

ИЗУЧЕНИЕ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ВИРИОНА Stx-КОНВЕРТИРУЮЩЕГО БАКТЕРИОФАГА ф24В МЕТОДАМИ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2024 г. А. С. Кузнецов^{а, *}, А. В. Моисеенко^б, Е. Е. Куликов^а, А. В. Летаров^{а, б}

^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

*e-mail: alexbluesking@gmail.com

Поступила в редакцию 06.10.2023 г.

После доработки 28.11.2023 г.

Принята к публикации 29.11.2023 г.

Разработана модифицированная методика культивирования, концентрирования и очистки препаратов фага ф24В. В частности, использован новый лизогенный штамм-продуцент фага, лишенный жгутиков, оптимизированы условия индукции, применены очистка в градиенте сахарозы и концентрирование осаждением на подушку из фреона 113. При помощи данного метода был получен препарат Stx-конвертирующего бактериофага ф24В, пригодный для прямого анализа методом крио-ЭМ. На основании данных крио-ЭМ для данного фага впервые произведена первичная трехмерная реконструкция вирионов. Описана структура хвоста фага ф24В. Показано, что адсорбционный аппарат данного вируса представлен шестью тонкими боковыми фибриллами и расположенной на конце хвоста осевой фибриллой. Такое устройство хвостовой структуры согласуется с ранее выдвинутой гипотезой, основанной на анализе рецептор-распознающих белков этого бактериофага.

Ключевые слова: Stx-фаги, крио-ЭМ, структура вириона, рецептор-распознающие белки, *Escherichia coli*, STEC, ультрацентрифугирование

DOI: 10.31857/S0026365624030095

На сегодняшний день набирают актуальность работы по изучению патогенных вариантов *Escherichia coli*. Наравне с бактериями клинически значимой группы ESKAPE, многие штаммы *E. coli* также характеризуются наличием множественной лекарственной устойчивости, что послужило основанием для введения их в группу ESKAPE (Blake, Choi и соавт., 2021). Патогенность *E. coli* может варьировать от штамма к штамму и обычно связана как со способностью клеток к адгезии на слизистой кишечника и инфильтрации эпителия, так и с продукцией термолабильного или термостабильного энтеротоксинов, либо шигаподобного токсина (Riley, 2014). Шигатоксигенные *E. coli* (Shiga toxigenic *E. coli*, STEC) вызывают опасные токсикоинфекции у людей, являясь распространенной причиной диарей, геморрагического колита и гемолитико-уремического синдрома (Trachtman et al., 2012). Обнаружение STEC у сельскохозяйственных животных, которые могут быть бессимптомными носителями, приводит к значительным экономическим потерям в животноводстве (Callaway et al., 2009; Todd, 1989).

Бактерии группы STEC приобрели способность синтезировать шигаподобный токсин вследствие лизогенной конверсии. Умеренные бактериофаги, несущие гены токсина *stxA* и *stxB*, включены в группу Stx-конвертирующих фагов (Stx-фагов). Stx-фаги принадлежат к классу *Caudoviricetes*, при этом их вирионы могут быть представлены морфотипами сифовирусов, подовирусов и миовирусов (Muniesa et al., 2004). Большинство Stx-конвертирующих бактериофагов обладает лямбдоидным типом организации генома (Muniesa et al., 2004), однако сообщается и о нелямбдоидных Eru1-фагах, также кодирующих гены группы *stx* (Llarena et al., 2021). Для лямбдоидных Stx-фагов характерно расположение генов токсина в кластере поздних генов, что подразумевает экспрессию шигаподобного токсина в ходе литической инфекции и его высвобождения вместе с фаговым потомством при лизисе клеток (Sausset et al., 2020). Большинство Stx-фагов присутствует в виде профагов в геномах различных STEC, периодически распространяясь в виде вирусных частиц при индукции профагов из лизогенов. Индукция Stx-профагов иногда является спонтанной, но часто вызвана

воздействием стрессовых факторов. В связи с этим применение антибиотиков для терапии STEC-инфекций не рекомендовано, поскольку оно вызывает сильный стресс у лизогенов, приводя к их массовому лизису и резкому повышению количества токсина Stx в кишечнике (Freedman et al., 2016; Sausset et al., 2020).

Бактериофаг ф24В, длина генома которого составляет 57677 п.н. (Smith et al., 2012) (GenBank: NM208303.1), и его близкие родственники представляют наиболее часто встречающиеся Stx-профаги. Частицы фага ф24В имеют морфологические особенности, характерные для подовирусов, поскольку имеют короткий хвост (Allison et al., 2003). Показано, что этот фаг *in vitro* инфицирует широкий спектр лишенных полноценного О-антигена (т.н. rough) штаммов *E. coli*, поскольку распознает в качестве конечного рецептора консервативный и жизненно важный белок внешней мембраны BamA (Rollauer et al., 2015; Smith et al., 2007). Также для ряда исследованных О-серотипов *E. coli* продемонстрировано, что наличие О-антигена, напротив, подавляет адсорбцию данного бактериофага на поверхности клетки, препятствуя лизогенизации и литической инфекции (Golomidova et al., 2021). Это может быть объяснено тем, что исследованные варианты О-антигена экранируют доступ фаговых рецептор-распознающих белков к конечному рецептору фага в составе внешней мембраны (Kulikov et al., 2019).

Несмотря на множество исследований в области биологии STEC, механизмы адсорбции Stx-конвертирующих бактериофагов, являющейся первопричиной формирования шигатоксигенного фенотипа *E. coli*, остаются пока не выясненными. Установление механизма адсорбции бактериофага ф24В на поверхности чувствительных к фагу клеток хозяев, в частности, механизма распознавания консервативного белка *E. coli* BamA, представляет собой важную задачу фундаментального значения. Эти знания, в совокупности с получением вирулентных мутантов данного вируса или рекомбинацией с другими вирулентными фагами, использующими идентифицированные первичные рецепторы, откроет возможности для инженерии терапевтических колифагов широкого спектра.

Одним из наиболее прогрессивных методов анализа структуры высокомолекулярных комплексов, в частности, вирусных частиц, сегодня оказывается трехмерная реконструкция на основе криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) (de Oliveira, Silva, 2021). Одним из серьезных ограничений метода оказывается то, что препараты вирусов, используемые в крио-ЭМ, должны содержать морфологически интактные и однородные фаги в высоких концентрациях, свободные от других субмикроскопических объектов.

Для бактериофага ф24В данный метод долгое время не мог быть использован в связи с трудностями получения высококонцентрированного и при этом достаточно чистого препарата частиц данного вируса, пригодного для крио-ЭМ. Благодаря оптимизации способов получения фаговых лизатов и введению

новых стадий в процесс их концентрирования и очистки, мы преодолели технические затруднения. Ранние попытки получения нами препарата фага показали, что очистка данного бактериофага путем ультрацентрифугирования в градиенте хлорида цезия приводит к понижению биологического титра в препарате на несколько порядков и нежелательным морфологическим изменениям вирионов (данные не приведены). В дальнейшем вместо градиента хлористого цезия мы применили очистку в градиенте сахарозы, которая является более биосовместимой. Также для ф24В было показано, что вирусные частицы из лизатов обычно соочищаются с бактериальными жгутиками, поэтому в рамках новой методики фаговые лизаты мы получали индукцией профагов из лизогенного штамма *E. coli* 4sR:24В, подготовленного нами на основе лабораторного штамма фага ф24В:Cat, полученного от Н. Е. Allison, и лишенного жгутиков бактериального штамма *E. coli* 4sR из нашей коллекции.

Индукцию профагов производили с использованием митомицина С и при низкой аэрации среды, что позволило не только увеличить выход фага, но и уменьшить содержание в образце мембранных везикул, мешавших сбору данных крио-ЭМ. Далее фаговые лизаты осветляли путем центрифугирования при 15000 g в течение 20 мин. Все последующие стадии ультрацентрифугирования проводили при 75000 g, максимальных параметрах ускорения при разгоне и остановке центрифуги и температуре 20°C в течение часа. Осветленные лизаты сначала концентрировали ультрацентрифугированием в угловом роторе Beckman 45Ti. Далее сконцентрированные образцы ресуспендировали в SM-буфере (8 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) и наслаивали на ступенчатый градиент плотности-вязкости сахарозы (20–30–40–50–60%) в буфере (50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 50 mM NaCl), после чего подвергали ультрацентрифугированию в бакетном роторе Beckman SW50.1. После центрифугирования отбирали очищенный фаг на границе слоев, соответствующих 40 и 50% сахарозы, предварительно удаляя все верхние слои, содержащие примеси и поврежденные вирионы. После очистки в градиенте сахарозы биологический титр фага составлял порядка 5×10^{11} БОЕ/мл. Далее препарат подвергался диализу против SM-буфера и дополнительной стадии концентрирования на фреоне: очищенный препарат разводили в SM-буфере и наносили на слой фреона CFC-113 (плотность 1.56 г/см³), после чего центрифугировали при тех же параметрах в бакетном роторе Beckman SW50.1. Значения биологического титра фага в сконцентрированном таким образом препарате достигали 6.5×10^{12} БОЕ/мл. Фреон, практически не растворимый в воде и обладающий высокой плотностью, служил амортизирующей подушкой, предотвращающей агрегацию и поломку вирионов в центрифужном поле.

Полученный таким образом препарат фага ф24В обладал всеми необходимыми характеристиками

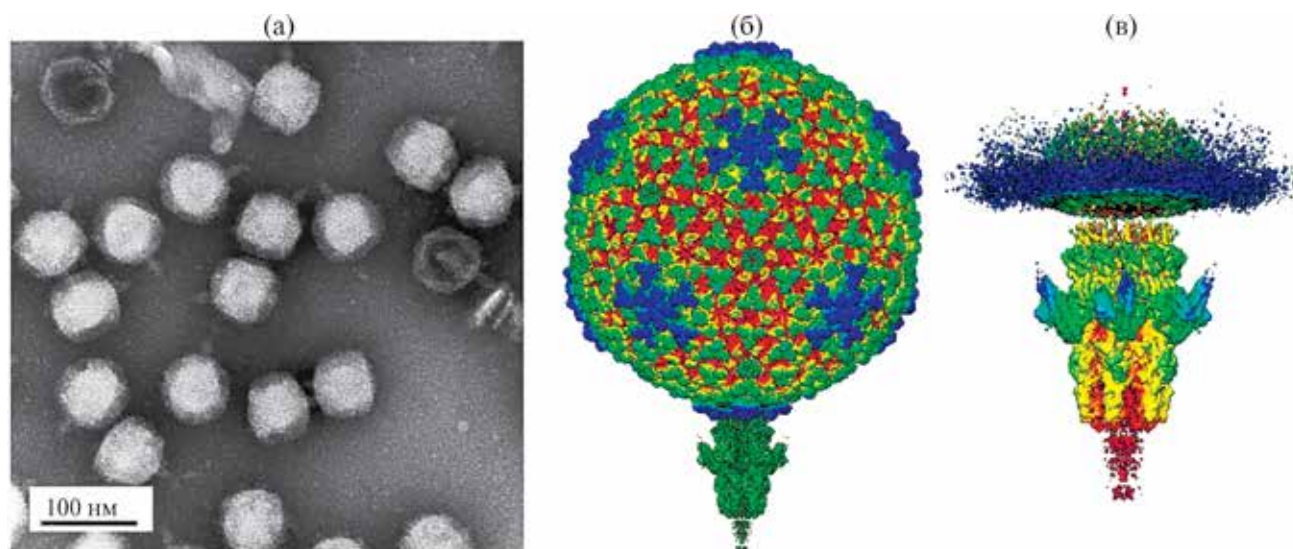


Рис. 1. Структурные особенности бактериофага φ24B: а — изображение вирионов, полученное при помощи ПЭМ; б — трехмерная реконструкция целого вириона; в — трехмерная реконструкция хвоста (градиент цвета от красного к синему отражает расстояние от центральной оси хвоста).

для успешного применения в крио-ЭМ. Перед непосредственным анализом фаговых частиц методом крио-ЭМ нами были получены при помощи просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) изображения вирионов с высоким разрешением (рис. 1а).

Препарат был нанесен на сеточки с пористой углеродной подложкой Quantifoil R1.2/1.3 и витрифицирован в жидком этане на установке Vitrobot IV (“ThermoScientific”, Нидерланды). Наборы крио-ЭМ данных были получены с использованием просвечивающего криоэлектронного микроскопа Titan Krios (“ThermoScientific”, Нидерланды), оснащенного детектором K3 (“Gatan”, США). Обработка данных производилась методом анализа единичных частиц в программном обеспечении cryoSPARC. На основе результатов крио-ЭМ получены предварительные реконструкции капсида и адсорбционного аппарата с разрешением 4.0–6.0 Å (рис. 1б, 1в).

Полученная трехмерная реконструкция вирионов φ24B демонстрирует особенности морфологии фаговых частиц в целом (рис. 1б) и его хвостовой структуры в частности (рис. 1в). Фаговый капсид обладает икосаэдрической симметрией и образован белками гексамеров (в областях граней) и белками пентамеров (в областях вершин). Также заметно наличие пока не идентифицированных в геноме фага декорирующих белков.

В геноме бактериофага φ24B аннотированы гены потенциальных рецептор-распознающих белков 56 и 61. Мы полагаем, что белок gp61 образует хвостовые шипы, ответственные за распознавание пока не установленного первичного рецептора. Это предположение подтверждается наличием значительной гомологии (идентичность 81.55%, в основном в областях С-концевых рецептор-распознающих участков;

покрытие 93%) между последовательностями аминокислотных остатков белков gp61 фага φ24B и боковых фибрилл бактериофага λ_2B8 (Mathieu et al., 2020) (GenBank: LR595859.1). Дополнительным свидетельством в пользу нашей гипотезы является то, что адсорбция фага λ_2B8, любезно предоставленного М. А. Petit, не зависела от наличия на поверхности клеток-хозяев белка VamA исходного “дикого” типа конечного рецептора фага φ24B (данные не приведены).

По распределению электронной плотности в области адсорбционного аппарата можно говорить о наличии шести хвостовых шипов и осевой фибриллы, по своей форме напоминающей предсказанную при помощи алгоритма AlphaFold2 структуру тримера gp56. Это может указывать на возможное участие белка gp56 в необратимой адсорбции фага φ24B. Структура осевой фибриллы фага φ24B также напоминает хвостовую иглу цианофага Pam1 (Zhang et al., 2022) (GenBank: ON014753.1), чей адаптерный белок gp8 является отдаленным гомологом адаптерного белка gp57 фага φ24B. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения об участии белка gp56 в необратимой адсорбции фага φ24B.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Allison H. E., Sergeant M. J., James C. E., Saunders J. R., Smith D. L., Sharp R. J., Marks T. S., McCarthy A. J. Immunity profiles of wild-type and recombinant shiga-like toxin-encoding bacteriophages and characterization of novel double lysogens // *Infect. Immun.* 2003. V. 71. P. 3409–3418.
- Blake K. S., Choi J., Dantas G. Approaches for characterizing and tracking hospital-associated multidrug-resistant bacteria // *Cell. Mol. Life Sci.* 2021. V. 78. P. 2585–2606.
- Callaway T. R., Carr M. A., Edrington T. S., Anderson R. C., Nisbet D. J. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years // *Curr. Iss. Mol. Biol.* 2009. V. 11. P. 67–79.
- de Oliveira G. A., Silva J. L. Cryo-EM to visualize the structural organization of viruses // *Curr. Opin. Virol.* 2021. V. 49. P. 86–91.
- Freedman S. B., Xie J., Neufeld M. S., Hamilton W. L., Hartling L., Tarr P. I., Alberta Provincial Pediatric Enteric Infection T., Nettel-Aguirre A., Chuck A., Lee B., Johnson D., Currie G., Talbot J., Jiang J., Dickinson J., Kellner J., MacDonald J., Svenson L., Chui L., Louie M., Lavoie M., Eltorki M., Vanderkooi O., Tellier R., Ali S., Drews S., Graham T., Pang X. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, antibiotics, and risk of developing hemolytic uremic syndrome: a meta-analysis // *Clin. Infect. Dis.* 2016. V. 62. P. 1251–1258.
- Golomidova A. K., Efimov A. D., Kulikov E. E., Kuznetsov A. S., Belalov I. S., Letarov A. V. O antigen restricts lysogenization of non-O157 *Escherichia coli* strains by Stx-converting bacteriophage phi24B // *Sci Rep.* 2021. V. 11. Art. 3035.
- Kulikov E. E., Golomidova A. K., Prokhorov N. S., Ivanov P. A., Letarov A. V. High-throughput LPS profiling as a tool for revealing of bacteriophage infection strategies // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Art. 2958.
- Llarena A. K., Aspholm M., O'Sullivan K., Wegrzyn G., Lindback T. Replication region analysis reveals non-lambdoid Shiga toxin converting bacteriophages // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 640945.
- Mathieu A., Dion M., Deng L., Tremblay D., Moncaut E., Shah S. A., Stokholm J., Krogfelt K. A., Schjorring S., Bisgaard H., Nielsen D. S., Moineau S., Petit M. A. Virulent coliphages in 1-year-old children fecal samples are fewer, but more infectious than temperate coliphages // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. Art. 378.
- Muniesa M., Serra-Moreno R., Jofre J. Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the *stx* genes appeared conserved // *Environ. Microbiol.* 2004. V. 6. P. 716–725.
- Riley L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* // *Clin. Microbiol. Infect.* 2014. V. 20. P. 380–390.
- Rollauer S. E., Sooreshjani M. A., Noinaj N., Buchanan S. K. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2015. V. 370. Art. 1679.
- Sausset R., Petit M. A., Gaboriau-Routhiau V., De Paepe M. New insights into intestinal phages // *Mucosal Immunol.* 2020. V. 13. P. 205–215.
- Smith D. L., James C. E., Sergeant M. J., Yaxian Y., Saunders J. R., McCarthy A. J., Allison H. E. Short-tailed stx phages exploit the conserved YaeT protein to disseminate Shiga toxin genes among enterobacteria // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. P. 7223–7233.
- Smith D. L., Rooks D. J., Fogg P. C., Darby A. C., Thomson N. R., McCarthy A. J., Allison H. E. Comparative genomics of Shiga toxin encoding bacteriophages // *BMC Genomics.* 2012. V. 13. Art. 311.
- Todd E. C. D. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in Canada and costs to reduce salmonellosis // *J. Food Prot.* 1989. V. 52. P. 586–594.
- Trachtman H., Austin C., Lewinski M., Stahl R. A. Renal and neurological involvement in typical Shiga toxin-associated HUS // *Nat. Rev. Nephrol.* 2012. V. 8. P. 658–669.
- Zhang J. T., Yang F., Du K., Li W. F., Chen Y., Jiang Y. L., Li Q., Zhou C. Z. Structure and assembly pattern of a freshwater short-tailed cyanophage Pam1 // *Structure.* 2022. V. 30. P. 240–251. e244.

SHORT COMMUNICATIONS

CryoEM Investigation of Three-Dimensional Structure of the Stx-Converting Bacteriophage ϕ 24BA. S. Kuznetsov^{1, *}, A. V. Moiseenko², E. E. Kulikov¹, and A. V. Letarov^{1, 2}¹Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

*e-mail: alexbluesking@gmail.com

Received October 6, 2023; revised November 28, 2023; accepted November 29, 2023

Abstract—A modified method for culturing, concentrating, and purifying phage ϕ 24B preparations was developed. In particular, a new lysogenic phage-producing strain lacking flagella was used, induction conditions were optimized, and purification in a sucrose gradient and concentration by deposition on a Freon 113 cushion were used. Using this method, a preparation of the Stx-converting bacteriophage ϕ 24B was obtained, which was suitable for direct analysis by the cryoEM method. Based on cryoEM data for this phage, the first primary three-dimensional reconstruction of its virions was performed. The structure of the phage ϕ 24B tail is described. It was shown that the adsorption apparatus of this virus is represented by six thin lateral fibrils and an axial fibril located at the end of the tail. This arrangement of the tail structure is consistent with the previously proposed hypothesis based on analysis of the receptor binding proteins (RBPs) of this bacteriophage.

Keywords: Stx phages, cryoEM, virion structure, RBPs, *Escherichia coli*, STEC, ultracentrifugation