

На правах рукописи

Николай Сергеевич Прохоров

**Распознавание клеточной поверхности
N4-подобными вирусами**

03.01.03 – молекулярная биология
03.02.02 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена в лаборатории вирусов микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН и лаборатории структурной биологии и биофизики Федеральной Политехнической Школы Лозанны (EPFL).

Научный руководитель

Андрей Викторович Летаров

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией вирусов микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН.

Официальные оппоненты

Константин Анатольевич Мирошников

доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Алексей Геннадьевич Прилипов

доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Николай Валентинович Воложанцев

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

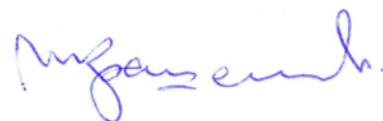
Защита диссертации состоится 9 ноября 2017 г. в 17:30 на заседании диссертационного совета МГУ.03.01 на Биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, ауд. М1.

Диссертация и автореферат диссертации размещены на сайте Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (www.bio.msu.ru) и ИАС «ИСТИНА» (<http://istina.msu.ru>). Так же с диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ им М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 7 октября 2017 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

Общая характеристика работы

Вирусы бактерий – бактериофаги – сыграли исключительную роль в развитии молекулярной биологии, молекулярной генетики и структурной биологии в качестве удобного и благодарного объекта исследований (Salmond & Fineran, 2015). Сейчас, после появления первых адекватных оценок численности и генетического разнообразия бактериофагов, они вновь стали всерьёз рассматриваться в качестве потенциального средства борьбы с патогенными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью (Bergh et al., 1989, Mann, 2005, Kazmierczak et al., 2014, Casjens & Grose, 2016).

Согласно установившимся к настоящему времени представлениям со сдержанным оптимизмом можно утверждать, что к любому штамму бактерий, в том числе патогенному, может быть подобран бактериофаг, способный узнавать и лизировать бактериальные клетки. Находить такой вирус для каждого нового патогена представляется существенно более простой задачей, чем разработка, получение и внедрение новых действенных антибиотиков (Stone, 2002, Abedon et al., 2017). Потенциальные преимущества стратегии поиска новых эффективных в медицинском и биотехнологическом контексте вирусов включают легкость стандартизации подходов и протоколов и относительную нетребовательность технологического процесса. Разработка антибактериальных препаратов на основе бактериофагов теоретически возможна в условиях, в которых поиск новых антибиотиков вряд ли может увенчаться успехом, что может иметь особое значение для населения и экономик развивающихся стран (Nagel et al., 2016).

Применение бактериофагов для борьбы с патогенными бактериями, как и применение антибиотиков, имеет естественные ограничения (Labrie et al., 2010). Устойчивость к бактериофагам предсуществует в природных популяциях бактерий. Устойчивые формы бактерий к любому вирусу могут быть отобраны в простейших экспериментах *in vitro*, и, вне всякого сомнения, непрерывно возникают в природных популяциях. Кроме того, по всей видимости, бактериофаги и их непростые взаимоотношения с хозяевами эволюционировали таким образом, чтобы оставить вирусам возможность сосуществовать с чувствительными клетками в естественных условиях. Нетрудно представить себе судьбу фага, лизировавшего последнюю чувствительную к нему клетку.

Существует несколько принципиальных подходов, позволяющих надеяться на повышение эффективности антибактериальных препаратов на основе вирусов. Один из них предполагает составление комплексных вирусных коктейлей, направленных на элиминирование не только чувствительных штаммов бактерий, но и возникающих в ходе применения препарата устойчивых к вирусам клонов – ведь возникновение устойчивости к одним вирусам зачастую сопровождается возникновением сопутствующей чувствительности к другим. В этом случае природное разнообразие бактериофагов и особенно детерминант их специфичности – таких как хвостовые придатки Caudovirales – представляет собой один из ключей к решению проблемы (Chan et al., 2013). Другие подходы связаны с успехами генетической инженерии и синтетической биологии и подразумевают направленное

изменение детально охарактеризованных вирусов на уровне геномов для получения более эффективных и предсказуемых вирусных противобактериальных препаратов (Lu & Collins, 2009, Braff et al., 2016).

Несмотря на то, что использование вирусов в качестве терапевтических агентов имеет более продолжительную историю, чем применение антибиотиков (Stone, 2002), и так же несмотря на успехи биотехнологических компаний новейшего времени, разрабатывающих препараты для решения широкого круга проблем, связанных с бактериальными инфекциями и контаминациями, сейчас очевидно, что любое рациональное применение вирусов в качестве антибактериальных средств может быть основано только на глубоком понимании механизмов взаимодействия вирусов и их хозяев, определяющих специфический характер инфекции. В первую очередь, механизмов распознавания клеточной поверхности чувствительных штаммов (Labrie et al., 2010, Samson et al., 2013). Вопросы о том, как именно бактериофаги находят и связывают чувствительные клетки, и каким образом происходит принятие решения о введении вирусного генома, остаются до сих пор одними из самых загадочных аспектов биологии бактериофагов, и в контексте структуры и функционирования N4-подобных фагов являются предметом настоящего исследования.

Цели и задачи исследования

Цель работы – изучить устройство адсорбционного аппарата N4-подобных вирусов с коротким несократимым хвостом на примере бактериофага G7C, выявить механизмы функционирования компонентов адсорбционного аппарата, определяющие специфический характер инфекции. Кроме того, мы предполагали выявить консервативные элементы адсорбционного аппарата, общие для N4-подобных вирусов и вирусов бактерий из других групп порядка Caudovirales. Для достижения заявленных целей нами были сформулированы следующие задачи:

1. С помощью биоинформатических средств выявить в геноме бактериофага G7C гены, предположительно отвечающие за контакт с клеточной поверхностью чувствительного штамма *Escherichia coli* 4s.
2. Клонировать выявленные кандидатные гены в векторах для экспрессии в T7 системе в нативной конформации в виде гибридов с пептидными метками для аффинной хроматографии. Определить влияние рекомбинантных фаговых белков на связывание фаговых частиц с клетками.
3. Получить селекцией в присутствии фага в высокой концентрации спонтанные мутанты штамма *E. coli* 4s, устойчивые к инфекции G7C. Изучить природу клеточных рецепторов проникновения G7C путём анализа генетических и фенотипических изменений, накопленных в полученных мутантных клонах. Изучить влияние накопленных изменений на взаимодействие клеток с другими колифагами.

4. Получить в гомогенном состоянии и кристаллизовать выявленные в ходе биохимических и функциональных тестов компоненты адсорбционного аппарата фага G7C и изучить их структуру методом рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии. Охарактеризовать биохимические активности, связанные с этими структурами.
5. Разработать протокол направленного мутагенеза и отбора мутантов N4-подобных бактериофагов. Получить условных нонсенс-мутантов фага G7C по компонентам адсорбционного аппарата, изучить протеом и структуру мутантных фаговых частиц с нонсенс-фенотипом.
6. С помощью анализа геномных и структурных баз данных выявить элементы изученного адсорбционного аппарата в других представителях Caudovirales.

Практическая ценность и научная новизна работы

Серьёзной проблемой современных представлений о ранних этапах инфекции вирусов бактерий – распознавании клеточной поверхности и введении вирусного генома в клетку чувствительного штамма – представляется тот факт, что на сегодняшний день наиболее изученные системы фаг-бактерия имеют существенные нежелательные особенности (Bertozzi Silva et al., 2016). Многие бактериофаги, такие как T4, T7, N4 и другие, были выделены на адаптированных к росту *in vitro* лабораторных штаммах бактерий, лишённых поверхностных полисахаридов – O- и K-антигенов, играющих исключительную роль в физиологии бактерий, их взаимодействии друг с другом, вирусами бактерий, иммунной системой человека, окружающей средой (Demerec & Fano, 1945, Schito, 1973). Исследования бактериофагов, инфицирующих полевые штаммы бактерий, адаптированные к существованию в естественной среде, в том числе настоящая работа, способствуют пониманию механизмов инфекции, релевантных происходящим в природе событиям.

В представленной работе с помощью комплексного структурного и функционального подхода детально охарактеризована система вирус – индигенный хозяин (N4-подобный фаг G7C и *E. coli* 4s), изолированная из естественного микробного сообщества пищеварительной системы лошади. Показано, что адсорбционный аппарат вируса G7C включает продукты генов 63.1 и 66. Соответствующие белки получены в рекомбинантном виде и кристаллизованы, структуры белков определены методом рентгеноструктурного анализа. Для белка gp63.1 показана эстеразная активность, опосредующая специфический характер первичного взаимодействия вируса с чувствительным штаммом *E. coli* 4s. Существуют литературные данные о способности некоторых фагов деацетилировать углеводы клеточной поверхности бактерий (Taylor, 1965, Iwashita & Kanegasaki, 1976), однако вирусный белок с такой активностью идентифицирован и изучен впервые. O-антиген идентифицирован в качестве первичного клеточного рецептора. Методом ЯМР-определена его структура. O-антиген штамма *E. coli* 4s похож на O-антиген *E. coli* O22, но дополнительное гликозилирование повторяющегося звена делает установленную структуру уникальной. С помощью анализа взаимодействия рекомбинантных белков gp63.1 и gp66, а также

делеционных мутантов gp66, *in vitro* выявлены домены, ответственные за образование разветвленного адсорбционного аппарата G7C. Полученные данные о характере взаимодействия белков подтверждены анализом протеома нонсенс-мутантов G7C по компонентам адсорбционного аппарата, полученных в непермиссивных условиях, а так же криоэлектронной реконструкцией вирионов G7C дикого типа и мутантов. Анализ баз данных вирусных и бактериальных геномных последовательностей позволил выявить консервативные элементы изученного адсорбционного аппарата и их присутствие во всех трёх семействах хвостатых вирусов – Podoviridae, Siphoviridae и Myoviridae. Определение структуры gp10 фага T4, содержащего домены, гомологичные gp66 G7C, в рамках проекта по изучению базальной пластинки T4 дополнило наши представления о структуре и возможностях функционирования адсорбционного аппарата G7C.

Личное участие автора в получении результатов

Совместно с руководителем проф. А.В. Летаровым соискатель определил цели и задачи исследования, дизайн экспериментов и подготовил экспериментальные данные к публикации. Автор подготовил образцы фагов, бактерий, рекомбинантных белков и липополисахаридов для структурных и функциональных исследований, получил экспрессионные рекомбинантные конструкции, провёл мутагенез gp63.1 и gp66, штамма *E. coli* 4s и N4-подобных изолятов, в том числе фага G7C. Автором были проведены все функциональные и молекулярные исследования, изложенные в диссертации. Белок gp63.1 был кристаллизован Кристианом Риччио в лаборатории биофизики и структурной биологии под руководством проф. Петра Г. Леймана (EPFL, Лозанна). Делеционные мутанты gp66 были кристаллизованы соискателем там же. Структуры белков gp63.1 и gp66 были решены проф. П.Г. Лейманом. Криоэлектронная реконструкция вирусных частиц G7C дикого типа и мутантов была проведена Сергеем Назаровым, структура белка gp10 фага T4, содержащего домены, гомологичные белку gp66 фага G7C, была определена Николасом М.И. Тэйлором и проф. П.Г. Лейманом в рамках проекта по реконструкции базальной пластинки фага T4 (EPFL, Лозанна). ЯМР-анализ образцов бактериальных липополисахаридов был проведён в лаборатории химии углеводов ИОХ РАН под руководством проф. Ю.А. Книреля.

Апробация работы

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы были представлены на семинарах и конференциях ИНМИ РАН и ФИЦ Биотехнологии РАН, на 20-ой, 21-ой и 22-ой конференциях по биологии бактериофагов “Evergreen Phage Meeting” (Олимпия 2013, 2015, 2017), на 2-ой, 3-ей и 4-ой конференциях “Viruses of Microbes” Европейской Организации Молекулярной Биологии (Брюссель 2012, Цюрих 2014, Ливерпуль 2016), на 24-й и 25-й конференциях “Phage and Virus Assembly” (Ле Диаблере 2015, Элликотт 2017), на 1-ой, 2-ой и 3-ей конференциях “Бактериофаги: теоретические и

практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности” (Ульяновск 2012, Санкт-Петербург 2014, Москва 2016), на летней конференции по микробной гликобиологии Федерации Американских Обществ Экспериментальной Биологии (Итаска, 2014), на 18-м европейском углеводном симпозиуме EUROCARB 2015 (Москва, 2015).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 20 работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных изданиях, 14 тезисов устных и стендовых сообщений.

Структура работы

Диссертация изложена на 114 страницах, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список сокращений и список литературы, приложения. Диссертация содержит 32 рисунка, 14 таблиц, 185 ссылок на источники.

Результаты и обсуждение

Сравнение кластеров структурных генов бактериофагов N4 и G7C

Бактериофаг G7C был выделен вместе с чувствительным штаммом *E. coli* 4s в 2006 году в ходе выполнения проекта по изучению экологии колифагов симбиотического сообщества пищеварительной системы лошадей (Kulikov et al., 2012). Секвенирование генома фага позволило с уверенностью классифицировать изолят в качестве представителя весьма немногочисленного на тот момент рода N4-подобных вирусов в силу присутствия характеристических генов, таких как уникальная для этой группы фагов вирионная РНК-полимераза, и ввиду общей синтении G7C и N4, особенно яркой в области поздних генов – между генами вирионной РНК-полимеразы 50 и большой субъединицы терминазы 68. Такое сходство геномных последовательностей и их организации позволяет ожидать сходные принципы устройства вирусных частиц бактериофагов G7C и N4.

Заметным исключением из общей картины сходства являются гены, расположенные между 63 и 67 (Рис. 1). В N4 эту область занимают три гена. Ген 64 не был обнаружен в составе вириона в ходе изучения протеома фага N4. Функция его не ясна. Ген 65 был предметом интенсивных исследований. Choi et al. на основании объёмной криоэлектронной реконструкции вирусных частиц N4 дикого типа и нонсенс-мутанта по гену 65 охарактеризовали продукт гена 65 как короткий несократимый чехол, расположенный вокруг хвоста по всей его длине (Choi et al., 2008). Такая структура, короткий несократимый чехол, представляется уникальной среди всех хвостатых фагов. Однако ввиду низкого разрешения

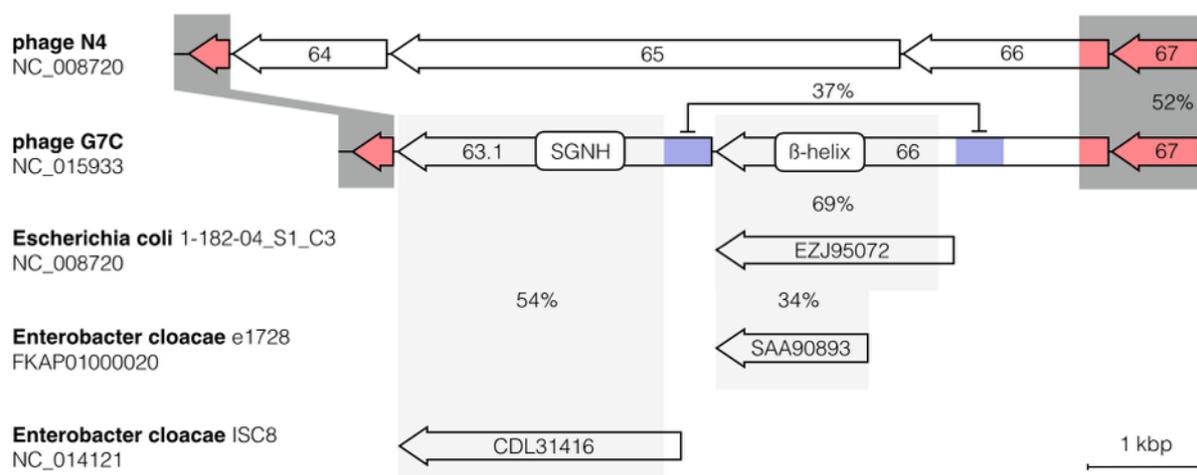


Рис. 1. Организация кластера генов, предположительно вовлечённых в распознавание и связывание клеток чувствительных штаммов *E. coli*, в геномах бактериофагов N4 и G7C. Для генов G7C показаны гомологии с клеточными генами профагового происхождения (Prokhorov, Riccio et al. 2017).

реконструкции вирусных частиц N4, возможны альтернативные толкования организации белка gr65 в вирионе. Например, gr65 может образовывать хвостовые фибриллы, лежащие вдоль вирусного хвоста. Для gr65 показана прямая роль в распознавании чувствительного штамма *E. coli* K12 W3350. Kiino & Rothman-Denes в конце 1980-х годов был проведён генетический анализ мутантов *E. coli* K12 SC1100, отобранных на устойчивость к фагу N4. Было показано, что резистентные клоны несут мутации в одном из четырёх генов, названных *nfrA*, *nfrB*, *nfrC* и *nfrD* (Kiino & Rothman-Denes, 1989). Продукты генов *nfrA* и *nfrB* были найдены во внешней и внутренней мембране соответственно. Двадцать лет спустя McPartland & Rothman-Denes показали прямое взаимодействие белков gr65 и NfrA *in vitro* и *in vivo* (McPartland & Rothman-Denes, 2009).

Третий ген кластера – 66 – кодирует белок хвостовой фибриллы. Каждая из 12-ти фибрилл вириона N4 образована тримером белка gr66. Функция этого белка так и не была определена. Вероятно, это связано с особенностью изучаемой системы фаг-бактерия. N4 был выделен и все исследования были проведены на лабораторных штаммах *E. coli* K12. Известно, что старые лабораторные штаммы *E. coli* K12 неспособны синтезировать О-антиген – один из основных компонентов клеточной поверхности Enterobacteriaceae в естественной среде, используемый многими фагами в качестве первичного рецептора проникновения.

В бактериофаге G7C между генами 63 и 66 расположены два гена, один из которых, 63.1, не имеет гомологии с последовательностями N4 вообще, а другой, ген 66, демонстрирует 58% совпадений на уровне аминокислот с геном 66 N4 на протяжении 76 N-концевых остатков. Выравнивание продуктов 63.1 и 66 против белковой базы данных NCBI даёт типичную картину для фаговых придатков. Кроме того, для белка gr63.1 уверенно находится родство с SGNH-гидролазами, демонстрирующими липазно-эстеразно-протеазную активность, а в белке gr66 предсказывается присутствие С-концевой β -спирали, типичного

компонента подовирусных хвостовых шипов. Интересно, что 20-152 N-концевые остатки gp63.1 гомологичны остаткам 306-456 белка gp66. Совокупность сделанных наблюдений позволила нам остановиться на этих белках, как вероятных компонентах адсорбционного аппарата G7C.

Получение очищенных рекомбинантных белков gp63.1 и gp66, физиологические и биохимические тесты взаимодействия с клеточной поверхностью

Сначала белки gp63.1 и gp66 были получены в T7 системе без модификаций. Оба белка при комнатной температуре экспрессировались преимущественно в растворимой форме, были устойчивы к продолжительной инкубации с трипсином, сохраняли олигомерную организацию в присутствии 1% SDS при комнатной температуре и при электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях в отсутствие нагревания перед нанесением. То есть оба белка демонстрировали набор известных из литературы свойств, характерных для хвостовых шипов фагов (Steinbacher et al., 1994).

Чтобы получить гомогенные препараты белков для дальнейших исследований мы воспользовались металлоаффинной хроматографией. Для этого было необходимо получить конструкции, кодирующие гибридные последовательности gp63.1 и gp66 с олигогистидиновыми метками на N- или C-конце. Конструкция, кодирующая C-концевой олигогистидиновый гибрид gp63.1 (далее в тексте gp63.1ht), позволила получить высокий уровень экспрессии растворимого белка, связывающегося с аффинной смолой. Однако, на основе коммерчески доступных векторов Novagen нам не удалось получить экспрессионной конструкции для белка gp66, отвечающей заданным требованиям. N-концевой олигогистидиновый гибрид gp66 экспрессировался в растворимой форме, но с металлоаффинной смолой связывался только после денатурации. C-концевой олигогистидиновый гибрид gp66 также экспрессировался в растворимой форме, но со смолой не связывался даже в 8 М мочевины. Поэтому ген 66 был клонирован в векторе pTSL в виде N-концевого гибрида со *slyD*, хелперным белком с двойной – шаперонной и пептидил-пролил-цис-транс-изомеразной – активностью (Taylor et al., 2016). Связывания gp66 со смолой, скорее всего, было затруднено из-за недоступности аффинной метки на поверхности белка. В использованной конструкции SlyD экспрессируется с олигогистидиновой меткой на N-конце, а ген 66 составляет C-концевую часть гибрида. SlyD и gp66 разделены длинным глицин-серин-богатым линкером, содержащем сайт TEV протеазы (Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase). В такой конструкции экранирование олигогистидиновой метки структурами gp66 представлялось маловероятным. И действительно, удалось добиться высокого уровня экспрессии гибридного белка 6xHis-SlyD-gp66 (далее gpS66), связывающегося с металлоаффинной смолой.

Получив белки gp63.1ht и gpS66, мы очистили их с помощью аффинной хроматографии, диализа и высокоскоростного центрифугирования, и использовали в тестах на ингибирование фаговой адсорбции на чувствительном штамме *E. coli* 4s (Рис. 2).

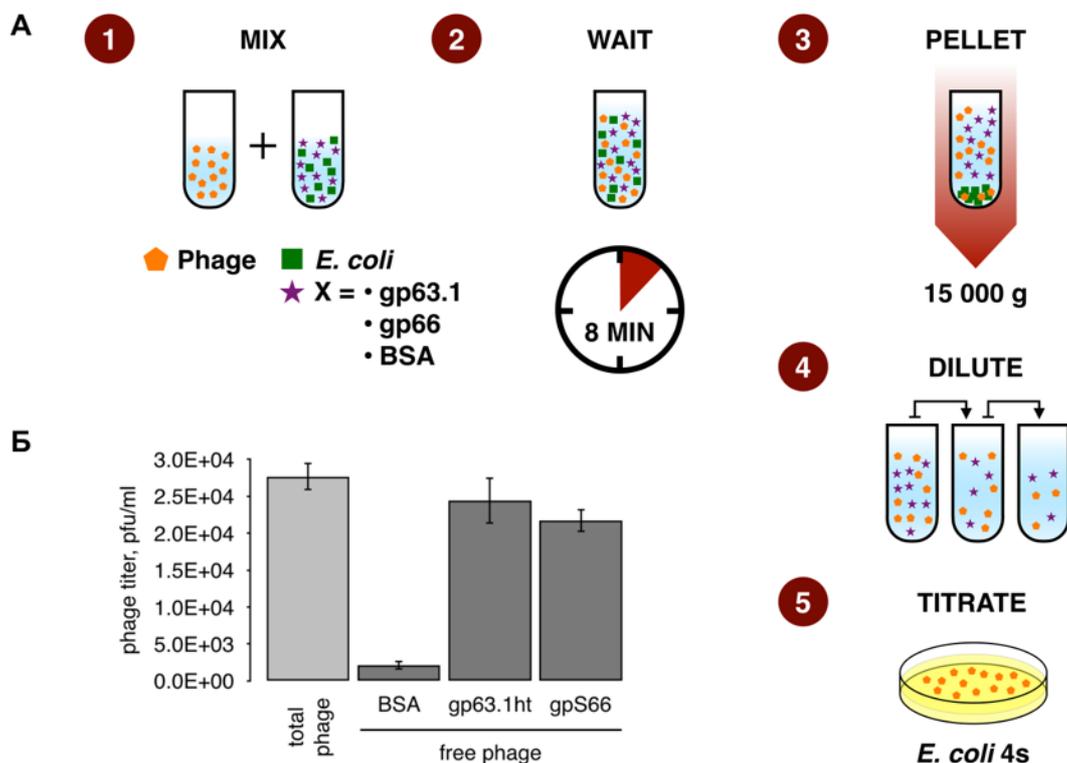


Рис. 2. Влияние кандидатных рецептор-узнающих белков G7C на адсорбцию на клетках чувствительного штамма *E. coli*. **A.** Схема эксперимента и **Б.** результат ($n=3$, $\alpha=0.05$). Рекombинантные белки gp63.1ht и gpS66, взятые в избытке, ингибируют адсорбцию G7C на клетках *E. coli* 4s (Prokhorov, Riccio et al. 2017).

Оказалось, что каждый из них ингибирует адсорбцию G7C. Чтобы исключить влияние SlyD на адсорбцию фага, мы показали, что SlyD не оказывает ингибирующего эффекта на адсорбцию G7C в тех же условиях. Полученный результат свидетельствует в пользу участия белков gp63.1 и gp66 в распознавании поверхности чувствительного штамма и адсорбции фага в качестве рецептор-узнающих белков. Интересно, что описанные в литературе подовирусы с хвостовыми шипами двух типов, используют их для распознавания и инфекции разных штаммов бактерий (Scholl et al., 2001). В случае бактериофага G7C, оба белка, gp63.1 и gp66, способны связывать компоненты поверхности штамма 4s.

Чтобы подтвердить участие обсуждаемых белков в адсорбции G7C, мы проверили способность gp63.1ht и gpS66 связываться с бактериальными клетками. Для этого к суспензии клеток штамма 4s мы добавляли рекомбинантные белки и контроль загрузки, бычий сывороточный альбумин (БСА), через определённые промежутки времени отбирали аликвоты, осаждали клетки со связавшимся с ними белками, супернатанты анализировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ и красили кумасси. Оказалось, что gp63.1ht связывается с клетками чувствительного штамма мгновенно и после этого постепенно переходит обратно в раствор (Рис. 3). Такой временный характер связывания можно объяснить, допустив, что gp63.1ht обладает ферментативной активностью в отношении клеточного рецептора. Рекombинантный хвостовой шип теряет сродство к клеточной поверхности по мере модификации рецептора. Это предположение согласуется с

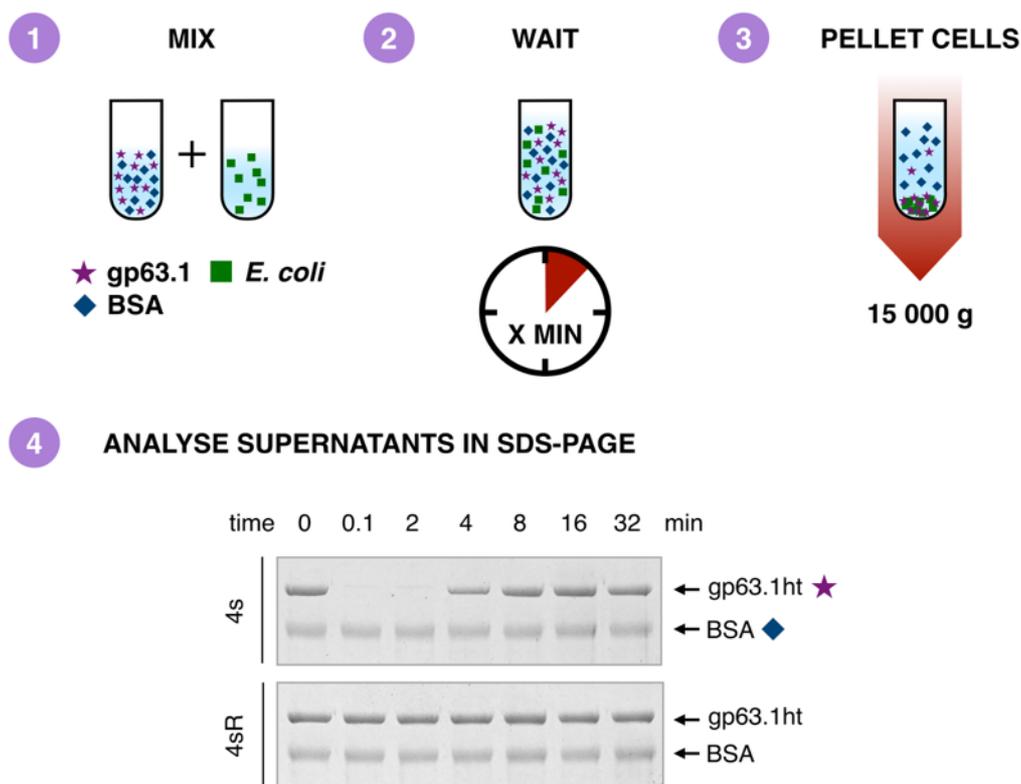


Рис. 3. Связывание рекомбинантного рецептор-узнающего белка gp63.1ht с клетками штамма *E. coli* 4s. Схема эксперимента и репрезентативный результат. Рекомбинантный gp63.1ht связывается с клетками 4s дикого типа. Связывание носит обратимый характер. Gp63.1ht не связывается с клетками мутантных клонов 4s, устойчивых к инфекции G7C (Prokhorov, Riccio et al. 2017).

биоинформатическим предсказанием ферментативного SGNH-гидролазного домена в gp63.1, а так же с литературными данными о присутствии хвостовых шипов с гидролазными и лиазными активностями в вирионах различных подовирусов, распознающих липополисахариды (ЛПС) и капсульные полисахариды бактерий (Casjens & Molineux, 2012). Мы не увидели связывания gp63.1ht с лабораторными штаммами и различными полевыми изолятами *E. coli*, на которых G7C не способен расти. Кроме того, мы не увидели связывание gp63.1ht с мутантными клонами 4s (4sR и 4sI), отобранными на резистентность к G7C (см. ниже). Примечательно, что мы так же не увидели связывания рекомбинантного gpS66 с клетками 4s, несмотря на способность белка ингибировать фаговую адсорбцию.

Получение спонтанных мутантов *E. coli* 4s с устойчивостью к G7C и анализ приобретённых изменений

Бактерии легко избегают фаговой инфекции *in vitro*. Чаще всего это происходит в результате накопления модифицирующих или инактивирующих мутаций в генах, кодирующих клеточные рецепторы инфекции, например белки-порины внешней мембраны, или в генах-компонентах метаболических путей синтеза рецепторов, например ЛПС или капсульных полисахаридов (Labrie et al., 2010). При росте в избыточной среде в присутствии фага селективное преимущество от потери рецептора фаговой инфекции обычно с лихвой

компенсирует снижение приспособленности бактериальных клеток от выключения той или иной метаболической функции.

Чтобы выяснить природу клеточных рецепторов фага G7C, мы провели селекцию клеток 4s на приобретение резистентности к фагу. Для этого клетки 4s были высажены на чашку с G7C в высоком титре. Оказалось, что клетки, устойчивые к G7C, хорошо представлены в любой клональной популяции штамма *E. coli* 4s дикого типа, и составляют примерно 0.01% от общего числа клеток. Высокий уровень естественной резистентности к G7C штамма 4s заставил нас предположить участие сложных полимеров клеточной стенки в адсорбции фага. Вероятность возникновения инактивирующей мутации, при прочих равных условиях, должна быть пропорциональна длине кодирующих последовательностей, и, в этом отношении, многостадийный метаболический путь синтеза бактериальных поверхностных полимеров должен быть более уязвим, чем, например, ген, кодирующий клеточный порин.

Мы выделили из клеток дикого типа и трёх клонов-мутантов, резистентных к инфекции G7C, мажорный компонент клеточной стенки – ЛПС. Электрофорез ЛПС в денатурирующих условиях с последующей окраской серебром выявил характерную картину бимодального разделения ЛПС, выделенных из клеток дикого типа, исчезновение характерного паттерна полос О-антигена в одном из проанализированных мутантных клонов – 4sR, и существенное изменение электрофоретической подвижности молекул ЛПС при сохранении бимодальности разделения в двух других – 4sI (Рис. 4.А). Исчезновение О-антигена в одном из мутантных

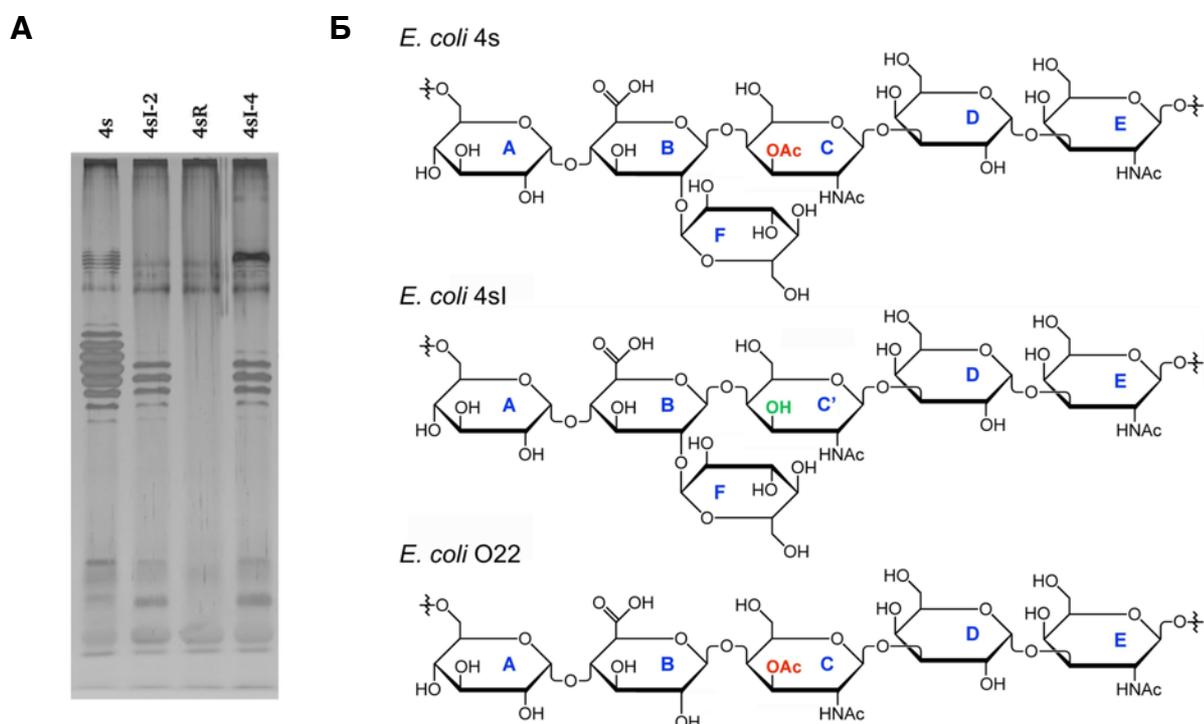


Рис. 4. А. Очищенные препараты ЛПС *E. coli* 4s дикого типа и мутантных клонов, отобранных на устойчивость к G7C. ПААГ в денатурирующих условиях. **Б.** Структуры О-антигена *E. coli* 4s и двух мутантных клонов 4sI, а так же *E. coli* O22, установленные на основании анализа ЯМР-спектров очищенных О-антигенов и биоинформатического анализа геномов соответствующих штаммов (Knirel, Prokhorov et al., 2015).

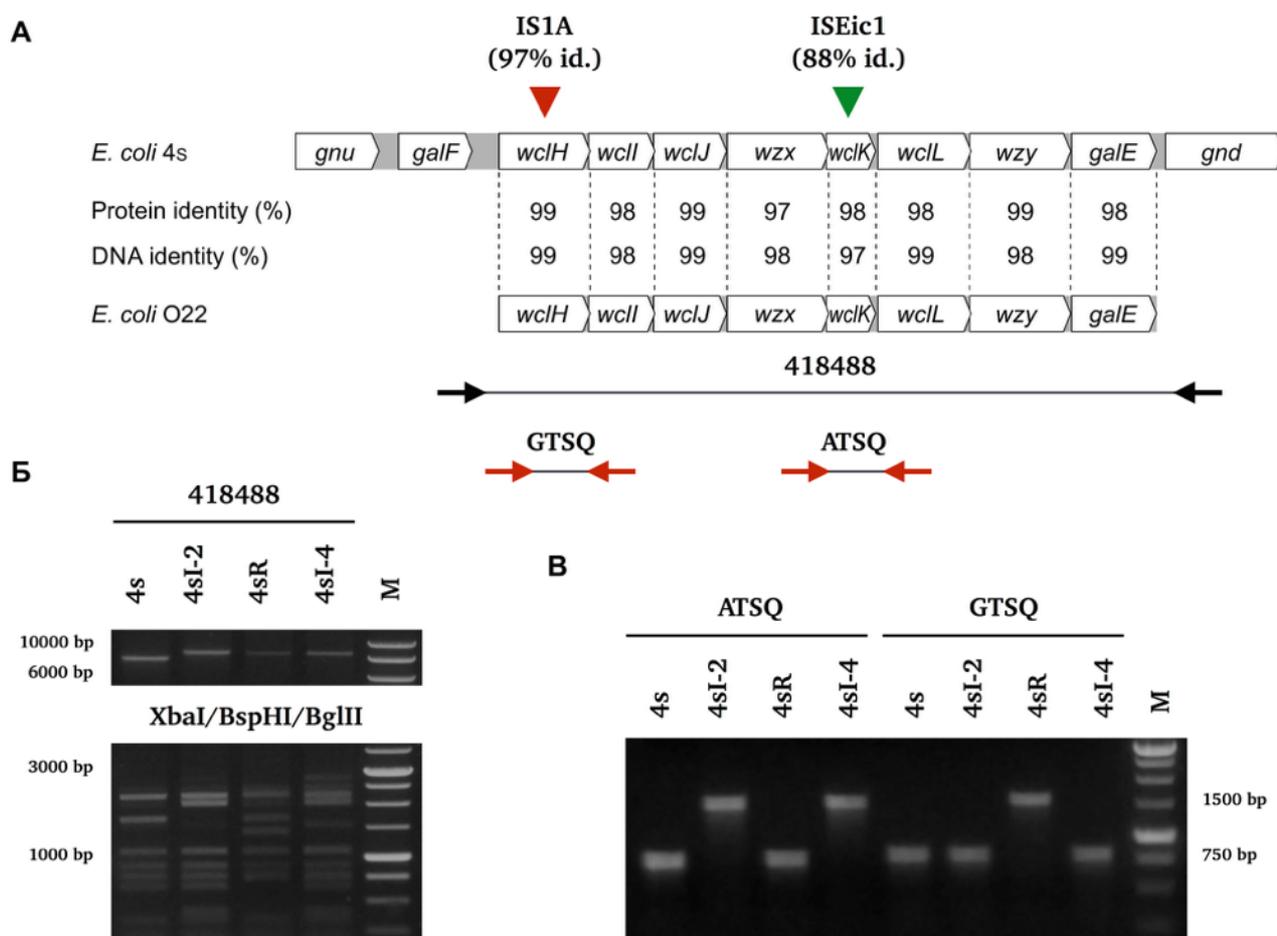


Рис. 5. А. Кластеры генов синтеза О-антигена *E. coli* 4s и O22. **Б.** и **В.** Обнаружение и картирование инсерций в кластере генов синтеза О-антигена мутантов 4sR и 4sI (Knirel, Prokhorov et al., 2015).

клонов, 4sR, и изменение подвижности ЛПС в двух других однозначно свидетельствовало в пользу участия О-антигена в фаговой адсорбции.

Кластер генов, отвечающих за синтез О-антигена 4s (GenBank: KM822859) показал высокую степень родства (97-99% нуклеотидных совпадений) с таковым уропатогенного штамма *E. coli* O22 (GenBank: DQ851855) (Рис. 5.А). Штамм 4s был серотипирован как O22. Однако прямой ЯМР-анализ показал, что, хотя структура О-антигена 4s в целом воспроизводит структуру O22, имеется заметное отличие в виде дополнительного гликозилирования второго остатка повторяющегося звена по второй гидроксильной группе (Рис. 4.Б). Три гена – *gtrA*, *gtrB* и *gtrO22* – ответственные за это гликозилирование были найдены нами в геноме 4s (GenBank: KM822855). ЯМР-анализ О-антигена мутантов 4sI-2 и 4sI-4, показал отсутствие О-ацетилирования в третьем положении третьего остатка повторяющегося звена, характерного для О-антигена дикого типа. Чтобы выяснить генетические причины выявленных фенотипических изменений мутантов 4sR и 4sI-2,4, мы амплифицировали кластер генов синтеза О-антигена каждого из них с помощью специфических праймеров. Все три мутантных клон, в отличие от 4s дикого типа, имели инсерции примерно одинакового размера. Картирование и секвенирование соответствующих локусов показало присутствие двух разных IS элементов в генах гликозил-трансферазы *wclH*

(4sR) и ацетил-трансферазы *wclK* (4sI-2,4) (GenBank: KM822858, KM822857). Примечательно, что два независимо полученных мутанта 4sI-2 и 4sI-4 имели инсерции идентичных IS элементов в одинаковых положениях (Рис. 5.Б.В).

Чтобы подтвердить связь выявленных мутаций с резистентностью к G7C, мы клонировали ген ацетил-трансферазы *wclK* из 4s дикого типа в векторе, обеспечивающем значительный уровень конститутивной экспрессии вставки (pWclK). После трансформации полученным вектором клоны 4sI-2,4 восстановили чувствительность к G7C за счёт комплементации инактивированного *wclK in trans*. Штамм 4sR после трансформации той же плазмидой сохранил устойчивость к G7C.

Из литературы известно, что О-антиген создает непреодолимую преграду для хвостатых фагов, неспособных взаимодействовать с ним специфически с помощью хвостовых придатков (Casjens & Molineux, 2012). Потеря О-антигена в результате мутаций делает клетки чувствительными к таким фагам, если на клеточной поверхности остаются подходящие рецепторы. Мы решили оценить влияние, которое оказывает потеря О-ацетилирования специфической позиции повторяющегося звена О-антигена на спектр чувствительности бактериального штамма к бактериофагам. Для это мы проверили панель имеющихся в лаборатории фагов на способность образовывать негативные колонии в газоне *E. coli* 4s дикого типа, 4sR, 4sI и 4sI, комплементированного pWclK. К нашему удивлению, инсерция IS элемента в ген *wclK* и связанная с ней потеря О-ацетилирования О-антигена сделала клетки чувствительными к тому же спектру фагов, неспособных инфицировать клетки 4s дикого типа, что и полная потеря О-антигена в штамме 4sR (Таблица 1). Комплементация штамма 4sI плазмидой pWclK восстановила спектр чувствительности,

Таблица 1. Фаговая чувствительность штамма *E. coli* 4s и его производных.

| Бактериофаги | Чувствительность штаммов <i>E. coli</i> | | | | Таксономическое положение | |
|--------------|---|-----|-----------|-----|---------------------------|-------------------|
| | 4s | 4sI | 4sI:pWclK | 4sR | Семейство | Род |
| G7C | + ^a | - | + | - | Podoviridae | N4likevirus |
| Lc30/70 | + | + | + | - | Siphoviridae | ND ^b |
| phiKT | + | + | + | - | Podoviridae | ND |
| Alt63 | + | + | + | - | Podoviridae | N4likevirus |
| DT571/2 | - | + | - | + | Siphoviridae | T5likevirus |
| DT5G | - | + | - | + | Siphoviridae | T5likevirus |
| 9G | - | + | - | + | Siphoviridae | ND |
| 17 | - | + | - | + | Myoviridae | Felix01likevirus |
| p1/4 | - | + | - | + | Myoviridae | ND |
| p21 | - | + | - | + | Myoviridae | ND |
| Gost2 | - | + | - | + | Podoviridae | Phieco32likevirus |

^a “+” и “-“ означают соответственно способность и неспособность фага лизировать бактериальные клетки в газоне на чашке Петри.

^b ND – систематическое положение фага определено с точностью до семейства.

свойственный клеткам дикого типа. Это можно объяснить, допустив, что О-ацетилирование играет исключительную роль в обеспечении неспецифической защиты клеток от фагов, например, за счёт усиления межмолекулярных взаимодействий, приводящих к уплотнению слоя ЛПС на поверхности клеток. С другой стороны такой эффект может быть объяснён плейотропным действием инсерции мобильного элемента в ген *wclK*, приводящим не только к потере О-ацетилирования, но и снижению синтеза О-антигена и соответствующему разрыхлению слоя О-антигена, что согласуется с картиной электрофореза ЛПС 4s дикого типа и исследованных мутантов.

Примечательна обнаруженная в ходе этих экспериментов неспособность фага G7C инфицировать клетки 4s, лишённые О-антигена или О-ацетилирования О-антигена. Кроме того, мы не обнаружили заметного изменения титра свободного G7C при продолжительных инкубациях с мутантными штаммами 4sI и 4sR. Это позволило допустить необходимость О-ацетилирования О-антигена для первичного контакта фага G7C с клетками 4s и функционирование O22-антигена в качестве облигатного первичного рецептора фага G7C.

Так как очищенные первичные рецепторы фаговой инфекции обычно конкурентно ингибируют адсорбцию фага на клетках, мы поставили соответствующий эксперимент с ЛПС 4s. Оказалось, что полученные методом горячей фенольной экстракции ЛПС 4s дикого

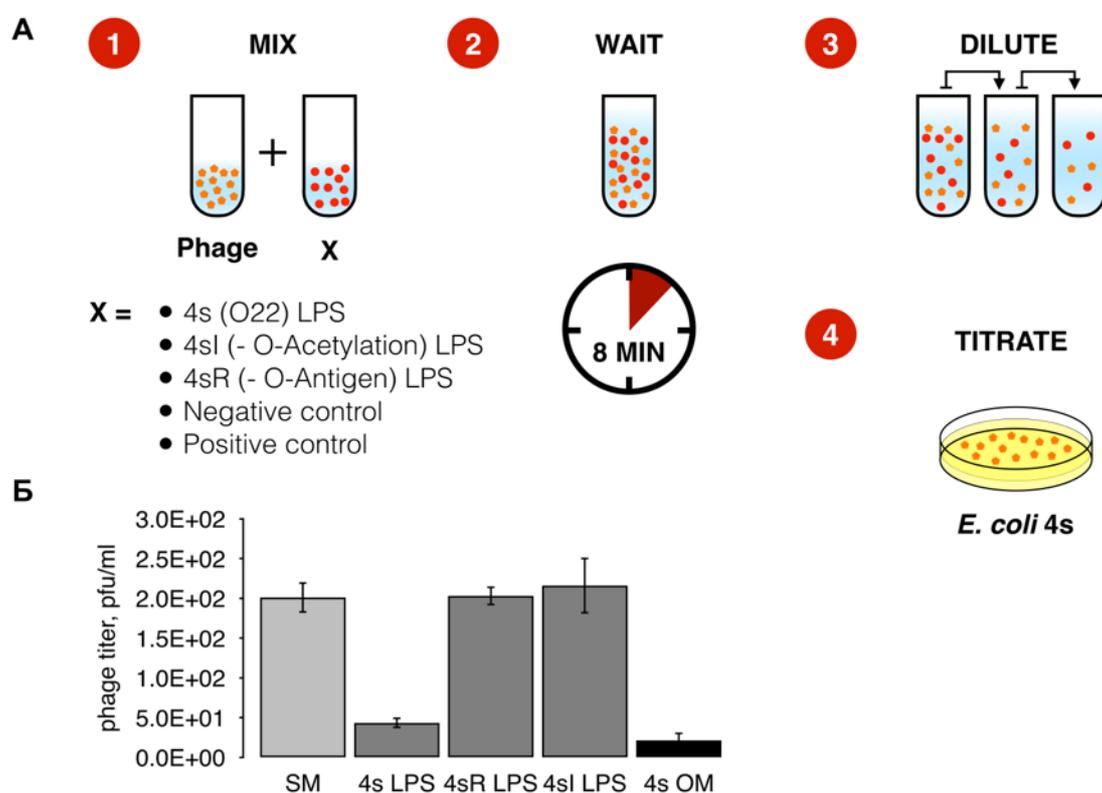


Рис. 6. Инактивация фага G7C очищенными липополисахаридами чувствительного штамма *E. coli* 4s. **A.** Схема эксперимента и **Б.** результат ($n=3$, $\alpha=0.05$). Очищенные препараты ЛПС штамма дикого типа вызывают необратимую инактивацию G7C. ЛПС изогенного штамма 4sR, неспособного синтезировать О-антиген, и штамма 4sI, лишённого способности О-ацетилировать О-антиген, фаг не инактивируют. Фракция внешних мембран 4s (OM), содержащая все фаговые рецепторы, была использована в качестве положительного контроля инактивации (Prokhorov, Riccio et al. 2017).

типа способны инактивировать фаг сами по себе (Рис. 6). Инактивации фага не происходит при инкубации вирусных частиц с очищенными ЛПС мутантных штаммов 4sR, лишённых О-антигена, и 4sI, лишённых О-ацетилирования О-антигена. На наш взгляд, это также свидетельствует в пользу участия О-антигена в фаговой инфекции в качестве первичного рецептора, а О-ацетилирование представляется необходимым для специфического взаимодействия рецептора с фаговым рецептор-узнающим белком. В норме контакт с первичным рецептором не должен вызывать инактивации фага, которая обычно происходит при контакте со вторичным рецептором и приводит к раскрытию хвоста и старту транслокации генома. G7C при контакте с ЛПС воспроизводит поведение другого подовируса – хорошо изученного фага P22. Этот фаг также инактивируется очищенными ЛПС *in vitro* (Andres et al., 2010). Интерпретировать эти результаты можно, допустив, что очищенные глубоко инвазивным методом, горячей фенольной экстракцией, ЛПС имеют конфигурацию, существенно отличающуюся от их естественного состояния *in vivo*. Однако, если очищенный до гомогенности первичный рецептор может, пусть и в условиях, далёких от физиологических, вызывать эффект схожий с эффектом от контакта со вторичным рецептором, мы, вероятно, сможем с помощью этой модельной системы глубже разобраться в событиях, происходящих на ранних этапах подовирусной инфекции.

Структура и активность grb3.1

Значительная часть исследованных подовирусов, таких как фаги P22 и Sf6, использует О-антиген в качестве рецептора первичного взаимодействия (Andres et al., 2010, Parent et al., 2014). Рецептор-узнающие хвостовые придатки этих фагов как правило несут ферментативные – гидролазные или лиазные – домены, разбирающие цепочки О-антигена на олигосахариды по мере приближения фага к внешней мембране. Для того, чтобы установить тип ферментативной активности grb3.1, мы проинкубировали очищенные препараты ЛПС штамма 4s с очищенным рекомбинантным grb3.1ht и проанализировали результат взаимодействия с помощью электрофореза в денатурирующем ПААГ. К нашему удивлению, вместо исчезновения характерного паттерна полос О-антигена в геле, что свидетельствовало бы в пользу деполимеризации О-антигена под действием фагового белка, мы увидели небольшой сдвиг в положении молекул ЛПС, обработанных grb3.1ht, по сравнению с ЛПС в исходном состоянии. Картина распределения ЛПС в геле говорила в пользу сохранения длин полисахаридных цепей (Рис. 7.А). Чтобы выяснить природу изменений, мы сравнили спектры ЯМР очищенного О-антигена 4s дикого типа, обработанного grb3.1ht, с О-антигенами штаммов 4s и 4sI (Рис. 7.Б). Полное совпадение спектров О-антигена, обработанного grb3.1ht и О-антигена 4sI, лишённого О-ацетилирования третьего остатка повторяющегося звена, позволяет однозначно определить активность grb3.1 как эстеразную в отношении О-ацетилирования О-антигена *E. coli* серотипа O22 (Рис. 7.В). Похожий тип активности был описан для подовируса *Salmonella anatum* s341, способного производить

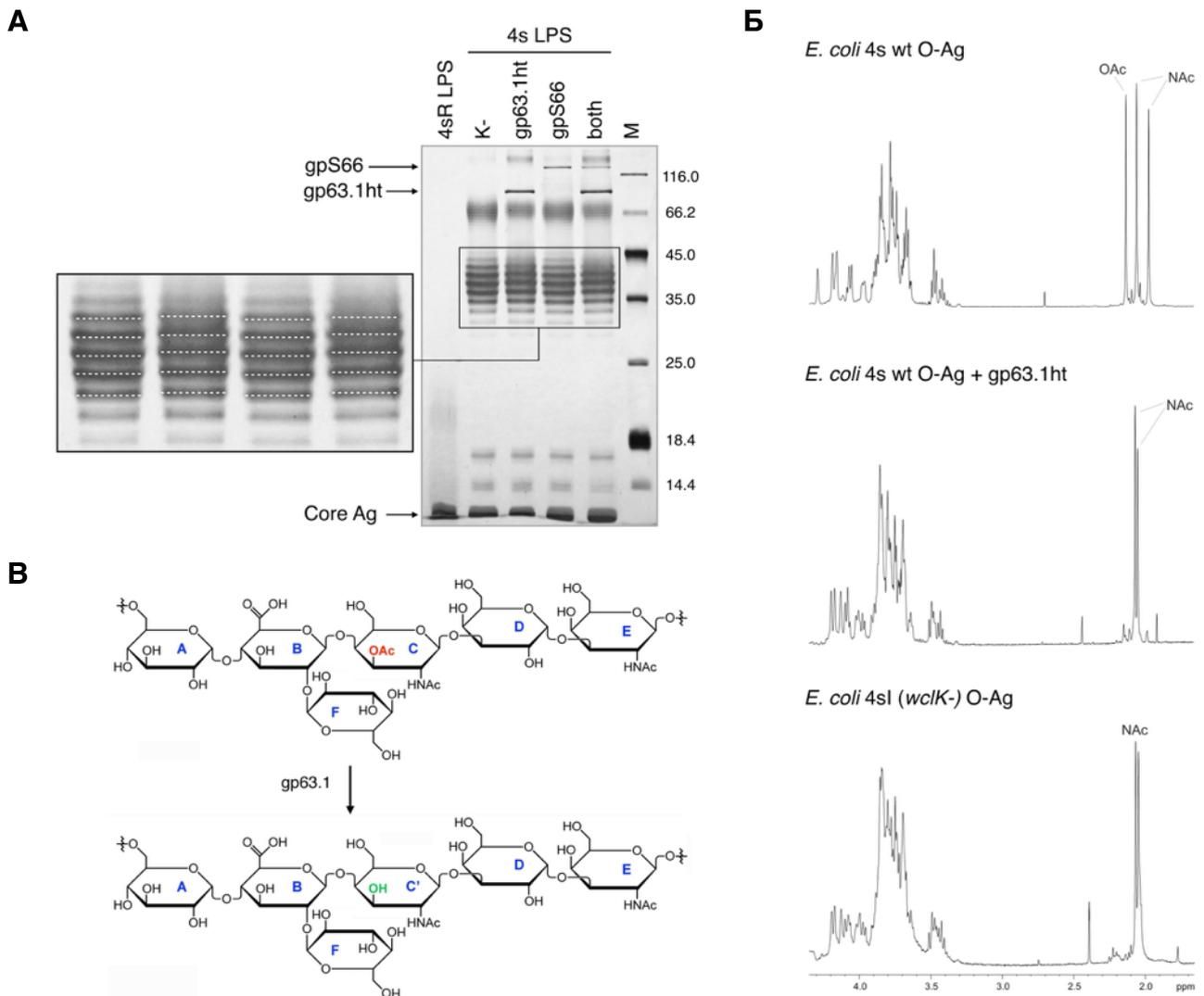


Рис. 7. Grp63.1 деацетирует ЛПС *E. coli* 4s. **A.** Обработка ЛПС 4s белком gp63.1ht вызывает изменение электрофоретической подвижности в денатурирующем ПААГ. **Б.** ЯМР-спектры О-антигена 4s дикого типа до и после обработки gp63.1ht и О-антигена 4sI. **В.** Схема реакции деацетилирования ЛПС 4s (Prokhorov, Riccio et al. 2017).

уксусную кислоту в ходе контакта с поверхностью чувствительных клеток (Iwashita & Kanegasaki, 1976). Однако, белок, отвечающий за эту активность, не был определен.

Мы очистили gp63.1ht до гомогенности, кристаллизовали и определили структуру белка методом рентгеноструктурного анализа (дифракция до 2.4 Å). Собранные данные позволили построить модель белка gp63.1 с 12 по 851 аминокислотный остаток из 851 (Рис. 8). Белок gp63.1 – большой тримерный белок, состоящий из шести доменов. Первые два домена демонстрируют высокую степень структурного сходства, что позволяет предположить общность их происхождения в ходе дупликации соответствующей геномной последовательности предкового организма. Вероятно, они отвечают за позиционирование хвостового шипа gp63.1 в вирионе G7C. Третий домен роднит gp63.1 G7C с белком EndoNF – эндосиалидазой подовирусом K1E, K1F и K1-5, отвечающей за распознавание, связывание и деградацию капсульного полисахарида *E. coli* K1. Гомологичный домен в этом белке предшествует сиалидазному домену, где также, вероятно, выполняет структурную функцию.

Четвёртый домен grb3.1 – SGNH-эстераза. Пятый и шестой домены демонстрируют гомологию с разными CBM (carbohydrate binding module) – неферментативными доменами различных белков метаболизма полисахаридов, отвечающими за специфическое взаимодействие ферментативного домена с субстратом. Такая организация grb3.1 напоминает организацию охарактеризованных к настоящему времени фаговых шипов, где ферментативный домен с гидролазной или лиазной активностью соседствует с доменом CBM. Существенным отличием grb3.1 от других фаговых хвостовых шипов является тип ферментативного домена – α/β SGNH-эстераза вместо β -спиральной деполимеразы – и два разных CBM домена, вместо одного, присутствующего в других хвостовых шипах. Каждый из трёх доменов grb3.1, предположительно отвечающих за связывание O-антигена, имеет выпетливания, отсутствующие в структурных гомологах, встречающихся в бактериях. Эти дополнительные структуры вместе образуют гребень на поверхности grb3.1, разделяющий предполагаемые центры связывания O-антигена. Вполне вероятно, что эта структура организует взаимодействие соседних многокомпонентных центров связывания субстрата с цепями O-антигена на клеточной поверхности (Рис. 8.Б).

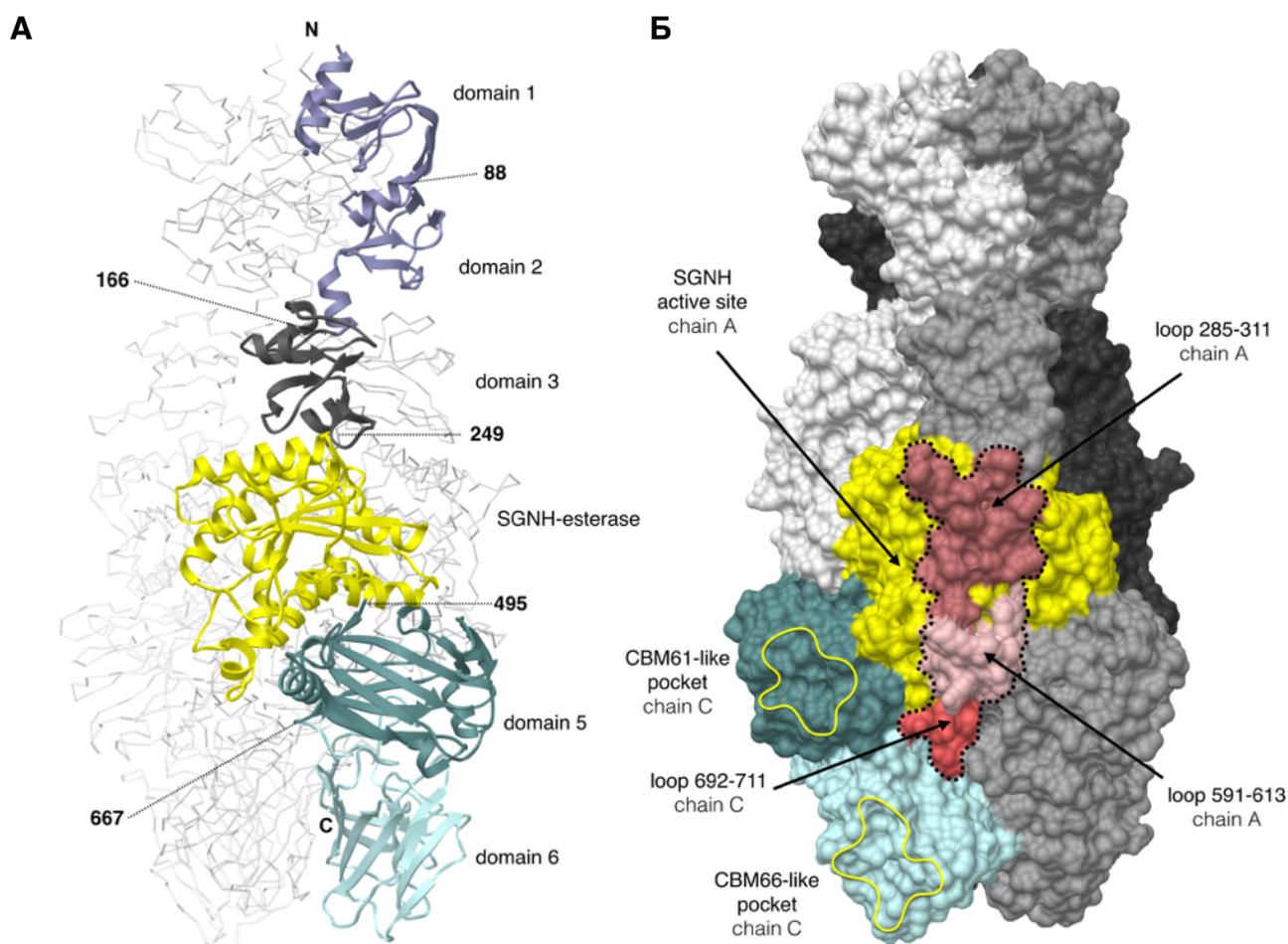


Рис. 8. А. Модель пространственной укладки полипептидных цепей тримера grb3.1, основанная на данных рентгеноструктурного анализа. Цветом выделены домены мономера. **Б.** Поверхность тримера grb3.1. Цветом выделены домены двух соседних цепей, предположительно образующие поливалентный центр связывания молекулы O-антигена (Prokhorov, Riccio et al. 2017).

Чтобы убедиться в необходимости эстеразной активности gp63.1 для связывания G7C с клеточной поверхностью, мы получили рекомбинантные белки с мутациями по предсказанным остаткам активного центра и вблизи активного центра: S307A, G245A, N382A, D470A, H473A. В прямых тестах на связывание клеточной поверхности 4s очищенные белки с мутациями S307A, G245A, N382A, H473A оказались неспособны связаться с клетками. Белок gp63.1ht с мутацией D470A, к нашему удивлению, сохранил способность к связыванию. Однако замена D470A существенно снизила стабильность белка. Такой gp63.1ht терял способность связывать клетки после единственного цикла замораживания-размораживания. Это нашло отражение в экспериментах по изучению стабильности полученных вариантов gp63.1ht с помощью калориметрического анализа плавления белка в присутствии красителя SYPRO Orange. Мутант D470A показал себя наименее устойчивым к тепловой денатурации из всех проанализированных вариантов gp63.1ht. В совокупности полученные данные позволяют нам утверждать, что эстеразная активность необходима для первичного контакта фага G7C с чувствительным штаммом 4s.

Изучение взаимодействия адгезинов gp63.1 и gp66 *in vitro*

Согласно геномным и протеомным данным вирионы N4 и G7C должны быть устроены похожим образом за исключением белков gp65 и gp66 фага N4 и белков gp63.1 и gp66 фага G7C. Белок gp66 фага G7C содержит на N-конце область гомологии с вероятным доменом прикрепления фибриллы gp66 фага N4. Значит, эта область может отвечать за прикрепление gp66 к вириону G7C. В то же время, мы не можем найти гомологии gp63.1 ни с одним белком N4. Мы допустили, что gp63.1 может быть закреплён в вирионе G7C посредством контакта с хвостовым шипом gp66. Чтобы проверить это предположение *in vitro*, мы проэкспрессировали в T7 системе gp63.1ht и немодифицированный gp66. При последовательном нанесении на металлоаффинную смолу осветленного лизата с gp63.1ht с олигогистидиновой меткой, обеспечивающей аффинное связывание со смолой, и избытка осветленного лизата с интактным gp66, неспособным к аффинному взаимодействию со смолой, в результате элюции имидазолом мы получили комплекс двух белков gp63.1ht-gp66 (Рис. 9.А). В контрольном эксперименте, в котором вместо лизата с gp63.1ht мы взяли лизат клеток с пустым вектором, элюат был свободен от gp66. Это позволяет нам утверждать, что gp66 удержало на хроматографической колонке именно специфическое взаимодействие с gp63.1ht, а не неспецифическое связывание со смолой. Гель-фильтрация комплекса позволила установить молекулярную массу комплекса около 700 КДа, что примерно соответствует размеру гетеродимера тримеров gp63.1ht и gp66.

Чтобы локализовать область gp66, отвечающую за прикрепление gp63.1, мы получили серию N- и C-концевых делеционных мутантов gp66. Предварительное биоинформатическое исследование гомологов gp66 в базах данных NCBI позволило нам верно определить границы доменов и получить 9 из 10 делеционных мутантов в растворимой тримерной форме в виде гибридов со SlyD (Рис. 9.Б). Только один C-концевой делеционный мутант,

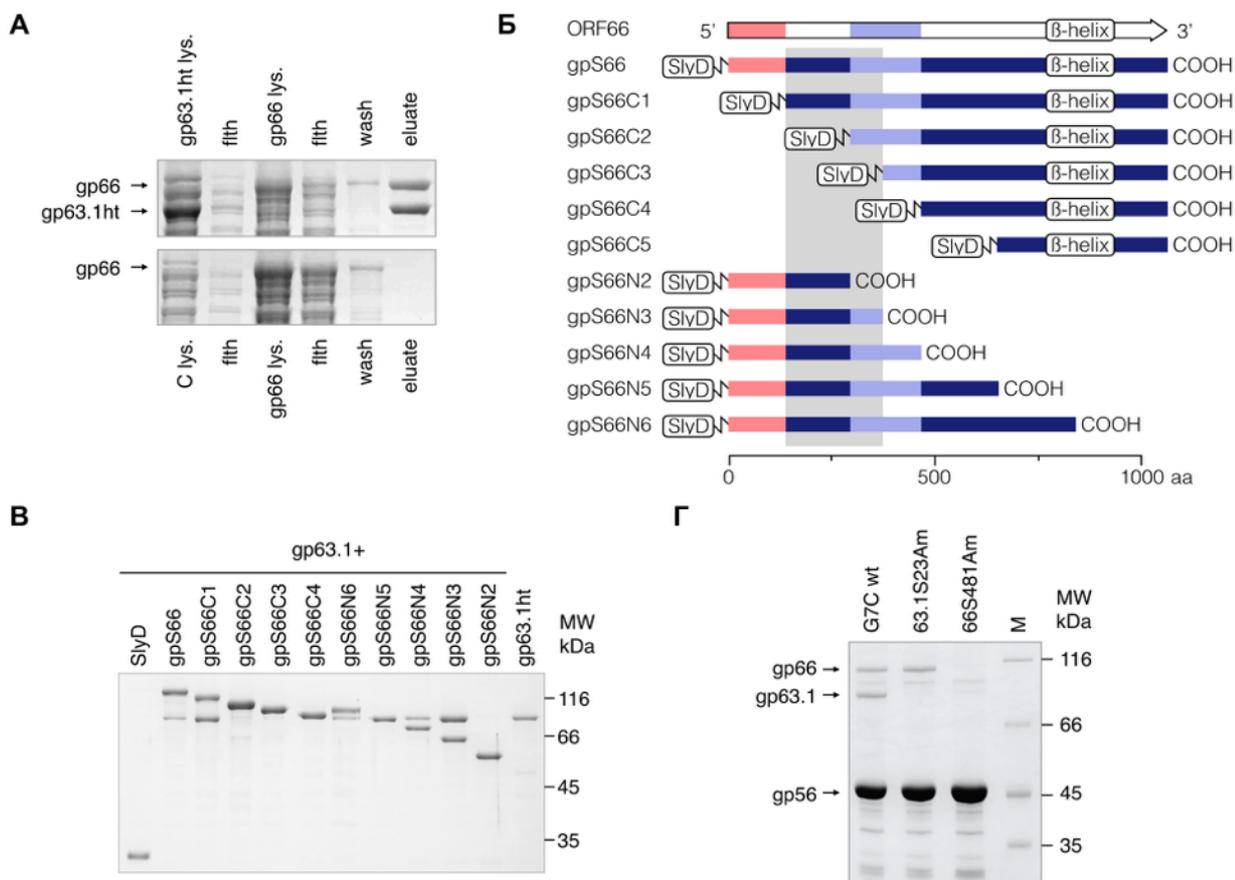


Рис. 9. А. Сборка комплекса gp63.1ht-gp66 на металлоаффинной смоле при последовательном нанесении лизатов с рекомбинантными белками gp63.1ht и gp66. Б. Схема получения С-концевых и N-концевых делеционных мутантов gp66. В. Тест на способность делеционных мутантов gp66 связывать gp63.1 *in vitro*. Г. Демонстрация взаимодействия gp63.1 и gp66 в фаговой частице. Каждый эксперимент был проведён трижды. Показаны репрезентативные результаты (Prokhorov, Riccio et al. 2017).

содержащий остатки 653-1063, оказался нерастворим, вероятно из-за проблем фолдинга полностью присутствующего в нём домена. Мы повторили эксперименты по связыванию белков на хроматографической колонке. В этот раз сначала наносили лизат, содержащий полноразмерный gpS66 или один из делеционных мутантов с олигогистидиновой меткой, следом – избыток лизата, содержащего интактный gp63.1. Анализ состава элюатов, полученных в ходе одиннадцати хроматографий с gpS66, делеционными мутантами и SlyD в качестве отрицательного контроля позволил нам заключить, что критически важными для связывания gp63.1 являются остатки 138-375 белка gp66 (Рис. 9.В).

Структура gp66

Мы очистили рекомбинантный gp66 до гомогенного состояния и предприняли попытку кристаллизации полноразмерного белка. Полноразмерный белок не закристаллизовался. Известно, что домены прикрепления фаговых шипов к вирусному хвосту нередко представляют непреодолимую преграду для кристаллизации белков в полноразмерной форме. Мы повторили процедуру с несколькими С-концевыми и N-концевыми мутантами без

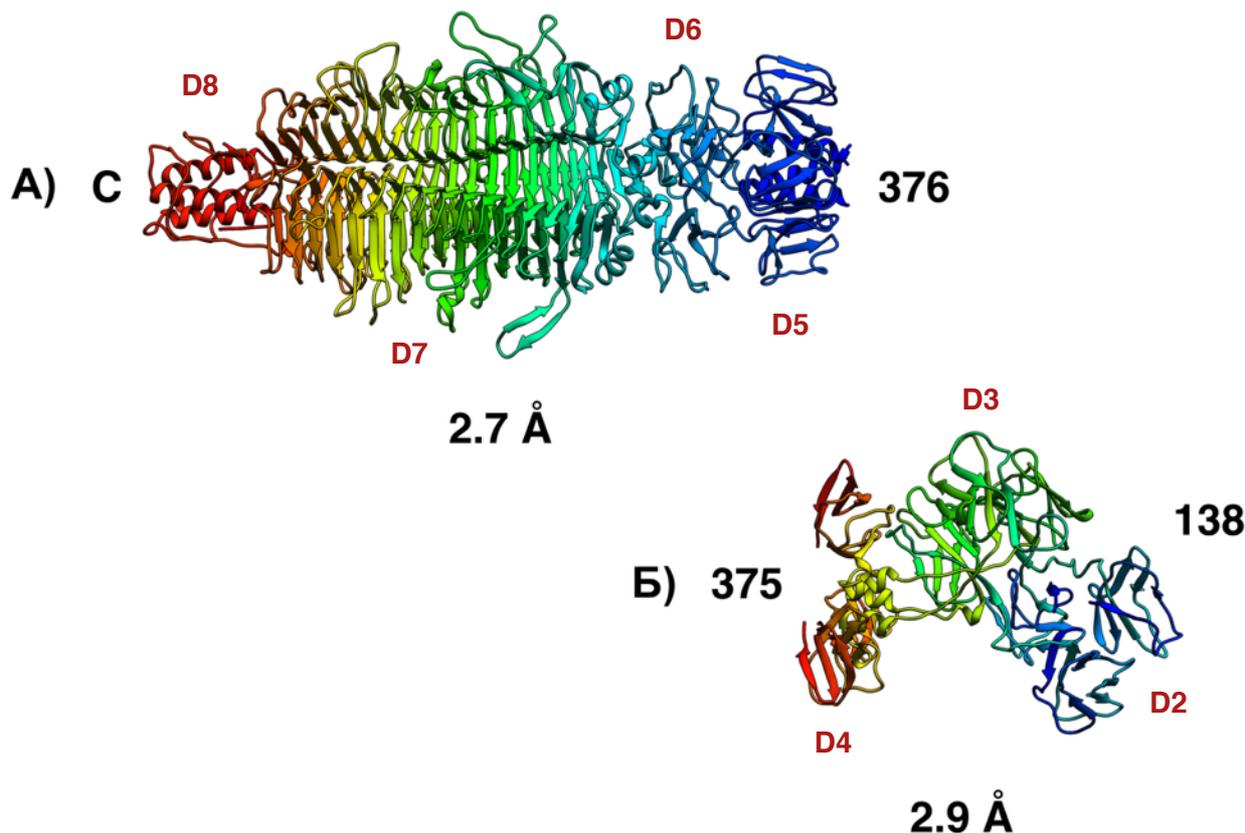


Рис. 10. Модели делеционных мутантов gp66, основанные на данных рентгеноструктурного анализа. **А.** С-концевой фрагмент тримера gp66 с 376 по 1063 аминокислотный остаток, содержащий домены 5-8. **Б.** Фрагмент тримера gp66 со 138 по 375 аминокислотный остаток, содержащий домены 2-4. Номера доменов указаны в подписях с литерой D.

домена прикрепления к вириону. Закристаллизовались два из них – содержащие остатки 294-1063 и 137-464. Собранные рентгеноструктурные данные позволили нам построить модели структуры gp66 от 376 до 1063 (до 2.7 Å) и от 138 до 375 остатка (до 2.9 Å).

Совокупность имеющихся структурных и биоинформатических данных позволила нам выявить следующее устройство gp66. Первый домен, гомологичный N-концевому домену gp66 фага N4, отвечает за прикрепление адсорбционного аппарата к вирусному хвосту. За ним следует короткий, по всей видимости, подвижный линкер. На остатки 138-294 приходятся два структурно похожих домена, второй и третий домены gp66, гомологичные доменам 2 и 3 белка gp10 фага T4. Третий домен образует контактную поверхность с четвертым доменом gp66 (остатки 295-375), гомологичным N-концевому домену gp63.1. Остатки 138-294 gp66 образуют область бифуркации адсорбционного аппарата G7C, позиционируя С-концевые функциональные домены хвостовых шипов gp63.1 и gp66 в вирионе. Пятый домен gp66 (376-465) гомологичен второму домену gp63.1. Шестой домен gp66 (466-533) присоединяет массивную тройную β-спираль. Мы полагаем, что за взаимодействие с клеточной поверхностью посредством gp66 при адсорбции фага отвечает именно этот седьмой β-спиральный домен (534-1011). На его поверхности есть типичные для хвостовых шипов выпетливания, вероятно, отвечающие за специфическое связывание О-

антигена. С-концевой α -спиральный “coiled coil”, восьмой домен gp66, вероятно, укрепляет структуру тримера.

Разработка протокола направленного мутагенеза фага G7C

Чтобы подтвердить релевантность полученных *in vitro* в экспериментах с рекомбинантными белками данных о взаимодействии компонентов адсорбционного аппарата фага G7C и данных биоинформатического анализа, мы решили получить условные нонсенс-мутанты фага по компонентам адсорбционного аппарата. Для этого, в свою очередь, мы решили разработать протокол получения условных нонсенс-мутантов вируса G7C с помощью гомологической рекомбинации с плазмидами, несущими фрагменты фагового генома с целевыми мутациями.

Прежде всего было необходимо получить штамм бактерий, в котором летальные амбер-мутации G7C могли бы быть эффективно супрессированы. Для этого мы изготовили низкокопийный вектор с репликоном p15A, экспрессирующий супрессорную тРНК SupD под контролем арабинозного промотора и трансформировали им *E. coli* 4s.

Многие фаги, например Лямбда, кодируют собственные рекомбиназы, существенно облегчающие ввод целевых мутаций в геном фага при направленном мутагенезе. Нам не удалось ввести в геном G7C целевую мутацию за счёт эндогенной рекомбиназной активности, вероятно, в виду её отсутствия. Поэтому мы разработали протокол с применением Red-рекомбиназы фага Лямбды. Вкратце, для ведения мутаций в геном G7C мы получили многокопийные донорные плазмиды, содержащие фрагменты генома G7C (~1 т.п.н) с целевыми мутациями. Клетки 4s трансформировали донорной плазмидой и плазмидой, экспрессирующей белки Red-системы, индуцировали экспрессию рекомбиназы, инфицировали клетки фагом G7C и после полного лизиса титровали фаг на супрессирующем штамме в присутствии л-арабинозы до получения необходимого количества негативных колоний. Колонии фага отбирали по летальности на штамме 4s дикого типа. Присутствие мутации подтверждали секвенированием. Таким образом мы получили клоны G7C, несущие мутации 63.1S23Am в гене 63.1, 66S481Am в гене 66 и ряд других целевых мутаций.

Организация адгезинов gp63.1 и gp66 в вирионе G7C

Чтобы изучить влияние летальных нонсенс-мутаций в генах 63.1 и 66 на структуру вириона мы инфицировали штамм 4s мутантами 63.1S23Am и 66S481Am при множественности инфекции 5, после лизиса собрали дефектные вирусные частицы, очистили преципитацией ПЭГ и в градиенте OptiPrep. Состав очищенных вирусных частиц проанализировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ (Рис. 9.Г). Нонсенс-мутация в гене 63.1 фенотипически выразилась в исчезновении из вириона белка gp63.1. Мутация в гене 66 привела к исчезновению как белка gp66, так и gp63.1. Что позволяет нам уверенно утверждать, что gp66 прикрепляется к вирусному хвосту и прикрепляет к нему gp63.1.

Была проведена криоэлектронная реконструкция G7C (Рис. 11.А). На реконструкции хвоста вируса (20 Å) мы без затруднений смогли найти структуры, образованные gr63.1 и gr66. Gr66 образует шип, направленный от хвоста в сторону и вверх, gr63.1 ответвляется от gr66 вниз вдоль хвоста вируса. Всего в вирионе присутствует по двенадцать шипов каждого типа. Димеры шипов gr63.1-gr66 занимают одно из двух возможных положений в вирионе в соответствии с симметрией шестого порядка, характерной для фагового хвоста.

Реконструкция дефектных вирусных частиц 63.1S23Am и 66S481Am подтвердила такое устройство адсорбционного аппарата G7C. Интересно, что на реконструированных вирионах мутантов по хвостовым шипам, 63.1S23Am и 66S481Am, отчетливо видны измерения формы дистальной поверхности хвоста по сравнению с фагом дикого типа. Чем глубже мутация затрагивает аппарат хвостовых шипов, тем более выражено изменение формы (Рис. 11.Б). Это согласуется с нашим предположением, что контакт хвостовых шипов G7C с первичным рецептором нужен не только для удержания фага у клеточной поверхности для поиска вторичного рецептора. Наблюдаемая картина раскрытия хвоста в вирионах с измененным аппаратом хвостовых шипов свидетельствует в пользу возникновения сигнала в виде конформационных изменений белков хвоста, прежде всего gr66, в ответ на контакт с первичным рецептором, переводящих фаг в состояние готовности связать вторичный рецептор. Но требуются дополнительные усилия, чтобы прояснить этот феномен.

Консервативные элементы аппарата хвостовых шипов N4-подобных вирусов

Анализ фаговых геномов и белковых структур в базах данных NCBI позволили нам выявить элементы изученного нами адсорбционного аппарата, встречающиеся в различных группах хвостатых вирусов. Мы начали с геномов N4-подобных вирусов. Оказалось, что в 10 из 25 публично доступных на момент проведения исследования геномов мы можем найти две сцепленные рамки, кодирующие хвостовые шипы. С-концевые последовательности кодируемых белков демонстрируют гомологии с исследованными хвостовыми шипами фагов из разных групп Caudovirales. Что говорит об интенсивном горизонтальном переносе соответствующих кодирующих последовательностей в ходе эволюции N4-подобных фагов. Однако несколько доменов хвостовых шипов являются общими для 10 отобранных фагов. В гомологах gr66 – это N-концевой домен прикрепления к вириону (остатки 1-138 gr66), двойной T4gr10-подобный домен (138-294), а также 4 и 5 домены, гомологичные доменам 1 и 2 gr63.1. В гомологах gr63.1 – домены 1 и 2.

В ходе реконструкции базальной пластинки фага T4 с помощью криоэлектронной микроскопии высокого разрешения была установлена структура белка gr10, домены 2 и 3 которого гомологичны доменам 2 и 3 gr66 G7C и соответствующих белков других N4-подобных фагов. Gr10 отвечает за прикрепление к периферической части базальной пластинки тримерной короткой фибриллы gr12 и тримера вспомогательного белка gr11. При этом, несмотря на заметную разницу в последовательностях и даже размерах доменов gr10 между собой, они имеют сходную структуру и образуют сходные контакты с

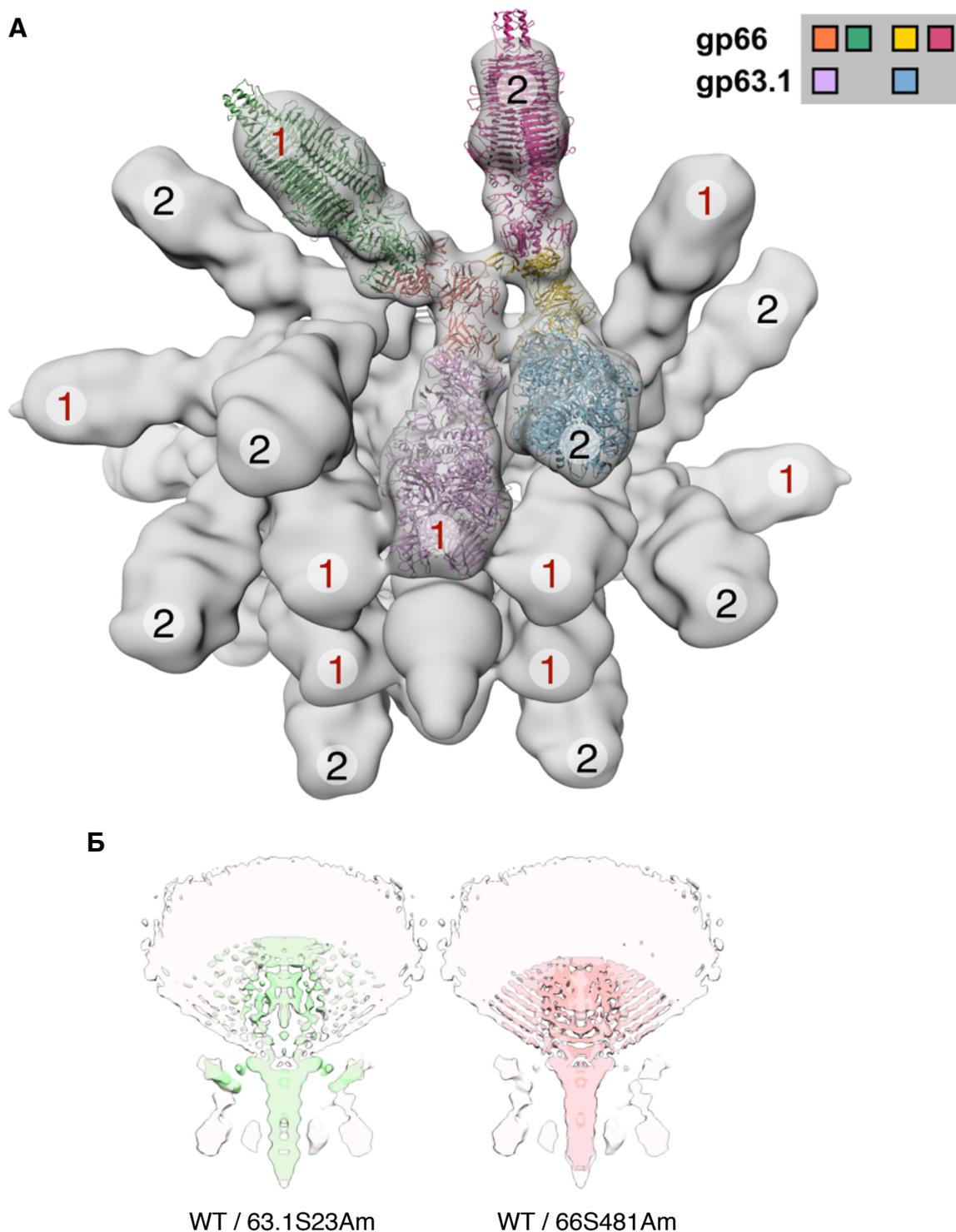


Рис. 11. А. Объёмная реконструкция хвоста G7C, основанная на данных криоэлектронной микроскопии. Ось симметрии шестого порядка хвоста фага повернута на 45° относительно плоскости рисунка. Димеры хвостовых шипов, занимающие в вирионе разные положения обозначены цифрами 1 и 2. **Б.** Сравнения объёмных реконструкций G7C дикого типа и дефектных фаговых частиц нонсенс-мутантов по gp63.1 и gp66 демонстрируют положение хвостовых шипов в вирионе и изменение конформации белков хвоста в частицах с нарушенной организацией хвостовых шипов. Электронные плотности мутантных вирионов выделены цветом.

соответствующими партнёрами (Рис. 12). Это позволяет нам полагать ввиду отсутствия структурных данных об укладке 12 N-концевых аминокислот gp63.1, что контакты между

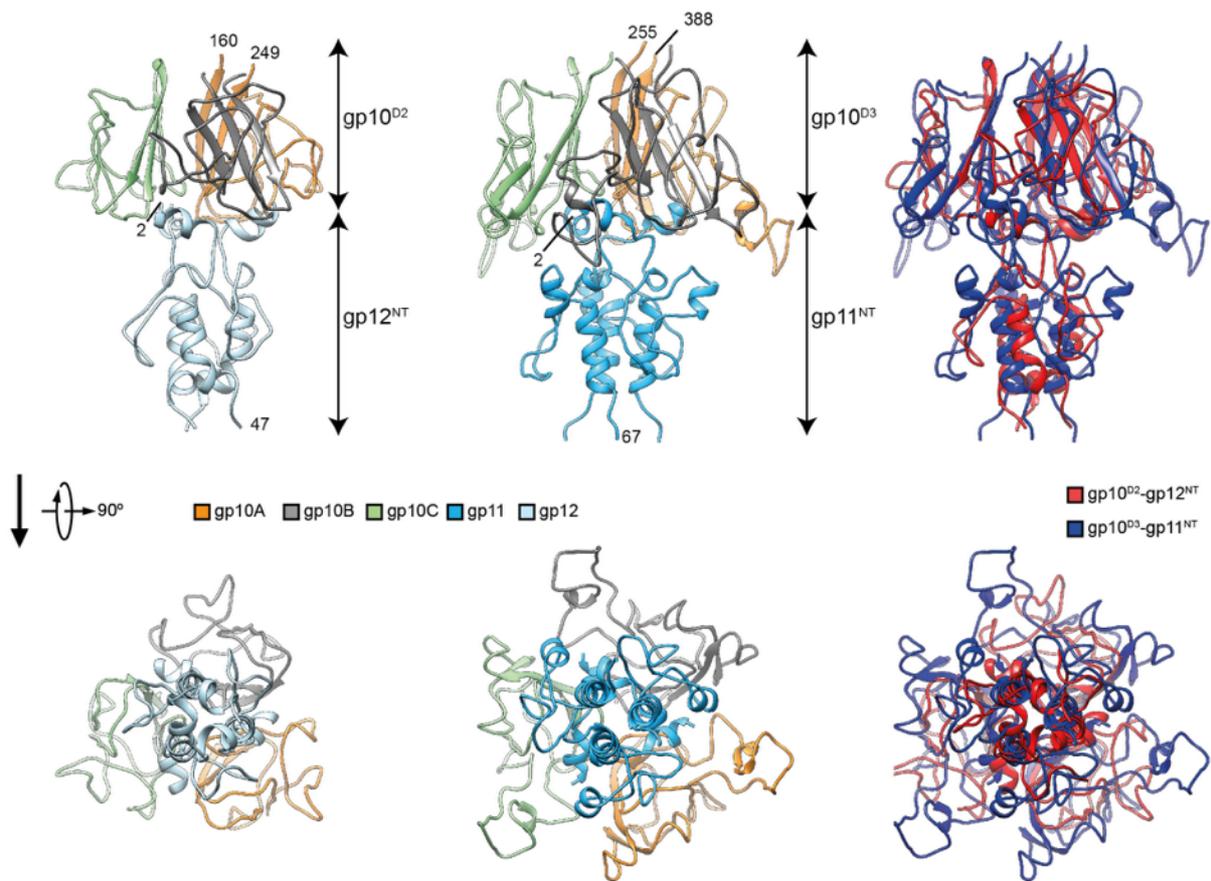


Рис. 12. Организация контактов домена 2 gp10 с короткими фибриллами gp12 и домена 3 с белком gp11. Каждая из трёх цепей gp10 в комплексе с беками-партнёрами показана своим цветом (Taylor, Prokhorov et al., 2016).

шипами gp63.1 и gp66 G7C и гомологами родственных фагов организованы так же.

Таким образом, консервативная разветвлённая структура, ответственная за позиционирование С-концевых активностей хвостовых шипов в значительном количестве выделенных к настоящему моменту N4-подобных подовирусов, состоит из двух gp10-подобных доменов и ассоциированных с ними гомологов N-концевого домена короткого спайка gp63.1. И мы знаем её устройство в молекулярных деталях.

Более широкий поиск гомологов позволил установить, что сходные консервативные структуры встречаются у представителей по крайней мере 13 определённых на настоящий момент родов из всех трёх семейств хвостатых фагов. Удивительно, но такая организации разветвлённых хвостовых шипов может быть адаптирована для функционирования в таких различных структурных и физиологических контекстах как короткие и длинные сократимые и несократимые фаговые хвосты.

Выводы

1. Фаг G7C в качестве первичного рецептора инфекции использует O-антиген *E. coli* 4s серотипа O22. Установлена структура повторяющегося звена этого O-антигена, повторяющая структуру антигена O22 с дополнительным гликозилированием второго остатка повторяющегося звена.
2. Структурные вирусные белки gr63.1 и gr66 участвуют в первичном распознавании клеточной поверхности чувствительного штамма *E. coli* 4s.
3. Белок gr63.1 образует хвостовой шип с эстеразной активностью. Установлена структура тримера gr63.1. Контакт с первичным рецептором и деацетилирование O-антигена необходимы для инфекции бактериальных клеток фагом G7C.
4. Белок gr66 образует хвостовой шип, участвующий во взаимодействии фага G7C с поверхностью клетки. Структура тримера белка gr66 установлена с помощью криоэлектронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа кристаллизованных фрагментов белка.
5. Белки gr63.1 и gr66 фага G7C образуют разветвленный аппарат хвостовых шипов, в котором gr66 опосредует присоединение gr63.1 к вириону. В составе этого аппарата можно выделить консервативные элементы, встречающиеся в различных группах порядка Caudovirales.

Публикации по теме диссертации в рецензируемых журналах

1. **Prokhorov N.S.**, Riccio C, Zdrovenko EL, Shneider MM, Browning C, Knirel YA, Leiman PG, Letarov AV (2017) Function of bacteriophage G7C esterase tailspike in host cell adsorption // *Mol Microbiol*, 105(3), 385-398.
2. Taylor N.M., **Prokhorov N.S.**, Guerrero-Ferreira R.C., Shneider M.M., Browning C., Goldie K.N., Stahlberg H., Leiman P.G. (2016) Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction // *Nature*, 533(7603), 346-52.
3. Golomidova A.K., Kulikov E.E., **Prokhorov N.S.**, Guerrero-Ferreira R.C., Ksenzenko V.N., Tarasyan K.K., Letarov A.V. (2016) Complete genome sequences of T5-related *Escherichia coli* bacteriophages DT57C and DT571/2 isolated from horse feces // *Arch. Virol.*, 160(12), 3133-7.
4. Knirel Y.A.*, **Prokhorov N.S.***, Shashkov A.S., Ovchinnikova O.G., Zdrovenko E.L., Liu B., Kostryukova E.S., Larin A.K., Golomidova A.K., Letarov A.V. (2015) Variations in O-antigen biosynthesis and O-acetylation associated with altered phage sensitivity in *Escherichia coli* 4s // *J. Bacteriol.*, 197(5), 905-12.
5. Zdrovenko E.L., Golomidova A.K., **Prokhorov N.S.**, Shashkov A.S., Wang L., Letarov A.V., Knirel Y.A. (2015) Structure of the O-polysaccharide of *Escherichia coli* O87 // *Carbohydr. Res.*, 14(412), 15-8.
6. Kulikov E., Kropinski A.M., Golomidova A., Lingohr E., Govorun V., Serebryakova M., **Prokhorov N.S.**, Letarova M., Manykin A., Strotskaya A., Letarov A. (2012) Isolation and characterization of a novel indigenous intestinal N4-related coliphage ν B_EcoP_G7C // *Virology*, 426(2), 93-9.