierce, C., 1943 The multiplication of bacteriophage in vivo and its protective effect against an experimental infection with *Salmonella dysenteriae*. *J. Exp. Med.* **20**, 161-168

Duerr, D.M., White, S.J., Shluesener, H.J., 2004 Identification of peptide sequences that induce the transport of phage across the gastrointestinal mucosal barrier. *J. Virol. Methods.* **116**, 177-180

Durmaz, E., Klaenhammer, T.R. 2007 Abortive phage resistance mechanism *AbiZ* speeds the lysis clock to cause premature lysis of phage-infected *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **189**, 1417-1425.

Efimov V.P., Nepluev I.V., Sobolev B.N., Zurabishvili T.G., Schulthess T., Lustig A., Engel J., Haeper M., Aebi U., Venyaminov S.Y., Potekhin S.A. and Mesyanzhinov V.V. (1994) Fibritin encoded by bacteriophage T4 gene *wac* has a parallel triple-stranded α -helical coiled-coil structure, *J. Mol. Biol.*, **242**, 470-486

Fairman R., Chao H.G., Mueller L., Lavoie T.B., Shen L., Novotny J., Matsueda G.R. (1995), Design of heterotetrameric coiled coils: evidence for increased stabilization by Glu(-)-Lys(+) ion pair interactions. *Protein Sci.* **4**, 1457-1469

Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., Humphreys, D.P., Lilley, K.S., Salmond, G.P. 2009 The phage abortive infection system, *ToxIN*, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 894-899

Fischetti V.A. 2008. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 393 - 400

Flewett, T. H., Bryden, A. S. and Davies H. (1974) Diagnostic electron microscopy of faeces. *J Clin Path* **27**, 603-614.

Fokine A., Zhang Z., Kanamaru S., Bowman V.D., Aksyuk A.A., Arisaka F., Rao V.B. and Rossmann M.G. (2013) The molecular architecture of the bacteriophage T4 neck. *J. Mol. Biol.* **425**, 1731-1744.

- Fokine A., Chipman P.R., Leiman P.G., Mesyanzhinov V.V., Rao V.B., and Rossmann M.G. (2004) Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6003-6008
- Follansbee, S. E., R. W. Vanderslice, L. G. Chavez, and C. D. Yegian. 1974. A new set of adsorption mutants of bacteriophage T4D, identification of a new gene. *Virology* **58**, 180–199.
- Fraser, J. S., Maxwell, K. L. and Davidson, A. R. (2007) Immunoglobulin-like domains on bacteriophage: weapons of modest damage? *Curr Opin Microbiol* **10**, 382-387.
- Fuhrman, J.A., Schwalbach, M. (2003) Viral influence on aquatic bacterial communities. *Biol Bull.* **204**, 192-195.
- Furuse, K., Osawa, J. Kawashiro, R. Tanaka, A. Ozawa, S. Sawamura, Y. Yanagawa, T. Nagao and Watanabe, I. (1983) Bacteriophage distribution in human faeces: continuous survey of healthy subjects and patients with internal and leukaemic diseases. *J Gen Virol* **64**, 2039-2043.
- Furuse, K., Sakurai, T., Hirashima, A., Katsuki, M., Ando, A. and Watanabe, I. (1978) Distribution of ribonucleic acid coliphages in South and East Asia. *Appl Environ Microbiol* **35**, 995-1002.
- Gabig, M., Herman-Antosiewicz, A., Kwiatkowska, M., Los, M., Thomas, M. S., and Wegrzyn, G. (2002) The cell surface protein Ag43 facilitates phage infection of *Escherichia coli* in the presence of bile salts and carbohydrates. *Microbiology* **148**, 1533-1542.
- Gallet, R., Shao, Y., Wang, I.N. (2009) High adsorption rate is detrimental to bacteriophage fitness in a biofilm-like environment. *BMC Evol. Biol.* **9**, 241
- Gantzer, C., Henny, J., and Schwartzbrod L. (2002) *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages in human faeces. *Int J Hyg Environ Health* **205**, 325-328.
- Gautam, S., Dubey, P., Rather, G.M. and Gupta, M.N. (2012) Non-chromatographic strategies for protein refolding. *Recent Pat Biotechnol.* **6**, 57-68
- Gorski, A., Miedzybrodzki, R., Borysowski, J., Weber-Dabrowska, B., Lobočka, M., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Zimecki, M., Filby, G. 2009. Bacteriophage therapy for treatment of infections. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **10**, 766-774
- Gorski, A., Wazna, E., Weber-Dabrowska, B., Dabrowska, K., Switala-Jelen, K. and Miedzybrodzki R. (2006) Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**, 313-319
- Grabow, W.O.K., T.E. Neubrech, C.S Holrzhausen and Jofre, J. (1995). *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages: excretion by humans and animals. *Water Science and Technology* **31**, 223-230.

Greenfield N.J. and Hitchcock-DeGregori S.E. (1993), Conformational intermediates in the folding of a coiled-coil model peptide of the N-terminus of tropomyosin and alpha alpha-tropomyosin. *Protein Sci.*,**2**, 1263-1273

Guttman, B., Raya, R. and Kutter, E. (2005) Basic phage biology. *In Bacteriophages: biology and applications* (Kutter, E. and Sulakvelidze, A. eds). CRC press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 510p., 29-66

Hale, C.R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M.O., Graveley, B.R., Wells, L., Terns, R.M., Terns, M.P. 2009 RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell*. **139**, 945-956.

Hambly E., Tétart F., Desplats C., Wilson W.H., Krisch H.M. and Mann N.H. (2001) A conserved genetic module that encodes the major virion components in both the coliphage T4 and the marine cyanophage S-PM2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **98**, 11411-11416

Hamzeh-Mivehroud, M., Mahmoudpour, A., Rezazadeh, H., Dastmalchi, S. 2008 Non-specific translocation of peptide-displaying bacteriophage particles across the gastrointestinal barrier. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **70**, 577-581.

Hanlon, G.W., Denyer, S.P., Olliff, C.J. and Ibrahim, L.J.(2001) Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2746–2753.

Harbury, P.B., Zhang, T., Kim, P.S. and Alber, P. (1993), A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science*, **262**, 1401-1407

Havelaar, A. H., K. Furuse and W. M. Hogeboom. (1986) Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal feces. *J Appl Bacteriol* **60**, 55-262.

Hawkey PM, Jones AM. 2009 The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep;64 Suppl 1:i3-10

Hendrix, R. W. (2002) Evolution of majority. *Theoretical population biology* **61**, 471-480.

Hendrix, R.W, Lawrence, J.G., Hatfull, G.F. and Casjens, S. (2000) The origins and ongoing evolution of viruses. *Trends Microbiol.* **8**, 504-8.

Hendrix, R.W., Smith, M.C., Burns, R.N., Ford, M.E. and Hatfull, G.F., (1999) Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2192–2197.

Higgins, L.M., Lambkin, I., Donnelly, G., Byrne, D., Wilson, C., Dee, J., Smith, M., O'Mahony, D.J., 2004. In vivo phage display to identify M cell – targeting ligands. *Pharm. Res.* 21, 695-705

Hintz, H.F. and Cymbaluk, N. F. (1994) Horse nutrition. *Annu Rev Nutr* **14**, 243-267.

Hitch, G., Pratten, J. and Taylor, P. W. (2004) Isolation of bacteriophages from the oral

cavity. *Lett in Applied Microbiol* **39**, 215-219.

Holmfeldt, K., Middelboe, M., Nybroe, O. and Riemann, L. (2007) Large variabilities in host strain susceptibility and phage host range govern interactions between lytic marine phages and their *Flavobacterium* hosts. *Appl Environ Microbiol* **73**, 6730-6739.

Hoogenraad, N. J., Hird, F. J. R., Holmes, I., and Millis, F. (1967) Bacteriophages in rumen contents of sheep. *J Gen Virol* **1**, 575-576, 942-943.

Hoogenraad, N. J., Hird, F. J. R. (1970) Electron-microscopic investigation of the flora in sheep alimentary tract. *Aust J Biol Sci* **23**, 793-808.

Hoskisson, P., Smith M.C.M. 2007. Hypervariation and phase variation in the bacteriophage "resistome". *Curr Opin. Microbiol.* **10**, 396-400

Hughes, K.A., Sutherland, I.W. and Jones, M.V. (1998) Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology.* **144**, 3039-3047.

Hunt, J.F., van der Vies, S.M., Henry, L. and Diesenhofer, J. (1997), Structural adaptations in the specialized bacteriophage T4 co-chaperonin Gp31 expand the size of the Anfinsen cage. *Cell.* **90**, 361-371

Inchley, C.J., 1969 The activity of mouse Kupfer cells following intravenous injection of T4 bacteriophage. *Clin. Exp. Immunol.* **5**, 173-187

Iverson, W. G. and Mills, N. F. (1977) Succession of *Streptococcus bovis* strains with differing bacteriophage sensitivities in the rumens of two fistulated sheep. *Appl Environ Microbiol* **33**, 810-813.

Jackson S.E., ElMasry N., Fersht, A. (1993), Structure of the hydrophobic core in the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2: a critical test of the protein engineering method of analysis. *Biochemistry*, **32**, 11270-11278

Jaenicke R. (1991), Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry*, **30**, 3147-3161.

Jelesarov I. and Bosshard H.R., (1996), Thermodynamic characterization of the coupled folding and association of heterodimeric coiled coils (leucine zippers). *J.Mol.Biol.* **263**, 344-358

Jia, Y., Shan, J., Millard, A., Clokie, M.R. and Mann, N.H. (2010) Light-dependent adsorption of photosynthetic cyanophages to *Synechococcus* sp. WH7803. *FEMS Microbiol Lett.* **310**, 120-6.

Jiang, S.C. and Paul, J.H. (1994) Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/ bacteriocinogeny in the marine environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **104**, 163-172.

Jiang, S.C. and Paul, J.H.(1997) Significance of lysogeny in the marine environment: Studies

with isolates and a model of lysogenic phage production. *Microb. Ecol.* **35**, 235–243.

Jikia, D., Chkhaidze, N., Imedashvili, E., Mgaloblishvili, I., Tsitlanadze, G., Katsarava, R., Glenn Morris, J. Jr., Sulakvelidze, A. 2005 The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90. *Clin Exp Dermatol.* **30**, 23-26.

Johnson J.R. and O'Bryan T.T. (2000) Improved repetitive – element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **7**, 265-273.

Johnson L.K., Brown M.B., Carruthers E.A. (2004) Sample size, Library composition, and Genotypic Diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4478-4485

Johnson, J.R. and Clabots, C. (2000) Improved repetitive – element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **7**, 258-264.

Kang, S.K., Woo, J.H., Kim, M.K., Woo, S.S., Choi, J.H., Lee, N.K., Choi, Y.J. 2009 Identification of a peptide sequence that improves transport of macromolecules across the intestinal mucosal barrier targeting goblet cells. *J. Biotechnol.* **135**, 210-216.

Kaplan, J.B. (2011) Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs.* (9), 737-751. doi: 10.5301/ijao.5000027.

Kasman, L. (2005) Barriers to coliphage infection of commensal intestinal flora of laboratory mice. *Virology*, **2**, 34.

Kasman, L., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schmidt, M.G., Norris, J.S. (2002) Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J. Virol.* **76**, 5557 – 5564.

Kay, M.K., Erwin, T.C., McLean, R.J., Aron, G.M. (2011) Bacteriophage ecology in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* mixed-biofilm communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 821-829

Kihara, A., Akiyama Y. and Ito, K. (2001) Revisiting the lysogenization control of bacteriophage lambda. *J Biol Chem* **276**, 13695 - 13700.

Kiliç, A. O., Pavlova, S. I., Alpay, S., Kiliç, S. S. and Tao, L. (2001) Comparative study of vaginal *Lactobacillus* phages isolated from women in the United States and Turkey: prevalence,

morphology, host range, and DNA homology. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 31-39.

Klieve, A. V. and Swain, R. A. (1993) Estimation of rumenal bacteriophage numbers by puls-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2299-2303.

Klieve, A.V. (1991) Bacteriophages from the forestomachs of Australian Marsupials. *Appl Environ Microbiol* **57**, 3660-3663.

Kolter, R., Siegele, D.A. and Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 855-874.

Kostyuchenko V.A., Chipman P.R., Leiman P.G., Arisaka F., Mesyanzhinov V.V. and Rossmann M.G. (2005) The tail structure of bacteriophage T4 and its mechanism of contraction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **9**, 810-813

Krisch, H.M., Comeau, A.M. (2008) The immense journey of bacteriophage T4--from d'Hérelle to Delbrück and then to Darwin and beyond. *Res Microbiol.* 2008 **159**, 314-24

Krogfelt, K. A., Poulsen, L. K. and Molin, S. (1993) Identification of coccoid *Escherihia coli* BJ4 cells in the large intestine of streptomycin-treated mice. *Infect Immun* **61**, 5029-5034.

Krupovic, M., Bamford, D.H. (2011) Double-stranded DNA viruses: 20 families and only five different architectural principles for virion assembly. *Curr Opin Virol.* **1**, 118-124.

Krupovic, M., Prangishvili, D., Hendrix, R.W. and Bamford, D.H. (2011) Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere. *Microbiol Mol Biol Rev.* **75**, 610-635.

Krylov, V. N., Dela Cruz, D. M., Hertveldt, K. and Ackermann, H. W. (2007) "phiKZ-like viruses", a proposed new genus of myovirus bacteriophages. *Arch Virol* **152**, 1955 - 1959.

Kulikov E. E., Isaeva A. S., Rotkina A. S., Manykin A. A., and Letarov A.V. (2007) Diversity and dynamics of bacteriophages in horse feces. *Mikrobiologiya* **76**, 271- 278.

Lawrence, J.G., Hatfull, G.F. and Hendrix, R.W., (2002) Imbroglios of viral taxonomy: Genetic exchange and failings of phenetic approaches. *J Bacteriol* **184**, 4891-4905.

LeClerc, J.E., Li, B., Payne, W.L., & Cebula T.A., (1996) High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* **274**, 1208-1211.

Leipe, D.D., Aravind, L. and Koonin, E.V. (1999) Did DNA replication evolve twice independently? *Nucl. Acids Res.* **27**, 3389-3401.

Lenski, R.E., Levin, B.R.(1985) Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage: A model, some experiments and predictions for natural communities. *Am. Nat.* **125**, 585-602.

Lepage, P., Colombet, J., Marteau, P., Sime-Ngando, T., Doré, J., Leclerc, M.. (2008) Dysbiosis

in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* **57**, 424-425.

Lewis, K. 2008 Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* **322**, 107-131

Livermore, D.M. 2009 Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep;64 Suppl 1:i29-36

Lu, T.K., Collins, J.J. 2007 Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 11197 - 11202

Lumb, K.J., Carr, C.M. and Kim, P.S. (1994) Measurement of interhelical electrostatic interactions in the GCN4 leucine zipper. *Biochemistry*, **33**, 7361-7367

Lupas A. (1996), Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 375-382

Lusiak-Szelachowska, M., Weber-Dabrowska, B. and Gorski, A. (2006) The presence of bacteriophages in human feces and their potential importance. *Pol Merkur Lekarski* **124**, 381-383.

Macfarlane, S., and Dillon, J.F. (2007) Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* **102**, 1187-1196.

Martin, R., Soberyn, N., Escobedo, S., Suarez, J. 2009 Bacteriophage induction versus vaginal homeostasis: role of H₂O₂ in the selection of *Lactobacillus* defective prophages. *Int. Microbiol.* **12**, 131-136

Matouschek A., Serrano L., Ferscht A. (1994), Mechanisms of protein folding (Ed. Pain R.H.) Oxford: Oxford Univ. Press, 137-159

Matthews, R.E.F., 1983, The history of viral taxonomy, In A Critical Appraisal of Viral Taxonomy, Matthews, R.E.F., Ed., CRC Press, Boca Raton, 1-35.

Meier S., Guthe S., Kiefhaber T. and Grzesiek S. (2004) Foldon, the natural trimerization domain of T4 fibritin, dissociates into a monomeric A-state form containing a stable b-Hairpin: atomic details of trimer dissociation and local b-hairpin stability from residual dipolar couplings. *J. Mol. Biol.* **334**, 1051-1069

Miedzybrodzki, R., Switala-Jelen, K., Fortuna, W., Weber-Dabrowska, B., Przerwa, A., Lusiak-Szelachowska, M., Dabrowska, K., Kurzepa, A., Boratynski, J., Syper, D., Pozniak, G., Lugowski, C. and Gorski, A. (2008) Bacteriophage preparation inhibition of reactive oxygen species generation by endotoxin-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Virus Res* **131**, 233-242.

Milnovich, G.J., Trott, D.J., Burrell, P.C., van Eps, A.W., Thoenner, M.B., Blackall, L.L., Al

Jassim, R.A., Morton, J.M. and Politt, C.C. (2006) Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. *Environ Microbiol* **8**, 885-898.

Miller, E.S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T. and Ruger, W. (2003) Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 86-156.

Miller, R. V., Day, M. (2008). Contribution of lysogeny, pseudolysogeny, and starvation to phage ecology. In S. T. Abedon (ed): *Bacteriophage Ecology*. Cambridge U. Press, Cambridge, pp. 114-143

Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S.A., Wu, G.D., Lewis, J.D. and Bushman, F.D. (2011) The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* **21**, 1616-1625.

Mo, J.M. and Holtzer, M.E., (1991), Kinetics of self-assembly of alpha alpha-tropomyosin coiled coils from unfolded chains. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA*, **88**, 916-920

Mo, J.M. Holtzer, M.E. and Holtzer, A. (1992) Kinetics of self-assembly of alpha alpha-tropomyosin coiled coils from unfolded chains. *Biopolymers*, **32**, 1581-1587

Moebus, K.(1983) Lytic and inhibition responses to bacteriophages among marine bacteria, with special reference to the origin of phage-host systems. *Helgol. Meeresunters* **36**, 375-391.

Mondigler, M., Ayoub, A.T. and Heller, K.J. (2006) The DNA region of phage BF23 encoding receptor binding protein and receptor blocking lipoprotein lacks homology to the corresponding region of closely related phage T5. *J Basic Microbiol.* **46**, 116-25.

Monera, O.D., Kay, C.M. and Hodges, R.S.(1994), Electrostatic interactions control the parallel and antiparallel orientation of alpha-helical chains in two-stranded alpha-helical coiled-coils. *Biochemistry*, **33**, 3862-3871

Monod, C., F. Repoila, M. Kutateladze, F. Te'tart, and H. M. Krisch. (1997) The genome of the pseudoT-even bacteriophages, a diverse group that resembles the T-even phages. *J. Mol. Biol.* **267**, 237-249

Mosig G. and Hall D.H. (1994) Gene expression: A paradigm of integrated circuits. In: (J.D. Karam, J.W. Drake, K.N. Kreuzer, G. Mosig, D.H. Hall, F.A. Eiserling, L. Black, E.K. Spicer, E.M. Kutter, K. Carlson E.S. Miller eds.) *Molecular Biology of Bacteriophage T4*. American Society for Microbiology. Washington, DC., 127-131

Muniesa, M., Moce-Llivina L., Katayama H. and Jofre J. (2003) Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages. *Antonie Van Leeuwenhoek* **83**, 305-315.

Murray, A.G. and Jackson, G.A. (1992) Viral dynamics: A model of the effects of size, shape,

motion, and abundance of single-celled planktonic organisms and other particles. *Marine Ecology Progress Series* **89**, 103–116.

Myszka, D.G. and Chaiken, I.M. (1994), Design and characterization of an intramolecular antiparallel coiled coil peptide. *Biochemistry*, **33**, 2363-2372;

Navarro Llorens J.M., Tormo, A. and Martínez-García, E. (2010) Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **34**, 476-495.

Nolan, J., Petrov, V., Bertrand, C., Krisch, H.M., Karam, J.D., 2006. Genetic diversity among five T4-like bacteriophages. *Virology* **3**, 30.

O'Flaherty, S., Ross, R.P., Coffey, A. 2009 Bacteriophages and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 801

O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 49–79.

Olivera, A., Sereno, R., Nicolau, A., Azeredo, J. (2009) The influence of the mode of administration in the dissemination of three coliphages in chickens. *Poultry Sci.*, **88**, 728-733.

Pajtasz-Piasecka, E., Rossowska, J., Dus, D., Weber-Dabrowska B., Zablocka, A. and Gorski, A. (2008) Bacteriophages support anti-tumor response initiated by DC-based vaccine against murine transplantable colon carcinoma. *Immunol Lett* **116**, 24-32.

Pal, C., Macia, M., Oliver, A., Schachar, I., Buckling, A., 2009. Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. *Nature*. **450**, 1079-1081

Pavlova, S.I. and Tao, L. (2000) Induction of vaginal *Lactobacillus* phages by cigarette smoke benzo[a]pyrene diol epoxide. *Mutat Res* **466**, 57-62.

Paynter, M.J.B., Ewert D.L. and Chalupa W. (1969) Some morphological types of bacteriophages in bovine rumen contents. *Applied Microbiol* **18**, 942-943.

Pearl, S., Gabay, C., Kishony, R., Oppenheim, A., Balaban, N. 2008 Nongenetic individuality in the host–phage interaction. *PLoS Biol* **6**(5): e120. doi:10.1371/journal.pbio.0060120

Pechar, M. and Pola, R. (2012) The coiled coil motif in polymer drug delivery systems. *Biotechnol. Adv.* Jan 12. [Epub ahead of print]

Petrov, V.M., Ratnayaka, S., Nolan, J.M., Miller, E.S. and Karam, J.D. (2010) Genomes of the T4-related bacteriophages as windows on microbial genome evolution. *Virology* **7**, 292.

Poullain, V., Gandon, S., Brokhurst, M.A., Buckling, A. and Hochberg, M.E. (2008) The evolution of specificity in evolving and coevolving antagonistic interactions between a bacteria and its phage. *Evolution* **62**(1), 1-11.

Poulsen, L. K., Licht, T. R., Rang, C., Krogfelt, K. A. and Molin. S. (1995) Physiological state of

Escherichia coli B14 growing in the large intestine of streptomycin - treated mice. *J Bacteriol* **177**:5840-5845.

Prilipov A.G., Selivanov N.A., Nikolaeva L.I., Mesyanzhinov V.V. (1988) Nucleotide and deduced amino acid sequence of bacteriophage T4 gene *wac*. *Nucleic Acids Reseach*, **16**, 10361

Przerwa, A., Zimecki, M., Swiła-Jelen, K., Dabrowska, K., Krawczyk, E., Luczak, M., Weber-Dabrowska, B., Syper, D., Miedzybrodzki, R. and Gorski, A. (2006) Effects of bacteriophages on free radical production and phagocytic functions. *Med Microbiol Immunol*. **195**, 143-150.

Ptitsyn O.B. (1998), Protein folding and protein evolution: common folding nucleus in different subfamilies of c-type cytochromes? *J. Mol. Biol.* **278**, 655-666

Ptitsyn O.B. and Uversky V.N. (1996), All-or-none solvent-induced transitions between native, molten globule and unfolded states in globular proteins. *Folding & Design*, **1**, 117-122.

Ptitsyn O.B., Lim V.I., Finkelstein A.V. (1972), Analysis and simulation of biochemical systems (Eds. Hess B. and Hemker H.C.), North Holland. Publ. Comp., Amsterdam, 421-431.

Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J. (1997) Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. *In: DNA markers: protocols, applications, and overviews.* (Caetano-Anolles G. and Gresshoff P.M. eds.). New York, 151-171.

Ramachandran G.N., Sasisekharan V., (1968), Conformation of polypeptides and proteins *Adv. Prot. Chem.* **23**, 283-291

Rasmussen, M., Jacobson, M. and Bjork L. (2003) Genome – based identification and analysis of collagen-related motifs in bacterial and viral proteins. *The J. Biol. Chem.* **278**, 32313-32316

Raynaud, A., Cloastre, L., Bernard, J., Laveran, H., Ackermann, H.W., Licois, D., Joly, B. 1992 Characteristics and diffusion in the rabbit of a phage for *Escherichia coli* 0103. Attempts to use this phage for therapy. *Vet. Microbiol.* **30**, 203-212.

Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F.E., Heath, A.C., Rohwer, F. and Gordon, J.I. (2010) Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* **466**, 334–338.

Ricca, D. M. and Cooney, J. J. (2000) Screening environmental samples for source – specific bacteriophage hosts using a method for simultaneous pouring of 12 petri plates. *J Indust Microbiol Biotechnol* **24**, 124-126.

Rice, S.A., Tan, C.H., Mikkelsen, P.J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., Hauser, A., McDougald, D., Webb, J.S. and Kjelleberg, S. (2009) The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J.* **3**, 271-282.

Riipinen, K. A., Raisanen, L., Alatosava, T. (2007) Integration of the group c phage JCL1032 of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* and complex phage resistance of the host. *J Appl Microbiol* **103**, 2465-2475.

Ritchie, A.E., Robinson, I.M., and Allison, M.J. (1970) Rumen bacteriophage: survey of morphological types. In: *Microscopie electronique*, ed. Favard P. 1970, vol. 3, pp. 333-334. Paris: Societe Francaise de Microscopie electronique (cited by Tarakanov, 2006).

Robertson, B.R. and Button, D.K.(1989) Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size, and apparent DNA content by flow cytometry. *Cytometry* **10**, 70–76.

Saha, R., Dasgupta, S., Banerjee, R., Mitra-Bhattacharyya, A., Söll ,D. , Basu, G. and Roy, S. A. (2012) Functional Loop Spanning Distant Domains of Glutaminyl-tRNA Synthetase Also Stabilizes a Molten Globule State. *Biochemistry*. May 22. [Epub ahead of print]

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sandmeier, H. 1994. Acquisition and rearrangement of sequence motifs in the evolution of bacteriophage tail fibers. *Mol. Microb.* **12**, 343–350.

Santucci, R., Sinibaldi, F. and Fiorucci, L. (2008) Protein folding, unfolding and misfolding: role played by intermediate States. *Mini Rev Med Chem.* **8**, 57-62.

Schaper M., Jofre, J., Uys M. and Grabow, W. O. K. (2002) Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *J Appl Microbiol* **92**, 657-667.

Schmid, E. N., von Recklinghausen, G. and Ansorg. R. (1990) Bacteriophages in *Helicobacter (Campylobacter) pilori*. *J Med Microbiol* **32**, 101-104.

Schrader, H.S., Schrader, J.O., Walker, J.J., Wolf, T.A., Nickerson, K.W. and Kokjohn, T.A.(1997) Bacteriophage infection and multiplication occur in *Pseudomonas aeruginosa* starved for 5 years. *Can. J. Microbiol.* **43**, 1157–1163.

Scott A. E., Timms, A. R., Connerton, P. L., El-Shibiny, A. and Connerton, I. F. (2007a) Bacteriophage influence *Campylobacter jejuni* types populating broiler chicken. *Environ Microbiol* **9**, 2341-2353.

Scott A. E., Timms, A. R., Connerton, P. L., Loc Carillo, C., Radzum, K. A., and Connerton, I. F. (2007b) Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLoS Biology* **3**, 114.

Seckler, R. Assembly of multi-subunit structures. (2000) *In Mechanisms of Protein Folding* (Pain, R., ed.) Oxford University Press, Oxford. , 279–308

Seurinck, S., Verstraete, W. and Siciliano, S.D. (2003) Use of 16S – 23S rRNA intergenic spacer region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analyses of *Escherichia coli* isolates to identify nonpoint fecal sources/ *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 4942-4950.

Shakhnovich E.I., Abkhevich V., Ptitsyn O.B. (1996), Conserved residues and the mechanism of protein folding. *Nature*, **379**, 96-98

Smith, H.W., Huggins, M.B. 1983 Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1111 - 1126

Sobolev B.N., Mesyanzhinov V.V. (1991) The *wac* gene product of bacteriophage T4 contains coiled-coil structural patterns, *J. Struct. Biol.*, **8**, 953-965

Sorek, R., Kunin, V., Hugenholtz, P. 2008 CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol.* **6**, 181-186

Sosnick T.R., Mayane, L., Hiller, R. Englander S.W. (1994) The barriers in protein folding, *Nature Struct. Biol.*, **1**, 149-156.

Stephen, A. M. and Cummings, J. H. (1980) The microbial contribution to human fecal mass. *J Med Microbiol* **13**, 45-56.

Stewart, F.M. and Levin, B.R.(1984) The population biology of bacterial viruses: why be temperate. *Theor. Popul. Biol.* **26**, 93–117.

Strelkov S.V., Tao Y., Shneider M.M., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G.(1998), Structure of bacteriophage T4 fibritin M: a troublesome packing arrangement. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **54**, 805-816.

Stryiak, I., Kmet, V., and Spanova, A., (1989) Isolation and characterization of two rumen *Streptococcus bovis* bacteriophages. *Microbiologica* **12**, 317-322.

Sulakvelidze, A. and Barrow, P.(2005) Phage therapy in animals and agribusiness. In: *Bacteriophages: biology and applications*. Eds. Kutter, E. and Sulakvelidze, A. pp. 335-380. Boca Raton: CRC Press.

Sulakvelidze, A. and Kutter, E. (2005) Bacteriophage therapy in humans. In: *Bacteriophages: biology and applications*. Eds. Kutter, E. and Sulakvelidze, A. pp. 381-436. Boca Raton: CRC Press.

Summers, W.C. (2005) Bacteriophage research: early history *In Bacteriophages: biology and applications* (Kutter, E. and Sulakvelidze, A. eds). CRC press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 510p., 5-28

- Sundin, G.W., Weingard, M.R. 2007. The microbiology of mutability. *FEMS Microbiol. Let.* **277**, 11-20.
- Sutherland, T.D., Weisman, S., Walker, A.A. and Mudie, S.T. (2012) Invited review: the coiled coil silk of bees, ants, and hornets. *Biopolymers*. **97**, 446-454.
- Suttle, C.A. and Chan, A.M. (1994) Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Synechococcus* spp. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3167–3174.
- Suttle, C.A., Chan, A.M., Cottrell, M.T. (1990) Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature* **347**: 467–469.
- Swain, R. A., Nolan, J. V. and Klieve, A. V. (1996) Effect of tannic acid on the bacteriophage population of the rumen. *Microbiology Australia* **17**, A87(GWP.27)
- Swain, R. A., Nolan, J. V. and Klieve, A. V. (1996) Natural variability and diurnal fluctuations within the bacteriophage population in rumen. *Appl Environ Microbiol* **62**, 994-997.
- Tao Y., Strelkov S., Rossmann M., Mesyanzhinov V.V.(1997) Structure of bacteriophage T4 fibrin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain. *Structure*, **5**, 789-798;
- Tarakanov B.V. (1971a) Bacteriophages in cattle rumenal contents. *Mikrobiologia*, **40**, 544-550.
- Tarakanov, B.V. (1971b) The electron-microscopy examination of the microflora of reindeer rumen. *Mikrobiologia*, **41**, 862-870.
- Tarakanov, B.V. (2006) The phenomenon of bacteriophagy in the rumen of ruminants. Moscow: Nauchny mir.
- Tétart F., Desplats C., Kutateladze M., Monod C., Ackermann H.W. and Krisch H.M. (2001) Phylogeny of the major head and tail genes of the wide-ranging T4-type bacteriophages. *J Bacteriol.* **183**, 358-366
- Tétart, F., Desplats, C., Krisch, H.M., 1998. Genome plasticity in the distal tail fiber locus of the T-even bacteriophage: recombination between conserved motifs swaps adhesin specificity. *J. Mol. Biol.* **282**, 543–556.
- Thurber, R.V. (2009) Current insights into phage biodiversity and biogeography *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 582-587.
- Tock, M.R., Dryden, D.T. 2005, The biology of restriction and antirestriction. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 466-472
- Truscott, K.N., Bezawork-Geleta, A. and Dougan, D.A. (2011) Unfolded protein responses in bacteria and mitochondria: a central role for the ClpXP machine. *IUBMB Life.* **63**, 955-963.
- Tsong T.Y., Baldwin, R.L. and McPhie P. (1972), A sequential model of nucleation-

dependent protein folding: kinetic studies of ribonuclease A. *J.Mol.Biol.* **63**, 453-469.

Twort F.W., 1915, An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses, *Lancet*, **2**, 1241.

Uchiyama, J., Maeda, Y., Takemura, I., Chess-Williams, R., Wakiguchi, H., Matsuzaki, S. 2009 Blood kinetics of four intraperitoneally administered therapeutic candidate bacteriophages in healthy and neutropenic mice. *Microbiol. Immunol.* **53**, 301-304.

Van Regenmortel M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Eds., 2000, *Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, San Diego, pp 3-16

Vinga, I., Sao-Jose, C., Tavares, P., Santos, M. 2006. Bacteriophage entry in the host cell. In Modern bacteriophage biology and biotechnology, Wegrzyn G. ed. Research signpost, Kerala, India

Vitiello, C. L., Merrill, C. R. and Adhya, S. (2005) An amino acid substitution in a capsid protein enhances phage survival in mouse circulatory system more than a 1000-fold. *Virus Res* **114**, 101-103.

Waterbury, J.B., and Vaolois, F.W. (1993) Resistance to co-occurring phages enables marine *Synechococcus* communities to coexist with cyanophages abundant in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3393-3399.

Weinbauer, M. (2004) Ecology of procaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* **28**:127-181.

Weinbauer, M.G. and Peduzzi, P.(1994) Frequency, size and distribution of bacteriophages in different marine bacterial morphotypes. *Marine Ecology Progress Series* **108**, 11-20.

Weitz, J. S., Hatman, H. and Levin, S. A. (2005) Coevolution arms races between bacteria and bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci* **102**, 9535-9540.

Wells, J. E. and Russel, J. B. (1996) Why do many rumenal bacteria die and lyse so quickly. *J Dairy Sci* **79**, 1487-1495.

Wendt H., Berger C., Baici A. and Thomas R.M., Bosshard H.R (1994 a) Kinetics of folding of leucine zipper domains., **34**, 4097-4107

Wendt, H., Baici, A. and Bosshard H.R. (1994b), Mechanism of assembly of a leucine zipper domain *J.Am.Chem.Soc.*, **116**, 6973-6974

Wendt, H., Leder, L., Harma, H., Jelesarov, I., Baici, A. and Bosshard, H.R., (1997), Very rapid, ionic strength-dependent association and folding of a heterodimeric leucine zipper. *Biochemistry*, **36**, 204-213

Wiedenheft, B., Zhou, K., Jinek, M., Coyle, S.M., Ma, W., Doudna, J.A. 2009 Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense. *Structure*. **17**, 904-912

Wiggins, B.A. and Alexander, M. (1985) Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl Environ Microbiol* **48**, 19-23.

Wommack, K.E., Colwell, R.R. (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**, 69-114.

Wood W.B., Eiserling F.A., Crowther R.A. (1994) Long tail fibers: genes, proteins, structure, and assembly. *In* Bacteriophage T4 (Karam J.D., ed.) American society for microbiology, Washington D.C., 282-290

Woods, D.R. (1976) Bacteriophage growth on stationary phase *Achromobacter* cells. *J. Gen. Virol.* **32**, 45-50.

Yanagida M., Ahmad-Zadeh C. (1970) Determination of gene product positions in bacteriophage T4 by specific antibody association. *J Mol Biol.* **51**, 411-421

Yoshida, T., Ellner, S. P., Jones, L. E., Bohannan, B. J. M., Lenski, R. E. and Hairston, N.G. Cryptic population dynamics: rapid evolution masks trophic interactions. (2007) *PLoS Biol* **5**, 1868-1879.

Zhang, T., Breitbart, M., Heng Lee, W., Run, J. Q., Lin Wei, C., Wee Ling Soh, S., Hibberd, M. L., Liu, E. T., Rohwer, F., and Ruan, Y. (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol* **4(1)**:e3.