

DOI: 10.48612/sbornik-2023-1-47
УДК 574.24 579.262:578.4:636.5

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ЭНДОЛИЗИНОВ ПСЕВДО-Т-ЧЕТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ RB43 И RB49 В ПРИРОДЕ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА БАЗ ДАННЫХ

Зимин Андрей Антонович¹, канд. биол. наук

Никулина Александра Николаевна¹, аспирант

Никулин Никита Алексеевич¹, аспирант

Кощаев Андрей Георгиевич², д-р биол. наук, профессор, академик РАН

Осепчук Денис Васильевич^{2,3}, д-р с-х. наук

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН»,

г. Пушкино, Российская Федерация

²ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»,

г. Краснодар, Российская Федерация

³ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина»,

г. Краснодар, Российская Федерация

Распространение эндолизинов псевдо – Т – четных бактериофагов RB43 и RB49 в природе исследовано с помощью анализа баз данных генетических последовательностей. Всего по сходству с аминокислотной последовательностью эндолизина бактериофага RB43 программой BLASTp в базе данных GenBank было найден 42 белка, в том числе и эндолизин бактериофага RB49. Сравнительный анализ 42 последовательностей методами UPGMA и Minimum Evolution показал, что все последовательности из различных бактериофагов кластеризуются в две хорошо различающиеся группы, группа эндолизина RB43 и группа эндолизина RB49. Следовательно, эти белки могут использоваться как генетические маркеры для селекции трансдуцирующих бактериофагов при получении препаратов, состоящих из нетрансдуцирующих фагов, для фаговой терапии колибактериозов в ветеринарии и зоотехнии.

Ключевые слова: фаговая терапия; фаговая трансдукция; псевдо – Т – четные бактериофаги RB43 и RB49; эндолизины

STUDY OF DISTRIBUTION OF ENDOLYSINS OF PSEUDO-T-EVEN BACTERIOPHAGES RB43 AND RB49 IN NATURE USING DATABASE ANALYSIS

Zimin Andrei Antonovich¹, PhD Biol. Sci.

Karmanova Aleksandra Nikolaevna¹, PhD student

Nikulin Nikita Alekseevich¹, PhD student

Koshchaev Andrei Georgievich³, Dr. Biol. Sci., academician RAS

Osepchuk Denis Vasilyevich^{2,3}, Dr. Agr. Sci.

¹Institute 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

²Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation

³Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation

Distribution of endolysins of pseudo – Т – even bacteriophages RB43 and RB49 in nature was investigated using the analysis of databases of genetic sequences. In total, 42 proteins were found by the BLASTp program in the GenBank database based on the similarity to the amino acid sequence of bacteriophage RB43 endolysin, including RB49 bacteriophage endolysin. Comparative analysis of 75 sequences using the UPGMA and Minimum Evolution methods showed that all sequences from different bacteriophages clustered into two well-differentiated groups, the RB43 endolysin group and the RB49 endolysin group. Therefore, these proteins can be used as genetic markers for the selection of

transducing bacteriophages in obtaining preparations consisting of non-transducing phages for phage therapy of colibacillosis in veterinary medicine and zootechnics.

Key words: phage therapy; phage transduction; pseudo-T-even bacteriophages RB43 and RB49; endolysins

Патогенные штаммы *Escherichia coli* являются возбудителями ряда заболеваний поросят и птицы. Этот сельскохозяйственный патоген, вызывающий широкий спектр значимых для животноводства инфекций, доступен для лечения с помощью фаговой терапии [1, 4]. Вирулентные бактериофаги, родственные T4 в большинстве не способны к горизонтальному переносу генов.

Ветви, соответствующие разделам, воспроизведенным менее чем в 50 % репликах начальной загрузки, свернуты. Рядом с ветвями показан процент повторяющихся ветвей, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (1000 повторов). Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода максимального составного правдоподобия и выражены в единицах количества замен оснований на сайт. В этом анализе использовались 75 нуклеотидных последовательностей. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). Эволюционный анализ проводился в MEGA X [7]. Эндолизины бактериофагов *Escherichia coli* отмечены кружками, бактериофагов RB43 и RB49 – зачерненными кружками.

Открытие Таняшиным В.И. и его колле-

гами [9, 10] у так называемых «псевдо – T – четных» бактериофагов способности к трансдукции генов устойчивости к антибиотикам плазмидной локализации, поставило вопрос о создании методов селекции трансдуцирующих и нетрансдуцирующих бактериофагов среди T4-родственных. Ранее мы описали подходы к получению препаратов не трансдуцирующих бактериофагов для профилактики колибактериозов у поросят [5]. Методы отбора трансдуцирующих и нетрансдуцирующих бактериофагов требуют расширения используемых специфических генетических маркеров. Ранее нами были описаны эндолизины трансдуцирующих бактериофагов RB43 и RB49, как белки лизиса альтернативные лизоциму бактериофага T4 [8]. Такое их отличие ставит их в первый ряд специфических генетических маркеров для поиска в природе трансдуцирующих бактериофагов как новых инструментов геномной инженерии и для отделения их от трансдуцирующих бактериофагов при конструировании препарата для фаговой терапии колибактериозов. В этой работе мы решили исследовать распространение последовательностей этих белков в природе путем анализа баз данных генетических последовательностей.

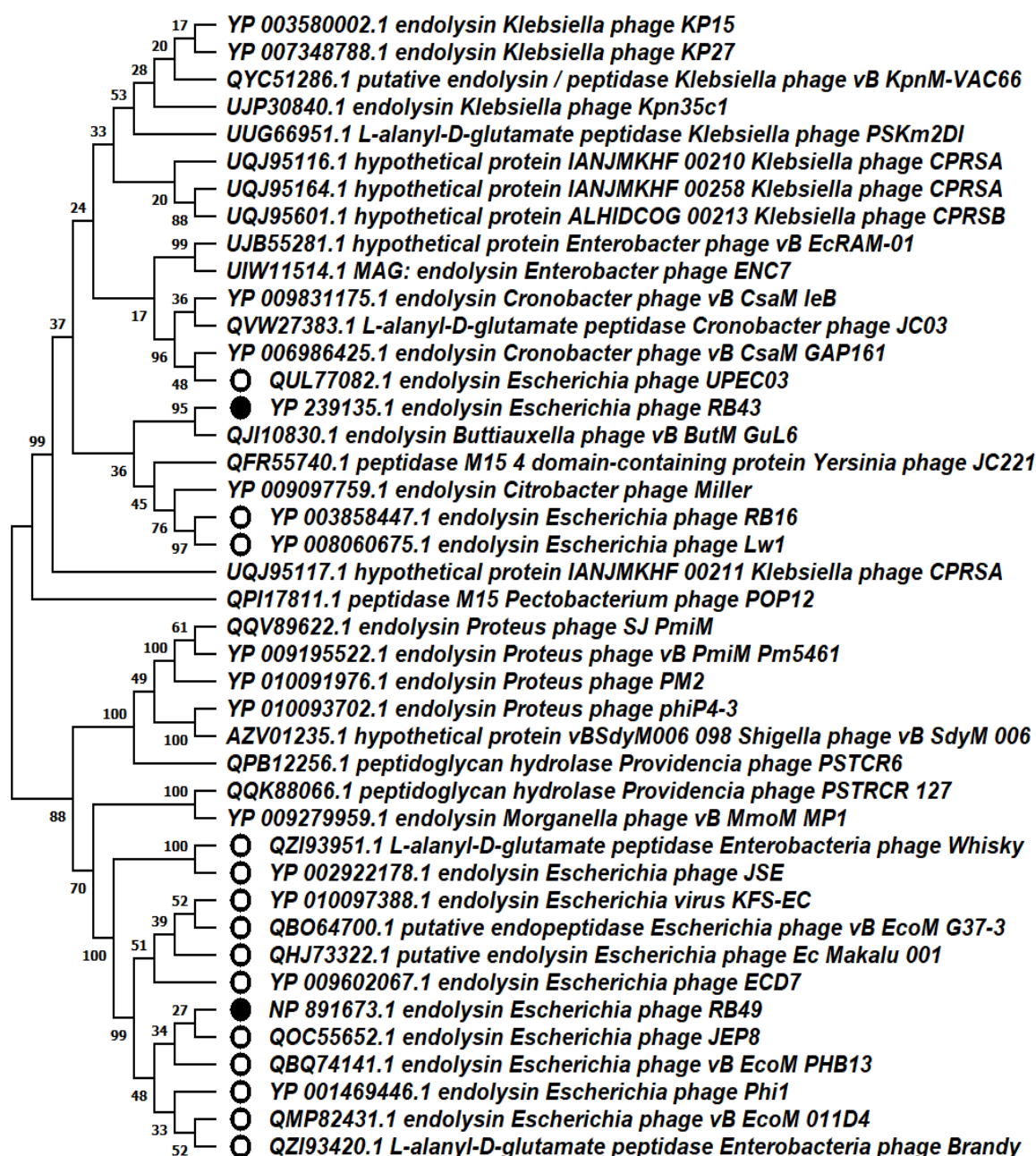


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево эндолизинов, полученное с использованием метода UPGMA

Результаты исследований. Было проведено сравнение аминокислотной последовательности эндолизина бактериофага RB43 программой BLASTp [9] в базе данных GenBank было найдено 74 белка, в том числе и эндолизин бактериофага RB49. Для дальнейшего филогенетического анализа мы исполь-

зовали подходы, описанные нами ранее [6, 7, 8]. Филогенетические деревья эндолизин псевдо – T – четных бактериофагов, полученные методами UPGMA и Minimum Evolution представлены на рисунках 1 и 2, соответственно.

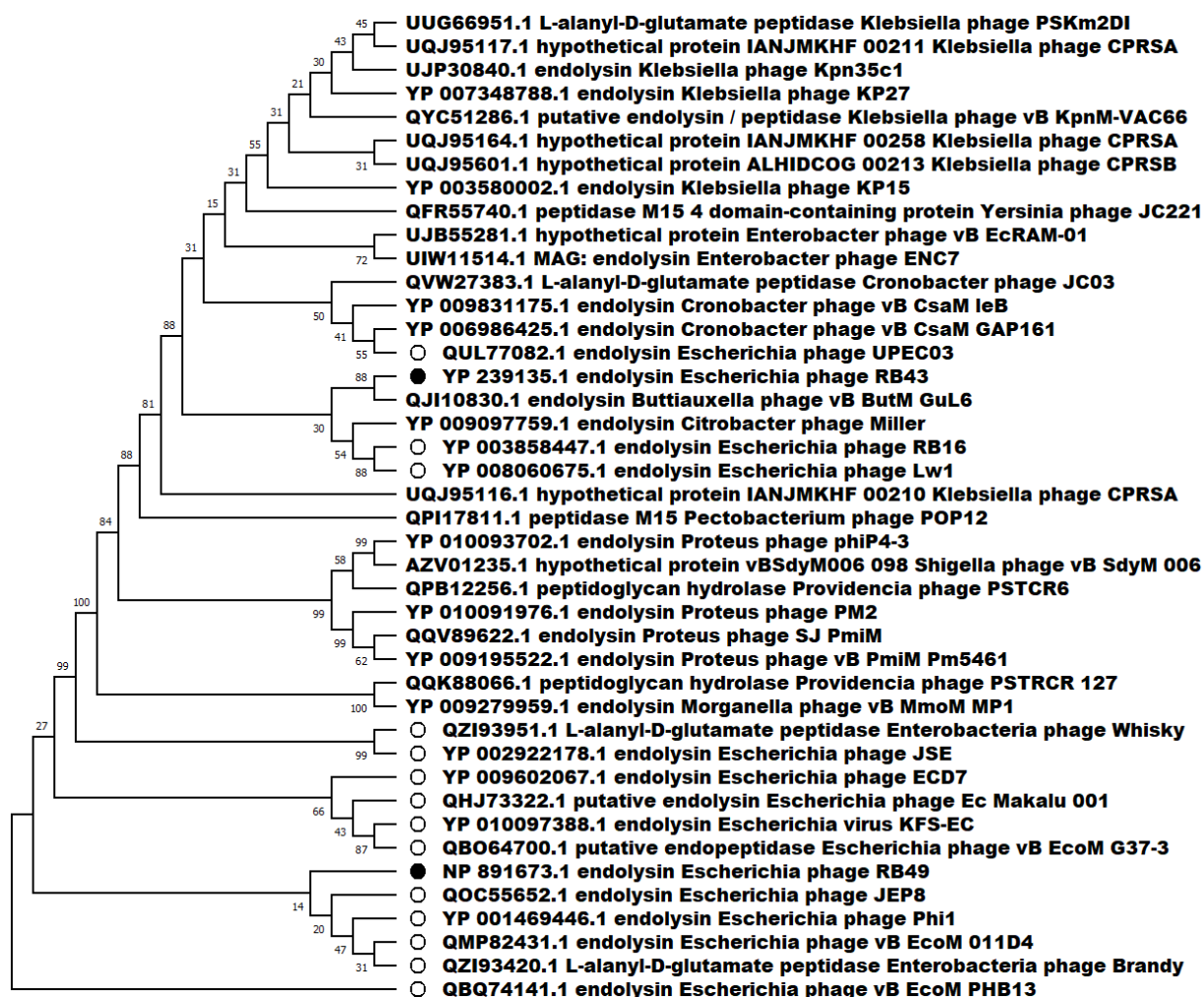


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево эндолизин, полученное с использованием метода Minimum Evolution. Эволюционная история выводилась с использованием метода минимальной эволюции [1]. Показано оптимальное дерево с суммой длин ветвей = 2,87411511. Рядом с ветвями показан процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (1000 повторов) [4]. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием матричного метода JTT [9] и выражены в единицах количества аминокислотных замен на сайт. Поиск в дереве МЭ производился с использованием алгоритма Close-Neighbor-Interchange (CNI) [10] на уровне поиска 1. Для генерации начального дерева использовался алгоритм Neighbor-joining [5]. В этом анализе участвовали 42 аминокислотные последовательности. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). Всего в финальном наборе данных было 145 позиций. Эволюционные анализы проводились в MEGA X [7]. Остальные обозначения, как и на рисунке 1.

Выводы.

1. Распространение эндолизин псевдо-Т – четных бактериофагов, RB43 и RB49, в природе исследовано с помощью анализа баз данных генетических последовательностей. Всего по сходству с аминокислотной последовательностью эндолизина бактериофага RB43 программой BLASTp в базе данных GenBank было найдено 42 белка, в том числе и эндолизин бактериофага RB49. Белки, сходные с эндолизином бактериофага RB43, чаще встре-

чаются у фагов клебсиелл и лишь четыре принадлежат фагам Escherichia coli. 12 гомологов фермента лизиса бактериофага RB49 были обнаружены у фагов Escherichia coli, также они встречаются у фагов протей, провиденсий и морганелл, и минорно у вирусов других бактерий.

Сравнительный анализ 42 последовательностей методами UPGMA и Minimum Evolution показал, что все последовательности из различных бактериофагов кластери-

зуются в две хорошо различающиеся группы, группа эндолизина RB43 (22 последовательности) и группа эндолизина RB49 (20 последовательностей). Следовательно, этих белки могут использоваться как генетические маркеры для селекции трансдуцирующих бактериофагов при получении препаратов, состоящих из нетрансдуцирующих фагов для фаговой терапии колибактериозов у поросят и птицы.

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. Зимин А. А. Коронавирусы и животноводство / А. А. Зимин, Д. В. Осепчук // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2020. – Том – 9. – № 1. – С. 8–14.
3. Зимин А. А. Сравнение структурного белка денсовируса BmDNV-1 тутового шелкопряда с белками вирусов бактерий и архей для изучения возможности ложноположительных ответов при ИФА-тестировании гусениц / А. А. Зимин, Н. Э. Скобликов, Н. Н. Назипова, Д. В. Осепчук, А. Г. Кощаев // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. – Краснодар: КубГАУ. – 2020. – № 161. – С. 150–160
4. 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).
5. Скобликов Н. Э. Выделение и отбор нетрансдуцирующих бактериофагов *E. coli* для противоколибактериозных препаратов / Н. Э. Скобликов, С. И. Кононенко, Д. В. Осепчук, Е. А. Москаленко, В. В. Авдиенко, А. А. Зимин // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. – 2016. – №08(122). – С. 554–566.
6. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402.
7. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549.
8. Mikoulińska G. V., Chernyshov S. V., Shavrina M. S., Molochkov N. V., Lysanskaya V. Ya., Zimin A. A. Two Novel Thermally Resistant Endolysins Encoded by Pseudo T-Even Bacteriophages RB43 and RB49. *Journal of General Virology*. – 2018. – 99(3). – pp. 402–415, doi: 10.1099/jgv.0.001014.
9. 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.
10. 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:MICI.0000008372.06477.43.