

DOI: 10.48612/sbornik-2023-1-49  
УДК 574.24

## **БАКТЕРИОФАГ ЭШЕРИХИЙ SLUR14 ИМЕЕТ БОЛЬШОЙ КАПСИДНЫЙ АНТИГЕН СХОДНЫЙ С НОС БЕЛКОМ БАКТЕРИОФАГА Т4**

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

**Никулина Александра Николаевна**<sup>1</sup>, аспирант

**Осепчук Денис Васильевич**<sup>2,3</sup>, д-р с-х. наук

**Кощаев Андрей Георгиевич**<sup>2</sup>, д-р биол. наук, профессор, академик РАН

<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>ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснодар, Российская Федерация

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина», г. Краснодар, Российская Федерация

В данной работе исследовано эволюционное сходство белка Нос бактериофага Т4 с его гомологом у бактериофага *Escherichia coli slur14*. Исследование было проведено с помощью точечной матрицы и алгоритма BLASTp. Было показано наличие в последовательности белка Нос бактериофага slur14 четырех доменов, сильно сходных со вторым доменом белка Нос бактериофага Т4. Домены первый, шестой и седьмой белка Нос бактериофага slur14 оказались очень близки по последовательности первому, третьему и четвертому доменам белка Нос бактериофага Т4. Последовательность белка Нос бактериофага slur14 может быть использована для геномного редактирования геномов бактериофагов, близкородственных Т4, с целью получения терапевтических бактериофагов с большей аффинностью к слизи кишечника сельскохозяйственных животных и птицы.

**Ключевые слова:** бактериофаговая терапия; бактериофаг slur14; белок Нос; микробиота и слизь кишечника сельскохозяйственных животных

## **ESCHERICHIA BACTERIOPHAGE SLUR14 HAS A LARGE CAPSID ANTIGEN SIMILAR TO THE HOC PROTEIN OF BACTERIOPHAGE T4**

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

**Nikulina Aleksandra Nikolaevna**<sup>1</sup> PhD student

**Osepchuk Denis Vasilyevich**<sup>2,3</sup>, Dr. Agr. Sci.

**Koshchaev Andrey Georgievich**, Dr. Biol. Sci., academician RAS

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

<sup>3</sup>Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation

In this work, the evolutionary similarity of the Hoc protein of bacteriophage T4 with its homologue in bacteriophage slur14 was studied. The study was carried out using a dot matrix and the BLASTp algorithm. The presence of four domains in the sequence of the Hoc protein of bacteriophage slur14, strongly similar to the second domain of the Hoc protein of bacteriophage T4, was shown. Domains 1, 6, and 7 of the Hoc protein of the slur14 bacteriophage were found to be very similar in sequence to the first, third, and fourth domains of the Hoc protein of the T4 bacteriophage. The sequence of the Hoc protein of bacteriophage slur14 can be used for genomic editing of the genomes of bacteri-

ophages closely related to T4 in order to obtain therapeutic bacteriophages with a higher affinity for the intestinal mucus of farm animals and birds.

**Key words:** bacteriophage therapy; slur14 bacteriophage; Hoc protein; microbiota and intestinal mucus of farm animals

Использование бактериофагов для контроля инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных имеет большие перспективы на фоне широчайшего распространения генов устойчивости к антибиотикам среди бактериальных возбудителей скота и птицы [1]. Одними из наиболее перспективных групп бактериофагов являются бактериофаги, родственные классическому фагу T4. Эти бактериофаги имеют в своей геномной ДНК 5'-гидроксиметилцитозин вместо обычного цитозина. Из-за этого они не способны к опосредованному фагами горизонтальному переносу генов за счет фаговой трансдукции [2]. Отсутствие способности к трансдукции у большинства представителей этой группы фагов обеспечивает потенциальное отсутствие отдаленных последствий бактериофаговой терапии. Одним из возможных улучшений работы этих бактериофагов может являться повышение их аффинности к субстратам кишечника сельскохозяйственных животных и как следствие пролонгации терапевтического воздействия ветеринарных препаратов, полученных на основе T4-бактериофагов. На поверхности капсида бактериофага T4 обнаружен высокоантигенный белок Hoc (от английского выражения: High antigenic Outer Capsid protein), содержащий иммуноглобулинподобные (Ig-подобные) домены. За счет этих доменов он может связываться с полисахаридной частью муцина, компонента слизи кишечника сельскохозяйственных животных и птицы. Повышение эффективности этого связывания за счет увели-

чения числа ответственных за это взаимодействие доменов может быть достигнуто методами белковой инженерии при редактировании генома бактериофагов. В этой работе мы попытались методами биоинформатики отыскать в природе новые белки Hoc, содержащие большее число доменов связывания полисахаридов муцина и охарактеризовать доменную структуру таких белков относительно структуры белка Hoc бактериофага T4. Ig-подобные домены часто встречаются на поверхности бактериофагов, имеющих отростки. Мы предполагаем, что Ig-подобные домены на поверхности фагов взаимодействуют с углеводами на поверхности, как бактериальной клетки, так и на поверхностях многоклеточных организмов и служат для увеличения инфекционности за счет связывания полисахаридов. Позиционирование Ig-подобных доменов в экспонированном положении на поверхности фага было продемонстрировано в исследовании по связыванию фага муцином кишечной слизи мыши [3]. Подобные домены обнаружены также на капсиде фага phi29, T5, лямбды и ряда других фагов. Бактериофаг T4 декорирован примерно 150 копиями этого высокоантигенного наружного капсидного белка Hoc. Молекула Hoc (40 кДа) присутствует в центре каждого гексамерного капсомера. Биохимические и модельные исследования показывают, что Hoc состоит из цепочки из четырех доменов, трех Ig-подобных и одного домена, сходного с доменами телокина, на C-конце (рис. 1).

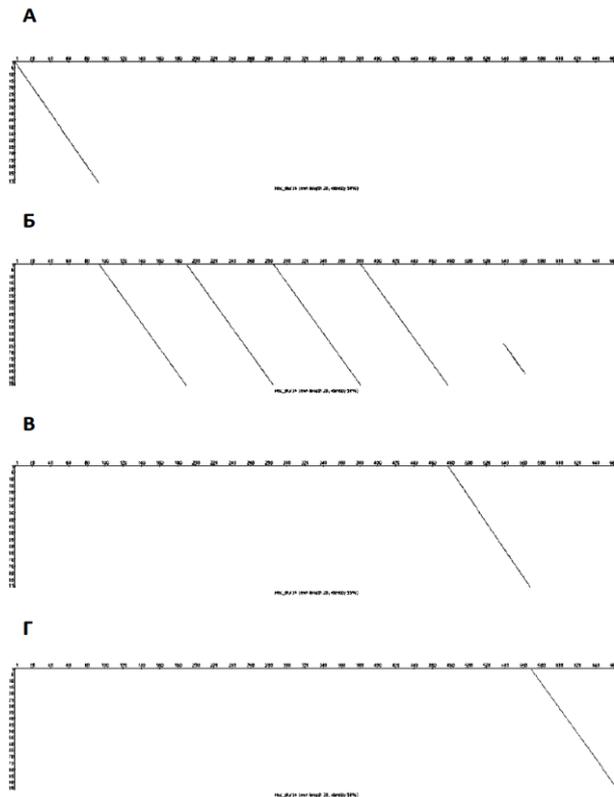


Рис. 1. Сравнительный анализ последовательностей белков Нос бактериофагов Т4 и slur14. Аминокислотная последовательность белка Нос бактериофага Т4 была разделена на три последовательности, первого – 93 аминоконцевые аминокислоты, второго – следующие 96 аминокислот, третьего – дальнейшие – 94 аминокислоты и четвертого – 93 С-концевые аминокислоты – доменов. На рисунках точечные матрицы сравнения последовательности белка Нос бактериофага slur14 (абсцисса) и последовательностей Ig-подобных доменов белка Нос бактериофага Т4 (ордината), А – первого, Б – второго, В – третьего и Г – четвертого.

Аминокислотная последовательность, ESRNG, в С-концевом домене обеспечивает взаимодействие с основным белком капсида, gp23\*. Таким образом структуру белка Нос можно представить следующим образом: 1-й Ig-подобный домен, 2-й Ig-подобный домен с центром связывания Ca<sup>2+</sup>, 3-й Ig-подобный домен, и С-концевой домен, ответственный за прикрепление к капсиду фага. Ранее мы исследовали эволюционные отношения этих четырех доменов у различных Т4-фагов и составили предварительные схемы генетических событий, которые могут приводить к увеличению размера этого белка за счет внутригенной рекомбинации с увеличением числе доменов типа домена 2 белков Нос бактериофага Т4 [4].

**Постановка задачи и методика исследований.** Бактериофаг эшерихий slur14 кодирует сходный с Нос белком бактериофага Т4 белок, имеющий длину 664 аминокислот-

ных остатка. Мы решили провести анализ его последовательности с помощью точечной матрицы в пакете программ UGENE [5]. В качестве образцов для сравнения мы решили использовать аминокислотные последовательности первого длиной в 93 остатка, второго длиной в 96 остатков, третьего длиной в 94 остатка и четвертого длиной в 92 аминокислотных остатка доменов белка Нос бактериофага Т4.

**Результаты исследований.** Было проведено сравнение аминокислотной последовательности белка Нос бактериофага Т4 и аминокислотной последовательности белка Нос бактериофага slur14 методом точечной матрицы в пакете программ UGENE [5] и программой BLASTp на сайте NCBI [6]. Полученные с помощью точечной матрицы данные представлены на рисунке 1, парные выравнивания, построенные программой BLASTp, представлены на рисунках 2 и 3. На плотках,

полученных методом точечной матрицы (везде длина окна – 20 аминокислотных остатков, сходство 50%) ярко видно сходство первых доменов обоих белков, сходство второго домена белка фага Т4 с четырьмя повто-

ряющимися доменами белка Нос фага slur14, а также сходство третьего и четвертого доменов белка фага Т4 с предпоследним и С-концевым доменами белка фага slur14.

Query	1	MTFTVDITPKTPTGVIDETKQFTATPSGQTGGGTITYAWSVDNVPQDGAEATFSYVLKGP	60
Sbjct	1	MTFTVDITPKNTTGVIDDQTTQFTATPSGQTGDGPITYAWSVDVVPQDGAEATFNYVLKGP	60
Query	61	AGQKTIKVVATNTLSEGGPETAEATTTITVKNKTQTTTLAVTPASPAAGVIGTPVQFTAA	120
Sbjct	61	AGKTIKVVATN+++PETAE TTTITVKNKTQ+TTTAVTP SP AGVIGTP++FTAA	120
Query	121	LASQPDGASATYQWYVDDSQVGGETNSTFSYPTTSGVKRIKCVAQVATDYPDALSVTSN	180
Sbjct	121	LASQP GA+ATYQW+VD S V TN+TF+YTP SGVKRIKCVAQVATDYPDALSVTSN	180
Query	181	EVSLTVNKKTMNPQVTLTPPSINVQDAS-ATFTANVTGAPEEAQITYSWKDKDSSPVEGS	239
Sbjct	181	EVSLTVNKK + +TP S + FTA + P A TY W D S V G	240
Query	240	TNV---YTVDTSSVGSQTIIEVTATVTAADYNPVTVT	272
Sbjct	241	TN YT TS G + I+ A VTA +YN VT	274

Рисунок 2 – Парное наложение 272 аминокислотных остатков аминокислотной последовательности белка Нос бактериофага Т4 и 274 аминокислотных остатков аминокислотной последовательности белка Нос бактериофага slur14. Видно сильное сходство этих двух аминокислотных последовательностей в области 189 аминоконцевых остатков, что говорит о сходстве в области первых двух доменов обоих белков. Исследование выполнено программой BLASTp.

Query	4	TVDITPKTP-TGVIDETKQFTATPSGQTGGGTITYAWSVDNVPQDGA-EATFSYVLKGP	61
Sbjct	98	T+ +TP +P GVI +FTA + Q G TY W VD P D A ATF+Y +	156
Query	62	GQKTIKVVATNTLSEGGPETAEAT-TTITVKNKTQTTTLAVTPASPAAGVIGTPVQFTAA	120
Sbjct	157	G K IK VA T ++ + + ++TV K QTTTLAVTP SP AGVIGTPVQFTAA	216
Query	121	LASQPDGASATYQWYVDDSQVGGETNSTFSYPTTSGVKRIKCVAQVATDYPDALSVTSN	180
Sbjct	217	LASQP GASATYQWYVDDSQVGGETN+TF+YPTTSGVKRIKCVAQVTA +Y+ VTSN	276
Query	181	EVSLTVNKKTMNPQVTLTP--PSINVQDASATFTANVTGAPEEAQITYSWKDKDSSPV-E	237
Sbjct	277	EVSLTVNKKT ++TP P+ V A FTA + P+ A TY W D S + E	335
Query	238	GSTNVYTVDTSSVGSQTIIEVTATVTAADYNPVTVT	272
Sbjct	336	++ ++ ++ G + I+ A VTA DY+ TVT	370

Рис. 3. Парное наложение аминокислотных остатков 4 - 272 аминокислотной последовательности белка Нос бактериофага Т4 и аминокислотных остатков 98 – 370 аминокислотной последовательности белка Нос бактериофага slur14. Видно сильное сходство этих двух аминокислотных последовательностей в области 95 – 190 по последовательности белка фага Т4 и 190–286, что говорит о сильном сходстве последовательности аминокислот второго домена белка Т4 с третьим доменом белка фага slur14.

Данные о парном выравнивании этих двух последовательностей в остальной части этих двух белков показали аналогичное сходство в парном выравнивании, подтверждающие анализ, проведенный с помощью точечной матрицы. На основе полученных данных о

структуре сходств аминокислотных последовательностей этих двух гомологичных белков нами выведена схема доменной организации Нос - белка бактериофага slur14. Она представлена на рисунке 4.



Рис. 4. Схема доменной организации белка Нос бактериофага slur14, выведенная на основе сравнительного анализа с белком Нос бактериофага Т4 методами точечной матрицы и BLASTp.

**Выводы.** В ходе исследования мы с помощью двух независимых методов биоинформатики показали наличие в последовательности белка Нос бактериофага slur14 четырех доменов, сильно сходных со вторым доменом белка Нос бактериофага T4. Домены первый, шестой и седьмой белка Нос бактериофага slur14 оказались очень близки по последовательности первому, третьему и четвертому доменам белка Нос бактериофага T4. Тем самым всё увеличение последовательности белка Нос бактериофага slur14 произошло за счет увеличения числа «вторых доменов».

Повторы второго домена белка Нос бактериофага T4 возникли в последовательности белка Нос бактериофага slur14, скорее всего, за счет ряда внутригенных дупликаций.

Последовательность белка Нос бактериофага slur14 может быть использована для геномного редактирования геномов бактериофагов, близкородственных T4 рода *Tequatrovirus* с целью получения бактериофагов с большей аффинностью к слизи кишечника сельскохозяйственных животных и птицы.

Для подтверждения данных предположений необходимо провести больше подобных биоинформатических исследований, чтобы охарактеризовать другие белки Нос данной группы бактериофагов и получить коллекцию последовательностей для расширения возможностей редактирования геномов терапевтических бактериофагов для нужд ветеринарии и медицины.

Открытые нами увеличения числа доменов – эффекторов взаимодействия бактериофагов с олигосахаридами различных субстратов мест обитания бактериофагов - может позволить регулировать распространение терапевтических бактериофагов в природе как с целью их удержания в биотопах терапевтического воздействия, так и с целью их удаления из продуктов животноводства с помощью специальных приемов зоотехнии.

**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. 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 39, 761–772 (2003). <https://doi.org/10.1023/A:1024748903232>.
3. Barr J. J., Auro R., Furlan M., Whiteson K.L., Erb M.L., Pogliano J., Stotland A., Wolkowicz R., Cutting A.S., Doran K.S., Salamon P., Youle M., Rohwer F. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013 Jun 25;110(26):10771–6. doi: 10.1073/pnas.1305923110.
4. Zimin A. A., Mikoulinskaia G. V., Nigmatullina L. F., Nazipova N. N. Comparative analysis of amino acid sequences in particular domains of Hoc proteins in Teequatrovirinae subfamily bacteriophages Матем. биология и биоинформ., 2018, 13:Suppl., 39–58.
5. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics. – 2012 Apr 15;28(8):1166-7. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.
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.