

СТРУКТУРНІ ТА ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЛІТИЧНОГО БАКТЕРІОФАГА Lw1, НОВОГО ПРЕДСТАВНИКА ПСЕВДО Т-ПАРНИХ ФАГІВ

На сьогоднішній день офіційна таксономія Т4-подібних бактеріофагів не відображає існуючу спорідненість між вірусними видами, що належать до цієї групи. Як і всі віруси взагалі, об'єднані за морфологічними ознаками, ці фаги часто виявляються філогенетично неспорідненими з їх прототипом, фагом Т4. Тому для удосконалення вже існуючої класифікації потрібні ізоляція та сиквенування нових членів вже існуючих підгруп Т4-подібних вірусів бактерій. Одною з основних специфічних властивостей підгрупи RB43-споріднених псевдо Т-парних фагів є специфічна будова їх геному [1]. Ця підгрупа не є чисельною і об'єднує фаги ентеробактерій RB16 [1] та RB43 [2], фаги KP15 та KP27 *Klebsiella pneumoniae* [3, інвентарний номер GenBank NC_014036 та HQ918180, відповідно], та фаг vB_CsaM_GAP161 *Cronobacter sakazakii* [4]. Всі ці бактеріофаги містять у своєму геномі від 1 до 6 передбачених генів HNH-ендонуклеаз, продукти яких містять специфічні домени AP2-родини, що широко притаманні рослинам [5]. Наявність рослино-специфічних ендонуклеаз в геномі фагів даної групи розглядалась як одина з можливих додаткових відмінностей [2]. Бактеріофаг Lw1 має RB43-подібну геномну організацію, однак не містить передбачених генів рослино-специфічних AP2-ендонуклеаз.

Матеріали і методи

У роботі використовували LB-середовище для бактерій. Розмноження фагів здійснювали на *Escherichia coli* B^E та BL21 (DE3).

Очистку, концентрування та розділення фаголізату проводили в кілька етапів із застосуванням іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі та градієнтного центрифугування.

Для одержання електронних мікрографій зразки контрастували ураніл ацетатом (2%).

Екстракцію ДНК здійснювали з використанням суміші ДСН (20%) та фенолу. Рестрикційний аналіз та аналіз віріонних білків проводили в агарозному та ДСН-ПАА гелях, відповідно, за стандартними протоколами. Сиквенування віри-

онної ДНК було здійснено з використанням технології 454-піросиквенсу. Геномний контіг був зібраний з використанням програмного забезпечення Newbler v2.5.3.

Анотація вірусного геному була здійснена з використанням стандартних біоінформатичних онлайн інструментів: Glimmer (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/glimmer_3.cgi) та GeneMarkS (www.exon.gatech.edu/genemarks.cgi) для ідентифікації BP3; tRNA-scan (www.lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE) для передбачення генів tRNA; BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) для пошуку гомологів та ідентифікації генів; CoreGenes v3.0 (www.binf.gmu.edu:8080/CoreGenes3.0/index.html) для порівняння групо-специфічних гомологів; DNAPlotter (www.sanger.ac.uk/resources/software/dnaplotter) для створення зображення фагової хромосоми; гомологи бактеріальних токсинів шукали в колекції генів DBETH (www.hpppi.iicb.res.in/btox/). Ідентифікаційний номер анотованого геному в базі GenBank — KC801932.

Результати та обговорення

Lw1 був ізольований як контамінуючий фаг з лізованих клітин *E. coli* BL21 (DE3). У дослідженнях використовували кілька чистих ліній фага Lw1 одержаних 5-разовим клонуванням з окремої пляшки та наступним розмноженням на штамі *E. coli* B^E. Електронно-мікроскопічний аналіз зразків показав, що Lw1 належить до родини Myoviridae, морфотипу A2 (рис. 1) [6].

Середній розмір фагової головки Lw1 складає 107×80 нм, довжина хвостового відростка 117 нм. Характерною відмінністю фага Lw1 є здатність до спонтанного утворення надвеликої кількості аберантних часток з нетипово подовженими капсидами (рис. 1) зі значно вищою частотою, ніж це властиво Т4.

Аналіз білкового складу капсиду показав наявність значної кількості структурних білків, ідентичних або дуже близьких за розмірами до прототипа підгрупи — фага RB43, та абсолютну відмінність білкового складу Lw1 від капсиду фага Т4 (рис. 2).

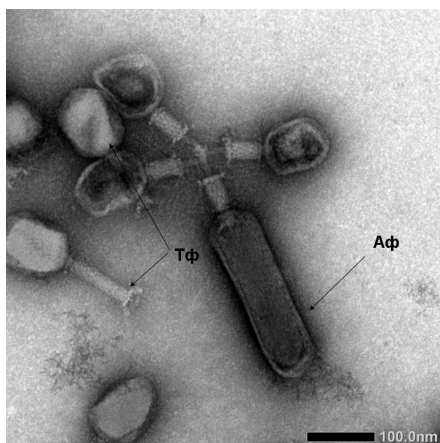


Рис. 1. Електронна мікроскопія бактеріофага Lw1. «Тф» — типова фагова частка, «Аф» — аберантна фагова частка з надподовженим капсидом

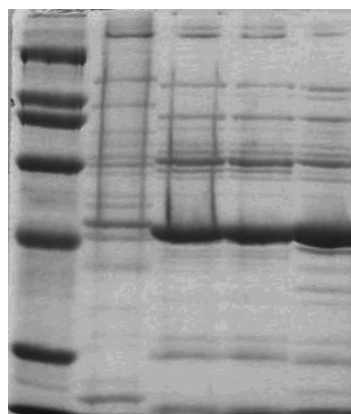


Рис. 2. ДСН-ПААГ фагових структурних білків. М — маркер, Т4-віріонні білки бактеріофага Т4, k1 та k2 — віріонні білки двох окремих чистих ліній фага Lw1, RB43-віріонні білки бактеріофага RB43

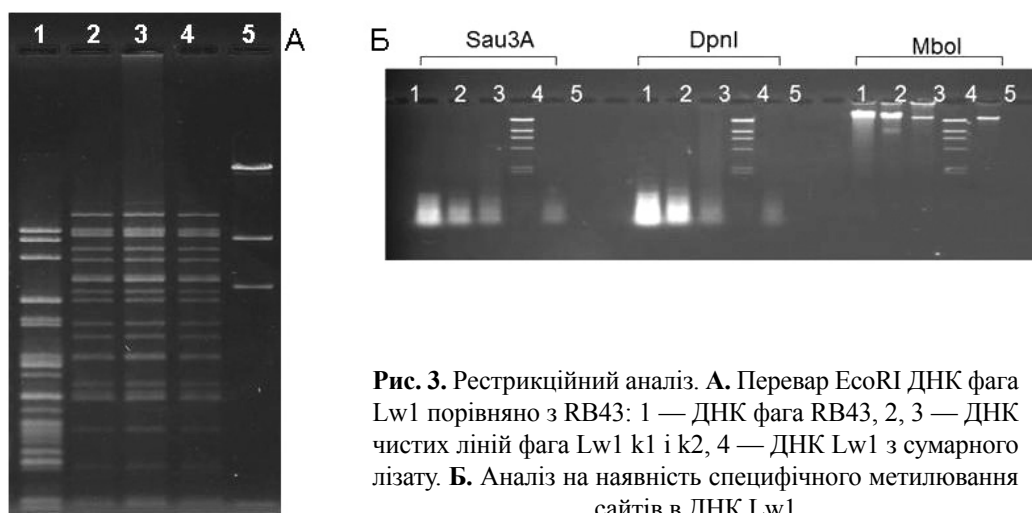


Рис. 3. Рестрикційний аналіз. **А.** Перевар *EcoRI* ДНК фага Lw1 порівняно з RB43: 1 — ДНК фага RB43, 2, 3 — ДНК чистих ліній фага Lw1 k1 і k2, 4 — ДНК Lw1 з сумарного лізату. **Б.** Аналіз на наявність специфічного метилювання сайтів в ДНК Lw1

Рестрикційний аналіз фагової ДНК показав наявність індивідуального патерна для фага Lw1, дозволив ідентифікувати всі ізольовані чисті лінії як варіанти фага Lw1 та показав різницю в розташуванні сайтів для вибраних ендонуклеаз рестрикції порівняно з фагом RB43 (рис. 3, А).

Використання набору ендонуклеаз рестрикції із специфічною чутливістю до метилювання сайтів ДНК показало наявність множинного повного та часткового метилювання сайтів *Dam* та *Dcm* (рис. 3, Б).

Геномний контіг фага Lw1 був зібраний програмою Newbler v2.5.3, що показало наявність кільцевої генетичної карти (рис. 4). Незвично, анотація геному Lw1 починається з гена *gPB* через наявність перекриття в один нуклеотид між генами *gPB* та *gPA*. Останній є традиційною точкою старту для всіх Т4-подібних фагів при

створенні генетичних карт або анотацій. Однак в разі, якщо стартовою точкою був би вибраний ген *gPA* існує перекриття заважило нам представити геном у вигляді лінійної молекули, що є систематичною ознакою цих вірусів.

Капсид фага Lw1 містить лінійну двониткову ДНК довжиною 176,227 п.н. з кільцевою пермутацією. GC-склад дорівнює 43,5% та геном містить 274 передбачених гена, з яких: 273 білок-кодуючі ВРЗ та 1 ген *Met-tRNA*. Сто п'ятдесят ВРЗ (55%) не мають відомих функцій. Щільність знаходження генів в геномі складає 1,56 ген/т.п.н та кодує щільність геному складає 95,5%. Середній розмір одного гена становить 618 нуклеотидів; середній розмір передбаченого вірусного білка — 205 амінокислотних залишків. Найбільш спорідненими до Lw1 фагами є — RB43, GAP161, RB16, KP27 та KP15. Вони розділяють з Lw1 91,2% (249/273),

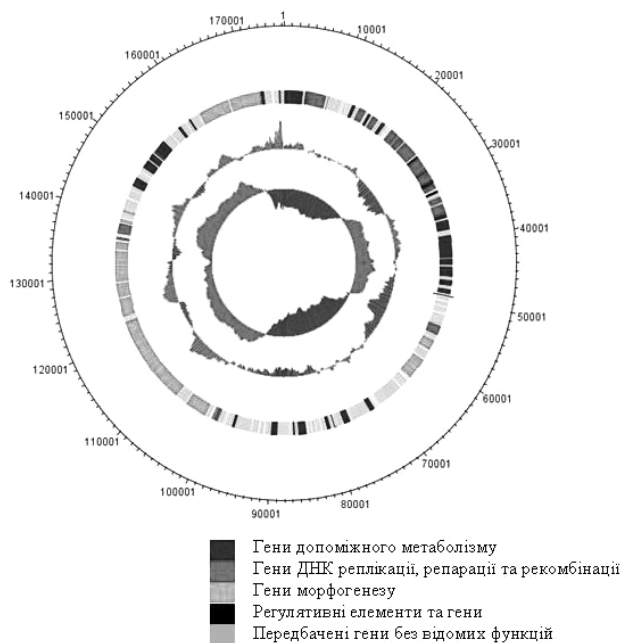


Рис. 4. Генетична карта бактеріофага Lw1

90,5% (247/273), 89,7% (245/273), 86,1% (235/273) та 83,2% (227/273) гомологів відповідно. Таким чином, фаг Lw1 належить до підгрупи RB43-по-

ЛІТЕРАТУРА

- Petrov V. M., Nolan J. M., Bertrand C., Levy D., Desplats C., Krisch H. M., Karam J. D. Plasticity of the gene functions for DNA replication in the T4-like phages // *J. Mol. Biol.* — 2006. — 361. — P. 46–68.
- Nolan J. M., Petrov V., Bertrand C., Krisch H. M., Karam J. D. Genetic diversity among five T4-like bacteriophages // *Virol. J.* — 2006. Doi:10.1186/1743-422X-3-30.
- Ksik-Szeloch A., Drulis-Kawa Z., Weber-DNębrowska B., Kassner J., Majkowska-Skropek G., Augustyniak D., Lusiak-Szelachowska M., Zaczek M., Gyrski A., Kropinski A. M. Characterizing the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* // *Virol. J.* — 2013. Doi: 10.1186/1743-422X-10-100.
- Abbasifar R., Kropinski A. M., Sabour P. M., Ackermann H. W., Lingohr E. J., Griffiths M. W. Complete genome sequence of *Cronobacter sakazakii* bacteriophage vB_CsaM_GAP161 // *J. Virol.* — 2012. Doi: 10.1128/JVI.02546-12.
- Magnani E., Sjulander K., Hake S. From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants // *Plant Cell.* — 2004. — 16. — P. 2265–2277.
- Ackermann H. W., Krisch H. M. A catalogue of T4-type bacteriophages. // *Arch. Virol.* — 1997. — 142. — P. 2329–2345.
- Monod C., Repoila F., Kutateladze M., Tutart F., Krisch H. M. The genome of the pseudo T-even bacteriophages, a diverse group that resembles T4 // *J. Mol. Biol.* — 1997. — 267. — P. 237–249.

KUSHKINA A.I.

Zabolotny Institute of microbiology and virology of the N.A.S. of Ukraine,
Ukraine, D03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 154, e-mail: a.kushkina@gmail.com

STRUCTURAL AND GENETICAL FEATURES OF LYTIC BACTERIOPHAGE LW1, A NEW MEMBER OF PSEUDO T-EVEN PHAGE GROUP

Aims. Bacteriophages are diverse group of bacterial parasites which have complex, but insufficient systematics. RB43-related bacteriophages have a specific genome type that clearly distinguishes them from other T4-like viruses. The main aim was to identify new Myoviridae phage Lw1 isolated as an *E. coli* BL21 (DE3) contaminant. **Methods.** Microbiological, biophysical, molecular biology and bioinformatic methods were used to reach the aims. **Results.** Here we present main characteristics and complete genome sequence of a new lytic phage Lw1 which shares RB43-like genome organization, but it does not contain putative AP2-domain endonuclease genes. **Conclusions.** By genomic organization phage Lw1 belongs to subgroup of RB43-like pseudo T-even phages. Although the Lw1 genome does contain one T4-like phage endonuclease of the MobE family, there is a lack of AP2-domain-containing endonucleases, and the relative paucity of mobile elements indicates either recent loss events or the presence of limited sites for viable insertion in the genome compared to some other RB43-like phages.

Keywords: T4-like phages, identification, morphology, structural proteins, DNA pattern, genome organization, phage-specific nucleases, gene drift.

дібних псевдо Т-парних бактеріофагів [7]. Зрештою, хоча геном Lw1 містить один ген Т4-специфічної ендонуклеази родини MobE, в ньому відсутні нуклеази, що містять AP2-домени. Така відносна нечисленність мобільних генетичних елементів свідчить або про їх нещодавню втрату, або про наявність обмеженої кількості сайтів для фіксації життєздатної інсерції в цей геном, порівняно з іншими RB43-подібними фагами.

Висновки

Таким чином, фаг Lw1 належить до підгрупи RB43-подібних псевдо Т-парних бактеріофагів [7]. Зрештою, хоча геном Lw1 містить один ген Т4-специфічної ендонуклеази родини MobE, в ньому відсутні нуклеази, що містять AP2-домени. Така відносна нечисленність мобільних генетичних елементів свідчить або про їх нещодавню втрату, або про наявність обмеженої кількості сайтів для фіксації життєздатної інсерції в цей геном, порівняно з іншими RB43-подібними фагами.

Автор висловлює подяку А.М. Остапчуку за допомогу у виконанні ДСН-ПААГ, та Ф.І. Товкачу за планування експериментів та дискусію.