

4. Бессарабов Б. Ф., Мельникова И. И, Сушкова Н. К., Садчиков С. Ю. Болезни птиц. Учебное пособие. – СПб.: Издательство «Лань», 2007.

5. Гавриш В. Г. Справочник ветеринарного врача, 4 изд. Ростов-на-Дону: «Феникс», 2003. – 576 с.

6. Спиридонов А. Н. Об эпизоотической ситуации по инфекционным болезням птиц на основе анализа данных ветеринарной отчетности /А. Н. Спиридонова, О. Н. Петрова, В. Н. Ирза, В. Н. Караулов и др. // Ветеринария сегодня. – 2015. – №4 (15). – С. 18.

7. Шевцов А. А. Серодиагностика РРСС: результаты участия в международных сравнительных испытаниях / А. А. Шевцов, Е. П. Ба-

боренко, И. В. Шевченко, А.В. Константинов // Ветеринария сегодня. – 2012. – №3 (3). – С. 24.

8. Ярбаев Н. Система противотуберкулезных мероприятий в скотоводстве и противоэпизоотическая эффективность проблемы развития сельскохозяйственной науки РТ / Н. Ярбаев, Д. М. Мирзоев, Н. Р. Хасанов // Душанбе. – 2001. – С. 105–107.

9. Betke P. Untersuchungen über die Frischblut-Aglutination ur Diagnose der Geflügel tuberculose. Arch. exp. Vetermed. – 2013. – 19. – 13. – 507.

10. Nasal J. Untersuchungen über die Brauchbarkeit der Frischblut schenllaglutination zur zur Feststellung der Tuberculose beim Huhn.Mh. Tierhelik. – 2012. – 15. – 6. –106–116.

DOI: 10.48612/sbornik-2023-1-42

УДК 574.24 579.262:578.4:636.5

### **ГИГАНТСКИЙ БЕЛОК Т4-РОДСТВЕННОГО БАКТЕРИОФАГА RALSTONIA PHAGE RSOM2USA СОДЕРЖИТ ДОМЕН КАЛЕКСЦИТИНА, СВЯЗЫВАЮЩИЙ Ca<sup>2+</sup>**

**Булавина Мария Константиновна**<sup>1,2</sup>, студент

**Осепчук Денис Васильевич**<sup>3</sup>, д-р с.- х. наук

**Зимин Андрей Антонович**<sup>1</sup>, канд. биол. наук

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН –

обособленное подразделение ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино Российская Федерация,

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Пушчинский государственный естественно-научный институт»,

г. Пушкино, Российская Федерация

<sup>3</sup>ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»,

г. Краснодар, Российская Федерация

Jumbo бактериофаги несут в себе геном от 200 тыс. пар нуклеотидов, что позволяет им вмещать гены различных структурных белков, эта особенность дает им преимущество в отношении стратегии заражения хозяев. Данная группа бактериофагов паразитирует на граммотрицательных бактериях. Среди этих фагов встречаются представители, родственные бактериофагу Т4. В числе белков этих бактериофагов можно обнаружить virion structural protein YP\_00915085, длиной 3333 аминокислот. Среди гомологов этого белка обнаруживается, также крупный белок, длиной 2540 аминокислоты у бактериофага Ralstonia phage RsoM2USA. Моделирование с помощью Swiss Model последовательности 210 аминоконцевых аминокислот крупного белка AVH85289.1 бактериофага Ralstonia phage RsoM2USA, обнаружило потенциальное структурное сходство с доменом связывания Ca<sup>2+</sup> калексцитина и рядом других функциональных доменов. Данное исследование позволяет более полно охарактеризовать структуру и функции этих гигантских белков, что важно для дальнейших исследований jumbo бактериофагов и использовании их как объектов фаговой терапии и также альтернативно в качестве трансдуцирующих частиц.

**Ключевые слова:** фаговая терапия; Jumbo бактериофаги; бактериофаг Т4; Ralstonia phage RsoM2USA

## THE GIANT PROTEIN OF THE T4-RELATED BACTERIOPHAGE RALSTONIA PHAGE RsoM2USA CONTAINS THE Ca<sup>2+</sup> BINDING DOMAIN OF CALEXCITIN

**Bulavina Maria Konstantinovna**<sup>1,2</sup>, student

**Osepchuk Denis Vasilyevich**<sup>3</sup>, Dr. Agr. Sci.

**Zimin Andrei Antonovich**<sup>1</sup>, PhD Biol. Sci.

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G. K. Scriabin RAS - a separate subdivision of the Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Pushchino State Institute of Natural Science, Pushchino, Russian Federation*

<sup>3</sup>*Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation*

Jumbo bacteriophages carry a genome of 200 kb or more, which allows them to accommodate genes for various structural proteins, a feature that gives them an advantage in host infection strategies. This group of bacteriophages parasitizes Gram-negative bacteria. Among these phages there are representatives related to bacteriophage T4. Among the proteins of these bacteriophages are detected virion structural protein YP\_00915085, 3333 amino acids long. Among the homologues of this protein, there is also a large protein, 2540 amino acids long, in the bacteriophage Ralstonia phage RsoM2USA. Swiss Model modeling of the 210 amino-terminal amino acid sequence of the large protein AVH85289.1 of the bacteriophage Ralstonia phage RsoM2USA revealed a potential structural similarity to the Ca<sup>2+</sup> binding domain of calexcitin. This study allows a more complete characterization of the structure and functions of these giant proteins, which is important for further studies of jumbo bacteriophages and their use as objects of phage therapy and, alternatively, as transducing particles.

**Key words:** phage therapy, Jumbo bacteriophages, T4 bacteriophage, Ralstonia phage RsoM2USA

Фаговая терапия колибактериозов сельскохозяйственных животных [1, 2] требует использования современных подходов и современных открытий в области бактериофагии. Среди бактериофагов недавно обнаружили довольно крупные по размерам вириона и величине генома вирусы, объединённые в группу jumbo [10]. Такие бактериальные вирусы несут в себе геном от 200 до 500 тыс. пар нуклеотидов и имеют сократительные хвосты. Их среды обитания достаточно различны: ткани растений, донные отложения, почва и водоёмы. Наиболее благоприятной средой для jumbo бактериофагов является водная среда, что облегчает обнаружение и заражение новых хозяев. Такие бактериофаги могут вмещать себе более крупные геномы по сравнению с другими бактериальными вирусами, что позволяет включать гены различных структурных белков и делает возможным jumbo бактериофагам иметь морфологически разнообразные вирионы сложной структуры. Предположительно, эта особенность даёт им преимущество в отношении стратегии заражения хозяев. Некоторые представители данной группы способны создавать внутри заражённой бактерии «псевдоядро» с помощью аналога тубулина, разделяющее белки и ДНК

при инфицировании клетки, что обеспечивает защиту от систем рестрикции-модификации бактерии [1]. Таким образом, jumbo бактериофаги могут стать перспективным объектом фаговой терапии, включающим в себе доставку модифицированных ДНК или РНК к клеткам пациентов или перенос оперонов при редактировании генома бактерий.

Данная группа бактериофагов в основном паразитирует на грамотрицательных бактериях, среди них можно отметить рода бактерий такие как *Synechococcus*, *Pseudomonas*, *Caulobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas* и *Escherichia* [10]. Среди фагов последнего упомянутого рода встречаются представители, родственные хорошо изученному бактериофагу T4, инфицирующему *Escherichia coli*. Для T4-родственных, псевдо-T – четных бактериофагов обнаружена способность к трансдукции [6, 7], что можно ожидать и для данных гигантских фагов. Например, *Escherichia phage PVECO4* рода *Asterivirus*, чей линейный двухцепочечный геном составляет 348113 пар нуклеотидов, также данный фаг имеет изометрическую головку и сократительный хвост. В числе белков данного бактериофага можно обнаружить virion structural

protein YP\_00915085, имеющий размер 3333 аминокислот, родственный белкам из таких родов фагов как Eneladusvirus, Alcyoneusvirus и Mimasvirus. Имеет большое сходство с белками UYL05505.1 hypothetical protein DIDNDMLP\_00520 Klebsiella phage KP13-7, YP\_007007225.1 virion structural protein Klebsiella phage vB KleM RaK2, QOE32481.1 hypothetical protein CPT Muenster 309 Klebsiella phage Muenster и YP\_009153154.1 virion structural protein Klebsiella phage K64-1. YP\_00915085 является структурным белком вириона и кодируется геном ACQ29\_gp538, локализирующийся по координатам 320750-330751 по цепочке геномной последовательности.

Бактерия *Escherichia coli* O157:H7, на которой паразитирует данный бактериофаг – зоонозный патоген, вызывающий снижение продуктивности домашнего скота. Домашние жвачные животные (в большинстве случаев крупный рогатый скот, реже носителями выступают козы и овцы) являются основным резервуаром патогена. Часто жизнедеятельность кишечной палочки в организмах животных остается бессимптомной, но бактерии выделяются в окружающую среду с фекалиями, тем самым становясь источником заражения. У новорожденных телят этот микроорганизм вызывает водянистую диарею, нейтрофильную инфильтрацию слизистой оболочки кишечника, некроз и отторжение эпителиальных клеток.

Jumbo бактериофаги остаются перспективным объектом для дальнейших исследо-

ваний, так как структура их геномов все еще недостаточно изучена. Это побудило нас более полно рассмотреть структуру и функции белка YP\_00915085 – структурного белка вириона *Escherichia phage* PBE04, кодируемого геном ACQ29\_gp538.

**Методика исследований.** С использованием алгоритма BLASTp в базе данных nr (non-redundant protein sequences) нами было найдено 46 аминокислотных последовательностей гомологичных YP\_00915085. Среди которых можно отметить AVH85289.1 – hypothetical protein *Ralstonia phage* RsoM2USA, длиной 2540 пар аминокислот. Найденный белок мы анализировали с помощью SWISS-MODEL – биоинформационного сервера для моделирования гомологии 3D-белковых структур с высокой точностью. Поиск гомологов был проведен в библиотеке SWISS-MODEL, модели были построены с использованием ProMod3, при проверке точности модели применялась функция оценки QMEAN. Аннотация четвертичной структуры белка служит для моделирования целевой последовательности в олигомерной форме с помощью метода на основе контролируемого алгоритма машинного обучения для оценки точности четвертичной структуры QSQE, что дополняет оценку третичной структуры GMQE [6, 7]. Используя данный подход, мы выявили несколько доменов различных белков, таких как калексцитин, диолкиназа ювенильного гормона, фосфатидилглицерофосфатаза и hypothetical protein APC35681 (рис 1, 2) и другие.

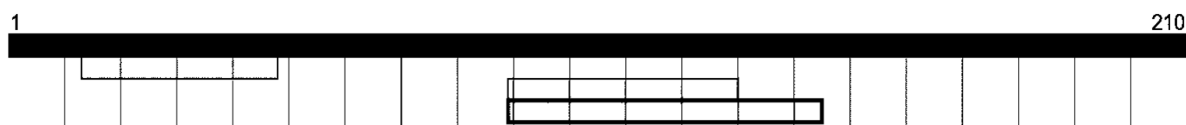


Рисунок 1 – Графическое изображение расположения элемент находок Swiss Model последовательности 210 аминоконцевых аминокислот крупного белка AVH85289.1 бактериофага *Ralstonia phage* RsoM2USA, черной линией обозначен сам белок, белыми прямоугольниками – находки: верхний прямоугольник – transcriptional regulator AraR с координатами 14–48, нижний – калексцитин 90–145 по последовательности белка фага и Hypothetical protein APC35681 с 90–130 между ними

**Model-Template Alignment**

```

Model_01 MTNNSLDYNNNSFLDLSEKLPFRFTKTMTSLMNNLFNRFLTKESSSHVIGWVGDKIGSSYYIEHADNDRTLNALQ 75
2ccm.2.A -----
Model_01 PVFYLEYEGNTQVVT(LFAEILRKLQ)MIGVD(T)DYARWGKTAS(V)NFPVPPID(L)DKFCNFTKYRWY(G)HLVTQSG(V)MPWN 150
2ccm.2.A -----D(K)HEYSTVYMSY(G)IP(K)SDCCDAAFDTL(S)DGG(K)TMV(D)R(E)IFARLWTEYFV(S)NDRGA(K)G----- 182
Model_01 PNKKPEYYVMKPGFQVNDWTATNYVWHEDDVSTLGYSLNSTIQATRPPIEYAADLELNAR 210
2ccm.2.A -----

```

Рисунок 2 – Парный элаймент находки 1 Swiss Model, на последовательности наложено схематическое изображение вторичной структуры, вычисленное для последовательности 210 аминоконцевых аминокислот крупного белка AVH85289.1 бактериофага Ralstonia phage RsoM2USA и определенное методом рентгеноструктурного анализа для калесцитина

**Результаты исследований и их обсуждение.** В кальций-связывающем домене, имеющим координаты: 90–145 по последовательности белка фага, преобладают  $\alpha$ -спирали, образующие "EF-руки", общая структура весьма компактна и имеет ярко выраженное гидрофобное ядро между N- и C- концевыми доменами. Калексцитин встречается у нескольких представителей моллюсков и регулирует калиевые каналы, участвуя в возбуждении и передаче сигнала нейронами [4].

Диолкиназа ювенильного гормона, имеющая координаты: 90–130 состоит из восьми  $\alpha$ -спиральных сегментов, которые связаны петлями, и образуют четыре мотива спираль-петля-спираль. В структуре белка присутствует ион кальция, связанный с первым мотивом. Этот гормон участвует в метаболизме ювенального гормона у насекомых [9]. Фосфатидилглицерофосфатаза (PGPase) имеющая координаты: 90–147, образует спиральную молекулу, которая является гомотетрамером, где каждый протомер имеет активный центр с ионами  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , что

находится вблизи поверхности молекулы. Этот фермент обнаруживается в мембранах многих организмов, в том числе *Listeria monocytogenes*, где участвует в метаболизме липидов, катализирует образование фосфатидилглицерола из фосфатидилглицерофосфата [5].

Четвертая находка – hypothetical protein APC35681, имеющая координаты: 90–130, принадлежащий *Bacillus Stearothermophilus*, размер которого составляет 168 аминокислот, на данный момент функции данного белка не выявлены (таблица 1).

Таким образом, среди гомологов белка YP\_00915085 можно обнаружить домены различных ферментов и белков, отвечающие за различные функции, однако предположительно не участвующих в построении данного белка. В данной работе нам удалось более полно охарактеризовать структуру N-конца и предполагаемые функции AVH85289.1, что может быть полезным для дальнейших работ по изучению jumbo бактериофагов.

Таблица 1 – Структура и функции AVH85289.1 – hypothetical protein Ralstonia phage RsoM2USA

Шаблон	Найдено с помощью	Метод	Разрешение	Сходство последовательностей	Область покрытия	Описание
2ccm.2.A	HHblits	X-ray	1.80Å	0.24	0.27	CALEXCITIN
2ccm.1.A	HHblits	X-ray	1.80Å	0.24	0.27	CALEXCITIN
6kth.1.A	HHblits	X-ray	1.22Å	0.26	0.27	Juvenile hormone diol kinase
4ndb.2.A	HHblits	X-ray	2.00Å	0.24	0.25	Calexcitin
4ndb.1.A	HHblits	X-ray	2.00Å	0.24	0.25	Calexcitin
5f6t.1.A	HHblits	X-ray	2.20Å	0.24	0.27	Calexcitin
4ndd.1.A	HHblits	X-ray	2.90Å	0.23	0.26	Calexcitin
4ndd.2.A	HHblits	X-ray	2.90Å	0.23	0.26	Calexcitin
1y9i.1.A	HHblits	X-ray	1.80Å	0.28	0.20	low temperature requirement C protein
1rfz.1.D	HHblits	X-ray	2.80Å	0.27	0.20	Hypothetical protein APC35681
1rfz.1.B	HHblits	X-ray	2.80Å	0.27	0.20	Hypothetical protein APC35681

**Вывод.** Исследовав белок AVH85289.1 с применением алгоритмов Swiss Model, мы пришли к выводу, что он имеет структурные сходства с белками с различными функциями, такими как калексцитин, регулирующий калиевые каналы, диолкиназа, участвующая в

метаболизме ювенильного гормона, фосфатидилглицерофосфатаза, контролирующая метаболизм липидов и hypothetical protein APC35681, встречающиеся у разнообразных организмов, в том числе моллюсков, насекомых и бактерий. Данное исследование позволило нам более полно охарактеризовать структуру и функции AVH85289.1 – hypothetical protein Ralstonia phage RsoM2USA, что важно для дальнейших исследований jumbo бактериофагов и использовании их как объекта фаговой терапии.

**Благодарности.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00669, <https://rscf.ru/project/22-25-00669/>

### Список литературы

1. Зимин А. А. Использование бактериофагов для борьбы с колибактериозом и кампилобактериозом в птицеводстве / А. А. Зимин, Ф. В. Кочетков, С. И. Кононенко, Д. В. Осепчук, Н. Э. Скобликов // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. – Краснодар: КубГАУ. – 2016. – №09(123). – С. 421–432.
2. Никулин Н. А. Конструирование терапевтических фаговых коктейлей на основе бактериофагов: преимущества и недостатки / Н. А. Никулин, С. И. Кононенко, А. Г. Кощаев, А. А. Зимин // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ). – Краснодар: КубГАУ. – 2017. – №09(133).
3. Bertoni M., Kiefer F., Biasini M., Bordoli L., Schwede T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci Rep.* 2017;7(1):10480. Published 2017 Sep 5. doi:10.1038/s41598-017-09654-8.
4. Erskine P.T., Beaven G.D., Hagan R., et al. Structure of the neuronal protein calyculin suggests a mode of interaction in signalling pathways of learning and memory. *J Mol Biol.* 2006;357(5):1536-1547. doi:10.1016/j.jmb.2006.01.083.
5. Kumaran D., Bonanno J.B., Burley S.K., Swaminathan S. Crystal structure of phosphatidyglycerophosphatase (PGPase), a putative membrane-bound lipid phosphatase, reveals a novel binuclear metal binding site and two "proton wires". *Proteins.* 2006;64(4):851-862. doi:10.1002/prot.21039.
6. Tanyashin V. I., Zimin A. A., Shlyapnikov M. G., Boronin A. M. Transduction of Plasmid Antibiotic Resistance Determinants with Pseudo-T-Even Bacteriophages. *Russian Journal of Genetics*, Vol. 39, No. 7, 2003, pp. 761–772. DOI: 10.1023/A:1024748903232
7. Tanyashin V. I., Zimin A. A., Boronin A. M. The Cotransduction of pET System Plasmids by Mutants of T4 and RB43 Bacteriophages. *Microbiology.* – Vol. 72. – No. 6. – 2003. – pp. 694–700. DOI:10.1023/B:MIC1.0000008372.06477.43.
8. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W296-W303. doi:10.1093/nar/gky427.
9. Xu H., Zhang Y., Zhang L., Wang Z., Guo P., Zhao P. Structural characterization and functional analysis of juvenile hormone diol kinase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Int J Biol Macromol.* 2021;167:570-577. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.138
10. Yuan Y., Gao M. Jumbo Bacteriophages: An Overview. *Front Microbiol.* 2017;8:403. Published 2017. – Mar 14. doi:10.3389/fmicb.2017.00403.