

УДК 579.254.4; 579.64; 636.4.033

UDC 579.254.4; 579.64; 636.4.033

03.00.00 Биологические науки

Biological sciences

**КОНСТРУИРОВАНИЕ МУТАНТОВ  
БАКТЕРИОФАГА T4 СО СНИЖЕННОЙ  
АНТИГЕННОСТЬЮ<sup>1</sup>**

**CONSTRUCTION OF MUTANTS OF  
BACTERIOPHAGE T4 WITH REDUCED  
ANTIGENICITY**

Зимин Андрей Антонович

к. б. н., доцент

AuthorID: 81249

[zimin@ibpm.pushchino.ru](mailto:zimin@ibpm.pushchino.ru)

*Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г.  
Пушино, Московской обл., Россия  
Пушинский естественно-научный институт, г.  
Пушино, Московской обл., Россия*

Zimin Andrei Antonovich

Cand. Biol. Sci., Associate Professor

AuthorID: 81249

[zimin@ibpm.pushchino.ru](mailto:zimin@ibpm.pushchino.ru)

*Institute of Biochemistry and Physiology of  
Microorganisms of Russian Academy of Sciences,  
Pushchino, Moscow reg., Russia  
Pushchino Natural Science Institute (University)  
Pushchino, Moscow reg., Russia*

Бутанаев Александр Михайлович

к. б. н.

AuthorID:6507648927

[boutanaev@mail.ru](mailto:boutanaev@mail.ru)

*Институт фундаментальных проблем биологии  
РАН, г. Пушино, Московской обл., Россия*

Butanaev Aleksandr Mikhailovich

Cand. Biol. Sci.

AuthorID:6507648927

[boutanaev@mail.ru](mailto:boutanaev@mail.ru)

*Institute of Basic Biological Problems of Russian  
Academy of Sciences, Pushchino, Moscow reg., Russia*

Сузина Наталья Егоровна

к. б. н.

AuthorID: 7003665776

[suzina@ibpm.pushchino.ru](mailto:suzina@ibpm.pushchino.ru)

*Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г.  
Пушино, Московской обл., Россия*

Suzina Nataliya Egorovna

Cand. Biol. Sci.

AuthorID: 7003665776

[suzina@ibpm.pushchino.ru](mailto:suzina@ibpm.pushchino.ru)

*Institute of Biochemistry and Physiology of  
Microorganisms of Russian Academy of Sciences,  
Pushchino, Moscow reg., Russia*

Скобляков Николай Эдуардович

к. мед. н.

SPIN-код: 6591-8710

AuthorID: 56600699300

[skoblikow@yandex.ru](mailto:skoblikow@yandex.ru)

*Краснодарский научный центр по зоотехнии и  
ветеринарии, г. Краснодар, Россия*

Skoblikov Nikolai Eduardovich

Cand. Med. Sci.

SPIN-code: 6591-8710

AuthorID: 56600699300

[skoblikow@yandex.ru](mailto:skoblikow@yandex.ru)

*Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and  
Veterinary Medicine, Krasnodar, Russia*

Сахабутдинова Ляля Ренатовна

[lyalya81@mail.ru](mailto:lyalya81@mail.ru)

*Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г.  
Пушино, Московской обл., Россия*

Sakhabutdinova Lyalya Renatovna

[lyalya81@mail.ru](mailto:lyalya81@mail.ru)

*Institute of Biochemistry and Physiology of  
Microorganisms of Russian Academy of Sciences,  
Pushchino, Moscow reg., Russia*

Присяжная Наталья Викторовна

AuthorID: 35320292000

[tennoko@rambler.ru](mailto:tennoko@rambler.ru)

*Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г.  
Пушино, Московской обл., Россия*

Prisyazhnaya Natalia Victorovna

AuthorID: 35320292000

[tennoko@rambler.ru](mailto:tennoko@rambler.ru)

*Institute of Biochemistry and Physiology of  
Microorganisms of Russian Academy of Sciences,  
Pushchino, Moscow reg., Russia*

<sup>1</sup> Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов 13-04-00991 -а, 16-44-230855р\_а.

Кононенко Сергей Иванович

д. с.-х. н., профессор

SPIN-код: 8188-4599

AuthorID: 349808

Scopus ID:57194626841

[kononenko-62@mail.ru](mailto:kononenko-62@mail.ru)

*Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии, г. Краснодар, Россия*

Kononenko Sergei Ivanovich

Dr. Agr. Sci., Professor

SPIN-code: 8188-4599

AuthorID: 349808

Scopus ID:57194626841

[kononenko-62@mail.ru](mailto:kononenko-62@mail.ru)

*Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russia*

Кощаев Андрей Георгиевич

д. биол. н., профессор

Scopus ID:57189599222

[kagbio@mail.ru](mailto:kagbio@mail.ru)

*Кубанский государственный аграрный университет им И.Т. Трубилина, г. Краснодар, Россия*

Koshchaev, Andrey Georgievich

Dr. Biol. Sci., Professor

Scopus ID:57189599222

[kagbio@mail.ru](mailto:kagbio@mail.ru)

*Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilina, Krasnodar, Russia*

На модели бактериофага Т4 исследовали способ получения инсерционных мутантов по гену *hoc*, кодирующему основную антиген фага. Этот ген, клонированный на плазмиде, был нарушен путем вставки чужеродной ДНК и затем с помощью рекомбинации *in vivo* получены мутанты фага по типу вставки. Получение мутантов бактериофага по типу вставки проводили в два этапа. На первом этапе получали фаги-интегранты, и фаги-сегреганты получали на втором этапе. Мутанты, полученные в результате этой методики, можно было выращивать на штаммах *E.coli* дикого типа, что удобно для производства и применения данных фагов в терапии. Полученные мутанты обладали сниженной антигенностью. Вместе с тем они давали хороший урожай при выращивании фагов на бессупрессорных лабораторных штаммах *E. Coli*. Путем нескольких периодических выращиваний мутантных бактериофагов было показано, что мутации данного типа стабильно поддерживаются более чем в 50 поколениях. Был отработан ряд этапов очистки полученных мутантов бактериофагов. Препараты бактериофагов были исследованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и масс-спектрометрии белков. Показано, что частичная очистка этих бактериофагов с помощью осаждения полиэтиленгликолем позволяет получить гомогенный препарат годный для дальнейшего изучения и доклинических исследований. Родственные Т4 бактериофаги семейства *Myoviridae*, например, Т-четные, обладают существенной гомологией геномов, что позволяет получать на их основе опробованным методом аналогичные мутанты. Таким образом, разработан способ получения мутантов со сниженной антигенностью для их применения как при лечении системных инфекций, так диарей, когда возможно

A method of obtaining insertion mutants for the *hoc* gene, which encodes for the main phage antigen, was developed on the model of bacteriophage T4. This gene was cloned in the plasmid pBSL0+ and was disrupted by insertion of foreign DNA. The phage mutants were obtained by *in vivo* phage-plasmid recombination. The construction of insertion bacteriophage mutants was carried out in two stages. The resulting mutants on this procedure could be grown on wild-type *E. coli* strains, which is convenient for the production and use of these phages in therapy. The mutants obtained had reduced antigenicity. At the same time, the yield of the mutant strains was high when they were grown on the non-suppressor *E. coli* laboratory strains. A number of stages of purification of the bacteriophage mutants obtained were performed. Preparations have been studied by transmission electron microscopy and mass spectrometry. By several periodic cultivations of the mutant bacteriophages, it was shown that mutations of this type are stably maintained during more than 50 generations. T4 related bacteriophages of the family *Myoviridae*, for example, T-even, have the significant homology amongst their genomes, which makes possible to produce similar mutants. Thus, our method was developed to obtain mutants with reduced antigenicity which can be used for both the treatment of systemic infections, and diarrhea in the case, when, bacteriophages penetrate into the bloodstream. Such phages can be used in medicine and veterinary. The reported study was partially supported by RFBR, research projects No. 13-04-00991, 16-44-230855

попадание бактериофагов в кровяное русло.  
Подобные фаги могут найти свое применение в  
медицине и ветеринарии

Ключевые слова: ЛЕЧЕБНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ,  
MYOVIRIDAE, ГЕН ОСНОВНОГО АНТИГЕНА,  
РЕКОМБИНАЦИЯ ДНК, *E. COLI*,  
КОЛИБАКТЕРИОЗ, ФАГОТЕРАПИЯ

Keywords: THERAPEUTIC BACTERIOPHAGES,  
MYOVIRIDAE, E. COLI, GENE OF MAIN  
ANTIGEN, DNA RECOMBINATION,  
COLIBACTERIOSIS, PHAGE THERAPY

Doi: 10.21515/1990-4665-134-034

**Введение.** В связи с широким распространением устойчивости бактерий к антибиотикам в последние годы возобновился интерес к применению бактериофагов. Бактериофаги используемые в фаготерапии должны обладать рядом свойств для их более эффективного и безопасного применения. Это должны быть нелизогенизирующие бактериофаги, не способные трансдуцировать бактериальные либо плазмидные гены [1, 2, 3]. Геномы таких бактериофагов не должны содержать генов, участвующих в развитии патогенеза у бактерий. Кроме того, существенным может оказаться наличие модифицированной ДНК, позволяющей преодолевать системы рестрикции и модификации патогенных бактерий. Бактериофаг T4 и родственные ему бактериофаги, содержащие в составе своей ДНК глюкозилированный гидроксиметилцитозин вместо цитозина, обладают такими свойствами [4, 5].

С другой стороны на примере бактериофагов T4 и T2 показано, что они являются хорошими антигенами [7-10]. Снижение их антигенности открывает перспективу их применения против системных инфекций. Кроме того, при их пероральном применении против энтеробактериальных инфекций есть большая вероятность попадания бактериофагов в кровяное русло при нарушении слизистых поверхностей желудочно-кишечного тракта во время развития диареи. В этом случае бактериофаги также могут вступать во взаимодействие с иммунной системой человека.

Основным антигеном бактериофага Т4 является белок-продукт гена *hoc* (от *highly antigenic outer capsid protein*), который был обнаружен при структурном исследовании белков, декорирующих фаговый капсид [11, 12]. Этот белок имеет молекулярную массу 40342 Да. В головке бактериофага находится 150 копии белка [13-15]. Элементарной единицей поверхностной решетки капсида таких бактериальных вирусов является гексамер, состоящий из процессированного продукта гена *23*, к которому присоединяется одна молекула продукта гена *hoc* и эта структура через мостики, образованные продуктом гена *soc* (*small outer capsid protein*), соединяется с аналогичными структурами, формируя поверхность капсида. Большая часть антител продуцируемых иммунизированными фагом Т4 животными взаимодействует именно с белком – продуктом гена *hoc*.

Большинство бактериофагов Т4-типа содержат на поверхности своего капсида этот основной антиген [12]. В этом случае повторная терапия фаговыми препаратами, содержащими родственные Т4 бактериофаги, может оказаться весьма не эффективной. Первое применение фагового препарата может создать длительную персистенцию значительного титра нейтрализующих антител, что существенно снизит антибактериальное действие препарата. Использование бактериофагов со сниженной антигенностью в этом случае может оказаться очень полезным. Например, для снижения иммуногенности фармацевтически важных ферментов использовалось экспонирование пептидных библиотек.

В ответ на иммунизацию животных бактериофагом Т4 синтезируется нормальный спектр специфических антител и он имеет уже значительный уровень на самых ранних стадиях иммунизации [9], более того антитела к фагу Т4 часто присутствуют в нормальной сыворотке животных. Поэтому снижение иммуногенности фагового препарата может оказать влияние и в

первые часы его применения. Бактериофаги Т4 типа широко распространены в природе [19] и их часто выделяют из фекалий человека [18]. При исследовании фагов выделенных у пациентов детского возраста в Бангладеш число бактериофагов Т4-типа превысило 19 %. Многие сходные с ними или идентичные им Миовириды предлагаются или используются в качестве фаговых препаратов [20]. Поэтому наличие у здоровых и больных людей антител к антигенам этих бактериофагов кажется весьма вероятным.

Достаточно давно получены нонсенс-мутанты по гену *hcs* [13, 14]. Этот ген несущественный и такие мутанты могут развиваться на непермиссивных штаммах *E.coli*, каковыми являются природные бактерии. Их урожай немного снижен по сравнению с бактериофагом Т4 дикого типа и постепенно после нескольких последовательных пассажей в культуре накапливаются ревертанты. Введение другого типа нарушений: делеции или вставки в ген *hcs* могло бы позволить получить неревертирующие мутанты бактериофага Т4 со сниженной антигенностью. В связи с этим мы исследовали способы получения вставочных мутантов по этому гену и ряд свойств полученных бактериофагов, таких как их антигенность и стабильность мутантного фенотипа.

**Материалы и методы.** *Среды и материалы.* Бульон LB содержал NaCl (ОСЧ 10-3 Реахим-10 г/литр), Vacto Tryptone (Difco США; 10 г/литр), and yeast extract (Difco США; 5 г/литр). Для получение твердого агара добавляли Vacto agar (Difco США; 15 г/литр) . Верхний агар для титрования фагов имел тот же состав, но содержал Vacto agar 6.5 г/литр. Олигонуклеотиды были синтезированы в фирме «Синтол» РФ. Использовался ПЭГ6000 (Sigma, США).

*Штаммы бактериофагов и бактерий, плазмиды.* Штаммы бактерий и бактериофагов перечислены в таблицах 1 и 2.

*Использование инсерционно-сегрегационной системы.* Бактериофаги, использованные в работе с системой инсерции и сегрегации и при анализе полученных мутантов по гену *hoc* перечислены в таблице 2.

Таблица 1 – Штаммы *E.coli*, штаммы фагов, плазмиды

Название штамма <i>E. coli</i>	Генотип, свойства	Источник	Ссылка
B	Дикий тип	W.B.Wood, Univ. Colorado, Boulder, USA	[25]
CR63	<i>serU60(AS) lamB63</i>	Тот же	[23]
C600	F tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1 λ <sup>-</sup>	Тот же	[24]
K834	hsdR2- (rK-, mK+) hsdM+, gal-, metB1, supE44, mcrA-, mcrB-	Тот же	[25]
X129 (K834 ΔrecA)	hsdR2- (rK-, mK+) hsdM+, gal-, metB1, supE44, mcrA-, mcrB- ΔrecA	Тот же	

Рекомбинацию фаговой и плазмидной ДНК *in vivo* проводили с использованием системы инсерции-сегрегации с небольшими модификациями. Клетки *E. coli* B su<sup>-</sup> использовали в качестве непермиссивного хозяина для бактериофага T4 K10 (38-, 51-, denA-, denB-). В качестве su<sup>+</sup>-штамма использовали *E.coli* CR63.

Таблица 2 – Штаммы бактериофагов, использованные в работе

Название фага	Генотип, свойства	Источник	Ссылка
T4B	T4 – дикого типа, изолят Bertani	W.B.Wood, Univ. Colorado, Boulder, USA	Изучена подвижность [15,16]
T2L	T2L – дикого типа, изолят Luria	Тот же	Тот же
T6	T6 – дикого типа	Тот же	Тот же
T4 K10	T4 <i>denAB</i> , 38 ( <i>amB262</i> ), 51 ( <i>amS29</i> )	K.N. Kreuzer Duke Univ., Durham, NC, USA	[26]
I2	I2 [T4 K10 (Δ <i>denB</i> - rII) <i>denA</i> , <i>am38</i> , <i>am51</i> , <i>hoc::Km<sup>R</sup></i> , <i>supF</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i> ]	Данная работа	
S8	S8 [T4 K10 (Δ <i>denB</i> - rII), <i>denA</i> , <i>am38</i> , <i>am51</i> , <i>hoc::Km<sup>R</sup></i> ]	Данная работа	
T4Hoc1	T4 wt, <i>hoc::Km<sup>R</sup></i>	Данная работа	

*Конструирование плазмид.* Плазмиды показаны в таблице 3. Использовали рестриктазы фирмы «Сибэнзим» РФ с рекомендованными ими

буферами. Отбор рекомбинантных плазмид pNK11 (pNX11K+) и pNK7 (pNX11K-) проводили на твердой среде LB, содержащей 50 мкг на мл канамицина. Пересевы штаммов данных плазмид и плазмиды pUC4K производили в аналогичных условиях. Для плазмид pBSL0+ и pMX3,4-2 использовали ту же среду, но содержащую ампициллин в концентрации 100 мкг на мл. Клонирование и гибридизацию ДНК проводили по стандартным методикам [28].

Таблица 3 – Плазмиды, использованные в работе

Название плазмиды	Генотип, свойства	Источник	Ссылка
pBSL0-	pMB9 (ColE1), supF, p23-	K.N. Kreuzer Duke Univ., Durham, NC, USA	[26]
pBSL0+	pMB9 (ColE1), supF, p23+	Тот же	[26]
pMX3,4-2	pMB9 (ColE1), T4 inh, T4 hoc	Тот же	[21]
pUC4K	pMB9 (ColE1Δrep), lacZα:Km <sup>R</sup> ,	J. Messing, Univ. Minn., St. Paul, MN, USA	[22]
pNX11	pMB9 (ColE1), supF, p23+, T4 hoc	Данная работа	
pNK11 (pNX11K+)	pMB9 (ColE1), supF, p23+, T4 hoc ::Km <sup>R+</sup>	Данная работа	
pNK7 (pNX11K-)	pMB9 (ColE1), supF, p23+, T4 hoc ::Km <sup>R-</sup>	Данная работа	

*Получение фаголизатов* проводили в соответствии с задачей эксперимента после заражения бактерий либо с низкой, либо с высокой множественностью. В экспериментах при заражении с высокой множественностью бактерии выращивали при хорошей аэрации до плотности  $2,5 \cdot 10^8$  клеток на мл и заражали в соотношении 4:1. Далее инкубировали еще 2,5 часа. Эксперименты по последовательному периодическому выращиванию мутантных бактериофагов проводили, заражая бактерии при той же плотности, но с более длинным периодом роста бактериофага – 6 часов и множественностью 0,1. Очистку бактериофагов контролировали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и масс-спектромерии [28].

*Полимеразную цепную реакцию* проводили в стандартных условиях с использованием праймеров к последовательности ДНК гена *hsc*. Были использованы следующие праймеры: Нос-UP 5'-ТТСТГАТТГАТТСТССГАТТ-3' и Нос-LO 5'-ССАСТТСТТТТГССТГТААГ-3'

**Электрофорез бактериофагов.** Нативные фаговые частицы разделяли электрофорезом в геле 1 % агарозы в буфере 50 мМ Трис рН 8,5, 50 мМ борная кислота в течение 1,5-2 часов при напряженности постоянного электрического поля 10 v на см. Окрашивание проводили 0,25 % кумасси R250 в 5 % уксусной кислоте. Гель инкубировали в красителе 5 часов при 37°C. Отмывку красителя проводили при тех же условиях в 5% уксусной кислоте, оставляя на ночь (примерно 16 часов). При необходимости проводили одну – две смены отмывочного раствора и дополнительную инкубацию еще 8 часов.

**Масс-спектрометрия белков.** Для анализа масс-спектральных белковых профилей на стальную пластинку-мишень послойно наносили равные объемы (0.8 мкл) образца, 70%-ой муравьиной кислоты и раствор матрицы ( $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота [HCCA] в 50%-ном водном растворе ацетонитрила, содержавшем 2.5% трифторуксусной кислоты), каждый слой высушивали на воздухе при комнатной температуре. Спектры регистрировали на приборе “Autoflex Speed” (“Bruker Daltonics”): режим положительных ионов, диапазон масс 2000-20000 Да, время задержки 350 нсек, ускоряющее напряжение 20 кВ. Внешнюю калибровку прибора проводили по смеси белков “Bruker Bacterial Test Standard” (“Bruker Daltonics”); разрешение спектров составило  $\pm 2$  Да (200 ppm). Результирующие спектры каждого препарата штаммов получали суммированием спектров, зарегистрированных в 5–6 точках анализируемых препаратов при 500 ударах лазера. Обработку масс-спектров производили с помощью программных пакетов “Flex analysis 3.3” и “Biotyper 3.0” (“Bruker Daltonics”) [28].



**Результаты.** *Конструирование плазмид для рекомбинации с фаговой ДНК.* Вектор pBSL0+, представляет из себя плазмиду, содержащую репликатор плазмиды pBR322, ген устойчивости к ампициллину, промотор гена 23 фага T4 и присоединенный к нему химически синтезированный ген supF, а также полилинкер с 8 уникальными сайтами узнавания, включающими сайты NdeI и XhoI (9). В этот вектор был проклонирован NdeI-XhoI фрагмент (1230 нуклеотидных пар) с геном hос. Далее по сайту PstI в этот ген был введен маркер устойчивости к канамицину (около 1200 нуклеотидных пар), происходящий из плазмиды pUC4. Эта вставка нарушила непрерывность последовательности нуклеотидов гена hос в районе сайта клонирования (рис.1).

Были получены плазмиды с обеими ориентациями вставки: pNX11K и pNX7K. В дальнейшем в опытах по рекомбинации использовали только плазмиду pNX11K. Направление гена канамицинустойчивости в этой плазмиде совпадало с направлением гена hос, что привело к получению гена длиной 315 кодонов, первый 261 кодон которого происходил из гена hос, а последующие 54 из гена канамицинустойчивости и полилинкера плазмиды pUC4K.

*Получение вставочных мутантов бактериофага T4 по гену hос.* Клетки E. coli MN1 с такой плазмидой, получившей название pNX11K, заражали фагом T4 K10 с множественностью заражения равной 3. Этот фаг содержал амбер-мутации в двух существенных фаговых генах – 38 и 51, а также мутации в несущественных генах denA и denB [26]. Потомство фага высевали на газон клеток E. coli BE и E.coliCR63. Негативные колонии, появившиеся на газоне E. coli BE, рассматривались как "интегранты" – фаги, содержащие интегрированную копию рекомбинантной плазмиды.

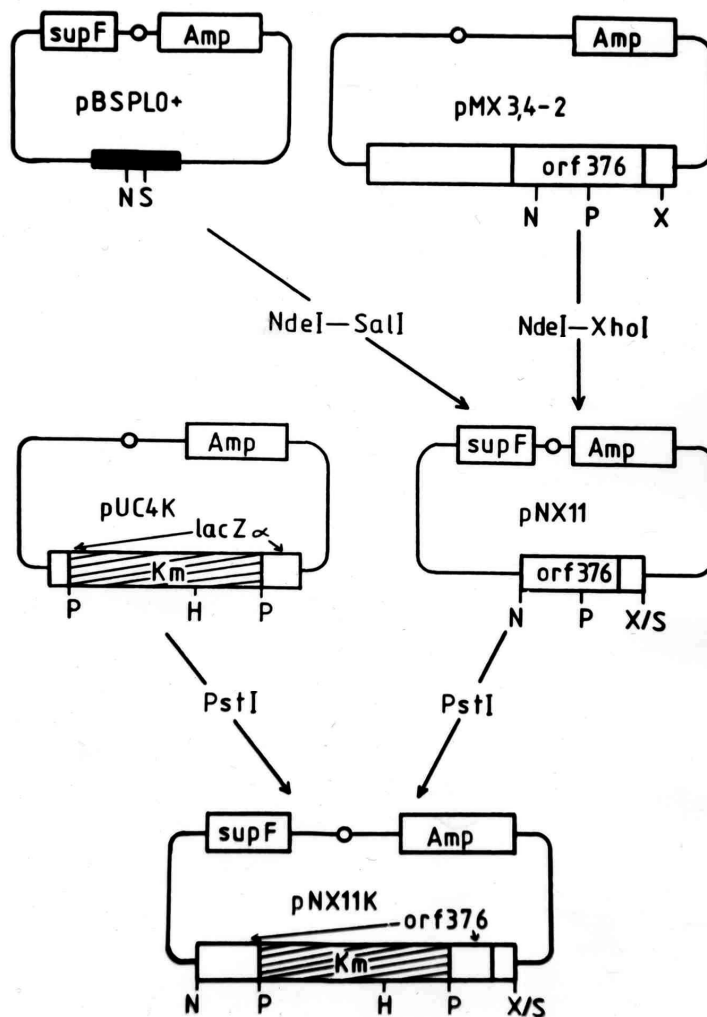


Рис. 1. Схема конструирования плазмиды pNXK11, содержащей детерминанту канамицинрезистентности в структурной части OPC 376 ак.

Буквами латинского алфавита обозначены сайты рестриктаз N – NdeI, P – PstI, S – SalI, X – XhoI, lacZα – делеционный вариант гена lacZ, orf376 – ген hoc, Amp – ген резистентности к ампициллину, Km – ген резистентности к канамицину. pNX11K, pUC4K, pMX3,4-2, pBSPL0+ - плазмиды

Плазмида интегрировалась в хромосому фага T4 K10 за счет рекомбинации между расположенной на плазмиде последовательностью ДНК фага T4 и соответствующей гомологичной последовательностью на хромосоме фага T4. "Интегранты" селектировали на газоне E. coli B за счет цис-супрессии амбер-мутаций фага интегрированной в его геном плазмидой, содержащей ген

supF. Негативные колонии, выросшие на *E. coli* CR 63, представляли весь набор выросших фагов. Отношение фагового титра на *E. coli* BE к титру на *E. coli* CR 63 составляло частоту интеграции. Хотя интегранты составляли только 0,2% от всего потомства фага, их рост на несупрессирующем хозяине позволил осуществить их прямую селекцию. Интегранты выращивались затем в неселективных условиях на *E. coli* CR 63, что позволяло последовательностям вектора и одной из двух копий гена *hoc* исключаться из хромосомы (Рисунок 2).

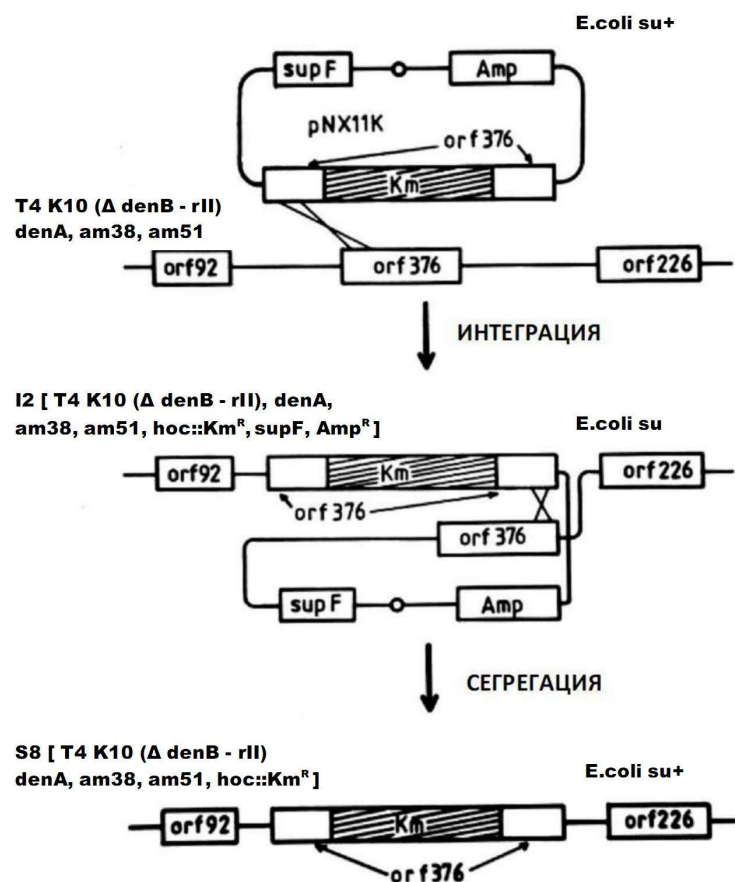


Рис. 2. Схема конструирования бактериофага T4 S8, содержащего ген аминокликозид 3'-фосфотрансферазы в структурной части *orf 376* ак. *orf 92* – дистальная к гену *hoc* рамка трансляции, *orf 226* – проксимальная к гену *hoc* рамка трансляции (*inh*), *orf376* – *hoc*, *supF* – ген супрессорной тРНК, *Amp* – ген резистентности к ампициллину, *Km* – ген резистентности к канамицину, *pNX11K* – плаزمид, использованная для рекомбинации.

При этом остаться внутри генома фага могла как мутантная последовательность, содержащая инсерцию гена канамицин-фосфорибозил трансферазы, так и интактная последовательность. Фаги-сегреганты далее еще раз выращивали на *E.coli*CR63 с целью продолжения процесса сегрегации и исключения плазмиды из их геномов. Затем проводили поиск мутантов по типу вставки с помощью гибридизации ДНК негативных колоний фагов, перенесенных на нейлоновый фильтр с пробой гена устойчивости к канамицину, меченного  $P^{32}$ . Радиоактивный сигнал говорил о наличии комплементарных последовательностей ДНК в хромосоме интегранта I2 и сегреганта S8 (рис. 3).

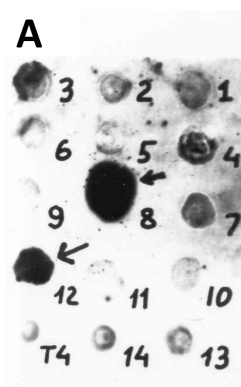


Рис. 3 – ДНК-ДНК гибридизация негативных колоний фагов (интегрантов и сегрегантов) с пробой меченной  $^{32}P$ , приготовленной на фрагменте ДНК, содержащем детерминанту резистентности к канамицину.

Подписи на фильтре: T4 – бактериофаг T4 дикого типа, 1-9 фаги сегреганты, 10 – 14 фаги с инсерцией плазмиды.

*Характеристика мутантного фага S8 и его генома.* Было проведено рестрикционное картирование генома мутантного бактериофага S8. Очищенную ДНК бактериофагов K10 и S8 гидролизовали рестриктазами *EcoRI* и *HindIII* и разделяли электрофорезом. Фрагменты ДНК после блоттинг-переноса гибридизовали с меченной радиоактивным фосфором зондом гена устойчивости к канамицину плазмиды *pUC4K*. Результаты такой гибридизации показаны на рисунке 4. Размер и положение гибридизующихся фрагментов указывает на то, что включение вставки произошло в фрагментов в сайт рестриктазы *PstI* внутри гена *hcs* бактериофага K10. Таким образом нами с исчерпывающей полнотой доказано, что S8 является вставочным мутантом по гену *hcs* бактериофага T4.

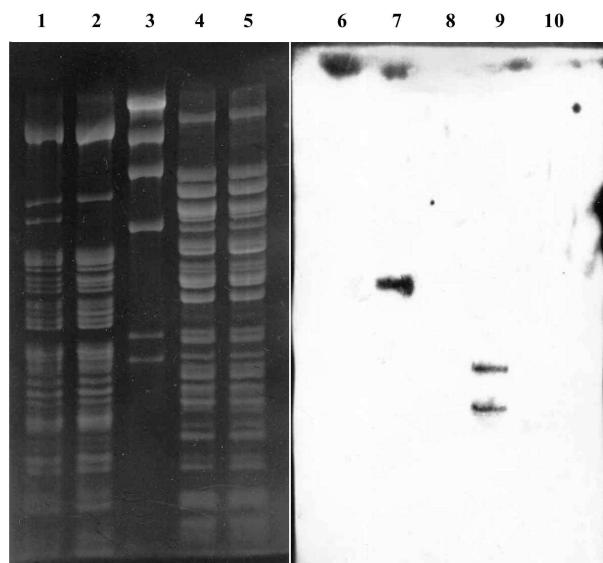


Рис. 4 – ДНК-ДНК гибридизация гидролизатов ДНК фагов Т4К10 (1; 5; 6;10) и Т4К10S8 (2; 4; 7; 9) рестриктазами EcoRI и HindIII с пробой меченной  $^{32}\text{P}$ , приготовленной на фрагменте ДНК, содержащем детерминанту резистентности к канамицину. 3 и 8 – гидролизат ДНК фага лямбда теми же рестриктазами. Слева гель-электрофорез в 1% агарозе, справа флюорограмма нейлонового фильтра после переноса на него гидролизата ДНК и гибридизации

Этот фаг обладал также аномальной подвижностью при электрофорезе, что характерно для нос-мутантов (рис.5).



Рис. 5 – Гель-электрофорез фаговых частиц (агароза 0,9%, напряженность поля 10 V/ см, 2,5 часа); 1 - S8, 2 - T4, 3 - T6, 4 - T2L.

**Получение мутантов по типу вставки на основе бактериофага Т4 дикого типа.** Плазмида рКХ11К, была использована для получения мутантов по гену нос в бактериофаге Т4 дикого типа. Штамм *E.coli* С600, несущий плазмиду рКХ11К, заражали бактериофагом Т4В на чашке Петри в стандартном двуслойном агаре. Далее высевали так, чтобы получалось около  $10^4$  бляшек фага на одну чашку. Полученный урожай фага экстрагировали средой LB и собирали стеклянной пипеткой. Далее фаголизат титровали на этом же штамме бактерий.

Чашки Петри, содержащие порядка  $10^3$  отдельных бляшек были исследованы с помощью гибридизации ДНК на фильтре. Было исследовано 648 бляшек и отобрано 8 бактериофагов, которые дали положительный ответ при гибридизации зондом гена устойчивости к канамицину. Отобранные фаги отсевали и вновь проверяли с помощью гибридизации ДНК. ПЦР-анализ вставки показал, что эти бактериофаги несут вставку аналогичную бактериофагу S8. Один из таких бактериофагов T4hoc1 был использован для дальнейшего исследования. Выращивание фагов проводили при заражении с высокой множественностью, при очистке использовали ПЭГ-600. При этом очистку бактериофагов контролировали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и масс-спектромерии. Результаты контроля очистки представлены на рис. 6 и 7.

*Иммуногенность частиц бактериофагов, мутантных по основному антигену.* Иммунизацию мышей проводили частицами бактериофагов, очищенных в градиенте CsCl и диализованных против физиологического раствора. Каждое животное иммунизировали 50 мкл суспензии нативного бактериофага, содержащей примерно 1 на  $10^{11}$  частиц. Через две недели после первой иммунизации проводили вторую, вводя аналогичное количество бактериофага, и еще через две недели отбирали кровь и получали фаговую антисыворотку. Содержание специфичных к бактериофагу антител определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) используя разрушенные нагреванием и обработкой ДНКазой фаговые частицы в качестве антигена. Данные ИФА представлены в таблице 4 указывают, что инсерционная мутация в гене hoc приводит к снижению иммуногенности целых частиц бактериофага более чем в 10 раз.

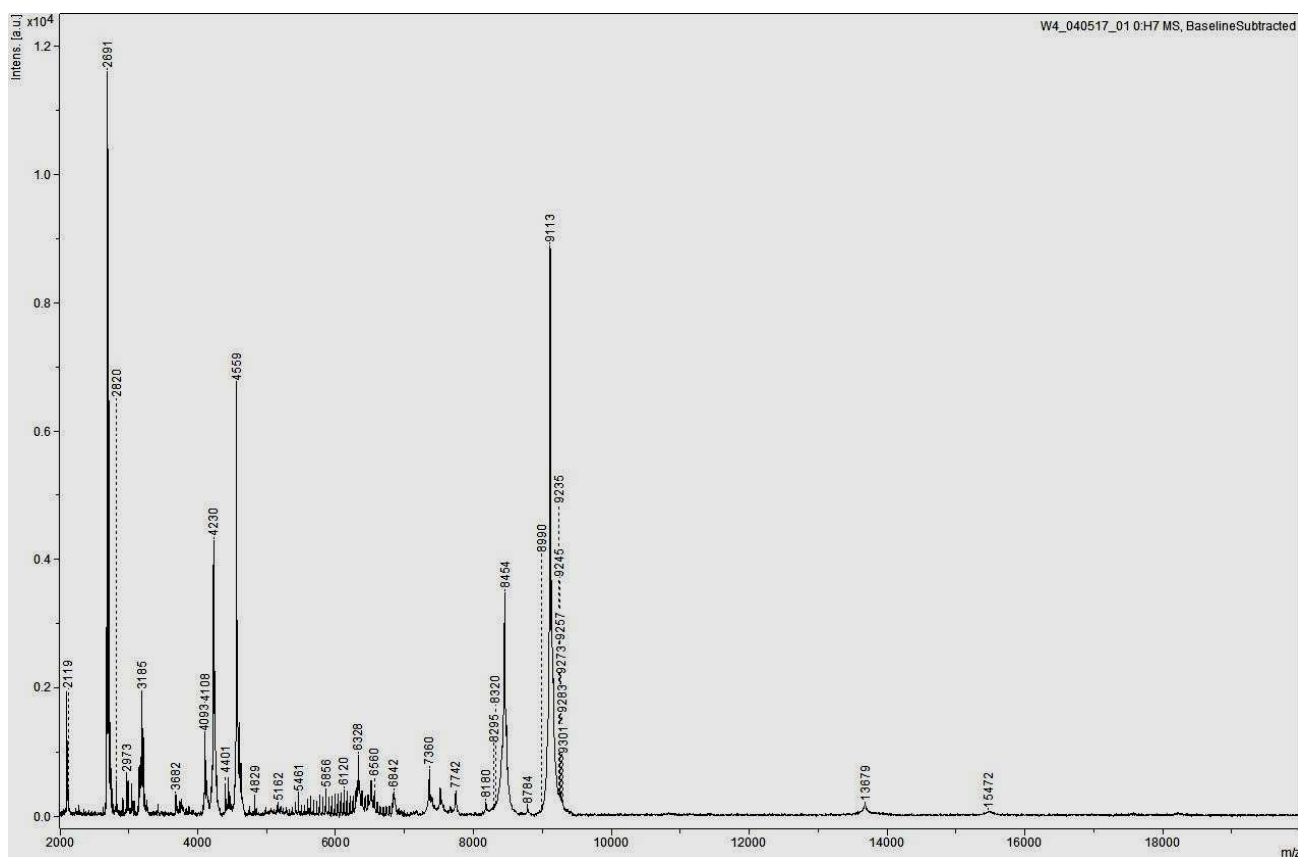


Рисунок 6 – Исследование белков бактериофага T4I нос с помощью масс-спектрометрии

Таблица 4 – Титр антител при иммунизации фагами

Название бактериофага и номер опыта	Титр антител ИФА *100
T4B Опыт1	375
T4B Опыт2	500
K10 Опыт1	500
K10 Опыт2	250
S8 Опыт2	36
S8 Опыт1	23
T4Iнос Опыт1	13
T4Iнос Опыт2	50

**Биотехнологические характеристики и потенциальное применение инсерционных мутантов по гену нос. Урожайность бактериофагов при**

заражении штамма *E.coli* С600 с высокой множественностью обычно была: Т4 – 5-8 на  $10^{10}$ , К10 – 3-4 на  $10^{10}$ , hoc4 – 1-2 на  $10^{10}$ , 1-2 на  $10^{10}$  у бактериофага S8 и и 3-4 на  $10^{10}$  у Т4hoc. То есть полученные инсерционные мутанты обладали хорошей урожайностью, хотя и несколько сниженной по сравнению с родительскими бактериофагами. Восстановление исходного hoc+ фенотипа мы проверили путем 5 последовательных выращиваний мутантных по антигену бактериофагов в перmissive условиях и оценки гетерогенности урожая с помощью электрофореза бактериофагов в агарозном геле. В таком анализе на геле hoc4 мутант образовывал две полосы сравнимые по соответствующие по подвижности, как мутантному бактериофагу, так и бактериофагу дикого типа. В отличие от него мутант S8 образовывал только одну заметную полосу более высокой подвижности. ДНК гибридизация с зондом гена устойчивости к канамицину 461-ной бляшки бактериофага S8, посеянных на двуслойный агар после 5 последовательных выращиваний также не обнаружила фагов, потерявших данный ген. Если учесть, что время одиночного цикла развития бактериофага Т4 при 37°C около 30 минут, то за 6 часов бактериофаг давал около 12 поколений и около 60 поколений за пять последовательных циклов выращивания. Полученные результаты показывают, что за более чем 50 поколений не удастся обнаружить появления бактериофагов дикого типа. То есть с достаточной уверенностью можно предположить, что при применении лекарственных препаратов на основе таких или подобных мутантов бактериофагов Т4-типа повышение антигенности вряд ли можно ожидать.

*Исследование препарата фага Т4hoc методом масс-спектрометрии белков.* Диапазон масс, в котором производилась съемка спектра был от 2000 до 20000 Да, что соответствовало ряду белков частицы данного бактериофага.



Среди белков небольшой массы имеющих отношение к структуре частицы фага Т4 изучены немногие (Таблица 5).

Таблица 5 – Белки небольшой массы, возможные компоненты частицы фага Т4

Название белка фага Т4	Функция	Молекулярная масса по [27]	Пик в спектре близкий по массе
Gr40	Инициатор сборки капсида	13.3	13679
Gr 68	Белок кора проголовки	15.9	15472
Gr 25	Белок клиновидной субъеденицы базальной пластинки	15.1	15472
Gr 31	Шаперон, работающий вместе с GroEL	12.1	13679

Из этих белков только для Gr 25 доказано присутствие в частице, наличие остальных можно только предполагать. Учитывая влияние заряда белка при подвижности в колонне прибора нужно провести очень внимательное изучение с привлечением ряда дополнительных опытов и анализов. На настоящее время ясно, что спектр удастся получить на данном приборе и следовые загрязнения ПЭГ 6000 стали удобным маркером для анализа количества белка относительно других белков частицы. В данной работе мы использовали метод спектрометрии для оценки очистки фаговых препаратов. Исследованию спектров с точки зрения таксономии фагов и целостности фаговых частиц будет посвящена специальная работа. По практике использования данного метода подготовки проб можно говорить, что большая часть белков осталась целыми и пики с спектре соответствовали белкам частицы фага. Использованные методы очистки фага также не могли повлиять на целостность отдельных молекул белков частицы. Уже сейчас можно предположить наличие в данных фаговых частицах низкомолекулярных белков в диапазоне размеров от 2 до 9 КДа. Уже сейчас хочется обратить внимание на наличие пиков с массами: 2691; 2820; 2973; 3185; 3682; 4093; 4108; 4230; 4401; 4559; 6328; 6560; 6842; 7360; 8454; 9113 13679, и

15472 Да. Ряд из этих белков являются мажорными в данном спектре, а именно : 2691, 2820, 4230, 4559, 8454, 9113, 13679, и 15472 Да. Мы пока не можем с уверенностью говорить: принадлежат ли данные пики белкам фага либо специфическими загрязнениям. Но величина пиков позволяет предположить, что данный метод исследования зафиксировал наличие в частице данного фага ряд еще не полностью изученных белков низкой молекулярной массы. При этом надо учитывать заряд этих белков при данном разделении компонентов смеси. Величина заряда также могла повлиять на подвижность и масса некоторых из данных белковых компонентов реально кратно больше, чем определенная данным методом. То есть полученную данным методом массу необходимо умножить на заряд, приобретенный при подготовке пробы. Данные белки могли быть как структурными белками частицы, так и внутренними. Геном бактериофага T4 кодирует большое число пока не определенных рамок трансляции, имеющих хорошие промоторы и сайты связывания рибосомы перед ними. С этой точки зрения ожидать наличие в составе структурной части данной вирусной частицы и внутри ее низкомолекулярных белковых компонентов вполне возможно. Ошибка данного метода в массе белка (цифра над пиком) составляет лишь в +/- 2 Да, что делает масс-спектрометрическое исследование новым мощным инструментом в исследовании вирусных частиц. На спектре видно, что в смеси присутствовал полимер (это характерный набор из пиков в середине спектра). Если посмотреть разницу между массами (например, 5591, 5636, 5680, 5724, 5768 и т.д.) она составит 44 Да, что соответствует звену цепи полиэтиленгликоля. Действительно при очистке нами был использован ПЭГ-6000. В данном исследовании нами было показано, что данный препарат ПЭГ-6000 имеет мажорные пики при загрязнении фагового препарата в районах пиков 6328 и 6560. Остальные пики, соответствующие предположительно данному препарату ПЭГ-6000 распределены между пиками с массой 5162 и 6842.

Это не удивительно. Метод производства и очистки данного препарата ПЭГ6000 не направлен на получение чистого вещества. Можно предположить, что в данном препарате ПЭГ6000 наверняка находятся молекулы с массой от 5500 до 6500 Да. Функциональность их при очистке бактериофагов скорее всего одинаковая. Эти выводы сделаны по следовым количествам препарата ПЭГ6000, оставшегося в препарате фага и конечно требую внимательной проверки с помощью исследования самого ПЭГ600 и препарата фага без него, например очищенного с помощью изопикнического центрифугирования. Данные работы мы сейчас ведем и результаты будут опубликованы в следующих статьях.

*Исследование препарата фага T4Inoc методом трансмиссионной электронной микроскопии.* Очистку бактериофагов из лизатов бактерий осуществляли путем осаждения ПЭГ6000 и ряда дифференциальных центрифугирований. Осадок фага ресуспендировали мягко в течение ночи (16 часов) в физиологическом буфере. Подготовку суспензий бактериофагов для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) проводили путем осаждения фаговых частиц на формваровую пленку-подложку. Далее обрабатывали 1% раствором уранилацетата производства SERVA, Germany (Германия). Стандартный вид суспензии при увеличении в 50000 раз представлен на рисунке 7.

**Обсуждение.** Мутанты бактериофага T4 по основному антигену капсида были получены путем вставочного мутагенеза. Исследование их свойств показало, что исключение данной вставки в геном бактериофага не обнаруживается, то есть реверсия фенотипа к исходному происходит реже чем у соответствующих нонсен-мутантов. Данные фаги дают хороший урожай при стандартных лабораторных условиях и могут быть легко выращены.

Титр антител к бактериофагу при иммунизации таким мутантом снижен более чем в десять раз.



Рисунок 7 – Электронная микроскопия препарата фага T4Hos. x50000. Масштабная линейка 100 нм. Контрастирование 1% уранилацетатом

Такие бактериофаги могут рассматриваться как претенденты на их использование для вторичного применения в фаготерапии, когда на первом этапе уже были применены родственные бактериофаги. Аналогичный метод либо вставочного, либо делеционного мутагенеза за счет *in vivo* рекомбинации с соответствующими плазмидными конструкциями сделанными *in vitro* может быть применен и для получения мутантов по этому гену других родственных T4 бактериофагов. В том числе, учитывая сходство нуклеотидных последовательностей бактериофагов T4-типа могут использоваться и конструкции, полученные в ходе этой работы, и аналогичные. Подобным путем могут быть получены вставочные мутанты из бактериофагов, близко родственных бактериофагу T4. Преимущество вставки над точечной мутацией или делецией заключается в простоте отбора таких мутантов за счет гибридизации с зондом на основе ДНК вставки. Ген устойчивости к канамицину при этом может быть заменен на какой-либо другой фрагмент ДНК.

В последние годы был обнаружен новый терапевтический неантимикробный эффект бактериофагов T4-типа. Было показано, что введение бактериофага T4 в кровь лабораторных животных приводит в анти-опухолевому эффекту. При этом оказалось, что данный эффект связан с

наличием белка, продукта гена *hoc*, на поверхности бактериофага. Нонсен-мутант бактериофага Т4 по этому гену и бактериофаг Т2Н, не несущие на своей поверхности этот белок, обладали большей антиметастазной активностью, чем бактериофаг Т4 дикого типа [29]. Как было показано ранее и перепроверено в данной работе *hoc*-мутанты дают немного меньший урожай при выращивании в перmissive условиях, что приводит к накоплению ревертантов такой амбер-мутации после нескольких последовательных выращиваний. С этой точки зрения введение вставки или делеции в данный ген может иметь существенные преимущества при приготовлении лекарственных препаратов на основе таких бактериофагов.

Дальнейшее усовершенствование бактериофагов Т4-типа для их применения в качестве лекарственных средств, вводимых в кровь, может быть направлено на получение бактериофагов долго циркулирующих в лабораторных животных по аналогии с подобными опытами, проведенными для бактериофага лямбда.

### **Выводы.**

1. В данной работе показана возможность внедрения протяженной последовательности ДНК в ген *hoc* бактериофага Т4, исследована генетическая стабильность подобных конструкций в периодическом выращивании более чем в 50 поколениях.

2. Показано, что инсерционные мутанты по гену *hoc* обладают сниженной антигенностью за счет потери наружного белка капсида фага, продукта этого гена, но обладают высокими биотехнологическими показателями при выращивании, при контроле чистоты препаратов с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и являются перспективными штаммами фага Т4 для их включения в антибактериальные препараты, для применения в медицине или ветеринарии.

3. Успешно опробован метод исследования белков препаратов бактериофагов Т4-типа с помощью масс-спектрометрии. На примере минимального загрязнения ПЭГ600 в процессе очистки фагов из фагового лизата бактерий показана возможность контроля загрязнений.

4. Суммируя: предложен метод получения бактериофагов со сниженной антигенностью из различных изолятов бактериофагов, родственных Т4, широко применяемых в фаговой терапии человека и сельскохозяйственных животных.

Авторы благодарят К. Крузера и И. Мессинга за штаммы бактерий, фагов и препараты плазмид, любезно предоставленные для выполнения данного исследования. Авторы благодарят В.И. Танышина за плодотворное обсуждение работы.

#### Список литературы

1. Krylov V., Shaburova O., Pleteneva E., et al. Selection of phages and conditions for the safe phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections // *Virol Sin.* – 2015. – Т. 30 - №1. – С. 33-44.
2. Abedon ST, García P, Mullany P, Aminov R. Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future // *Front Microbiol.* – 2017. – Т.15. – №8 – С.981.
3. Krylov V.N. Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: long-term prospects for use in phage therapy // *Adv Virus Res.* – 2014. – Т.88. – С. 227-78.
4. Taniashin V.I., Zimin A.A., Shliapnikov M.G. et. al. Transduction of plasmid antibiotic resistance determinants with pseudo-T-even bacteriophages // *Genetika.* – 2003. – Т. 39. – №7 – С.914-26.
5. Tanyashin V.I., Zimin A.A., Boronin A.M. The cotransduction of pET system plasmids by mutants of T4 and RB43 bacteriophages // *Microbiology (Mikrobiologiya).* – 2003. – Т.72. – № 6. – С. 694-700.
6. Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T, Ruger W. Bacteriophage T4 genome // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2003. – Т.67. – №1. – С. 86-156.
7. Franklin NC. Serological study of tail structure and function in coliphages T2 and T4 // *Virology.* – 1961. – Т.14. – С.417-29.
8. Watanabe I. The effect of ultraviolet light on the production of bacterial virus protein // *J Gen Physiol.* – 1957. – Т.20. – №40(4). – С.521-31.
9. Jerne NK. The presence in normal serum of specific antibody against bacteriophage T4 and its increase during the earliest stages of immunization // *J. Immunol.* – 1956 – Т.76. – № 3. – С. 209-16.
10. Barry GT. A study of the antigenicity of T3 and T4 coli-dysentery bacteriophages during the vegetative stage of development // *J Exp Med.* – 1954. – Т.1. – №100(2) – С.163-80.
11. Leiman PG, Kanamaru S, Mesyanzhinov VV, et al. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4 // *Cell Mol Life Sci.* – 2003. – Т.60. – № 11. – С. 2356-2370.

12. Ishii T., Yanagida M. Molecular organization of the shell of the T-even bacteriophage head //J.Mol.Biol., - 1975. – Т.97. – №4. – С. 655-660.
13. Ishii T., Yanagida M., The two dispensable structural proteins (soc and hoc) of the T4 phage capsid; their purification and properties, isolation and characterization of the defective mutants, and their binding with the defective heads in vitro //J.Mol.Biol. – 1977. – Т.109. – №4. – С. 487-514.
14. Ishii T., Yamaguchi Y., Yanagida M. Binding of the structural protein soc to the head shell of bacteriophage T4 //J.Mol.Biol., – 1978. – Т.120. – №4. – С. 533-544.
15. Yamaguchi Y., Yanagida M., Head shell protein hoc alters the surface charge of bacteriophage T4. Composite slab gel electrophoresis of phage T4 and related particles //J.Mol.Biol. – 1980. – Т.141. – №2. – С.175-193.
16. Childs JD. Effect of hoc protein on the electrophoretic mobility of intact bacteriophage T4D particles in polyacrylamide gel electrophoresis //J Mol Biol. – 1980. – Т. 141. – №2. – С.163-73.
17. Yanagida M, Suzuki Y, Toda T. Molecular organization of the head of bacteriophage T-even: underlying design principles //Adv Biophys. – 1984. – №17. – С.97-146.
18. Chibani-Chennoufi S., Sidoti J., Bruttin A. et al. Isolation of Escherichia coli bacteriophages from the stool of pediatric diarrhea patients in Bangladesh //Journal of bacteriology. – 2004. – Т. 186. – №. 24. – С. 8287-8294.
19. Tétart F., Desplats C., Kutateladze M. et al. Phylogeny of the major head and tail genes of the wide-ranging T4-type bacteriophages //Journal of Bacteriology. – 2001. – Т. 183. – №. 1. – С. 358-366.
20. Sarker SA, McCallin S, Barretto C et al. Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh //Virology. – 2012. – Т. 434. – №. 2. – С. 222-232.
21. Kaliman AV, Khasanova MA, Kryukov VM, Tanyashin VI, Bayev AA. The nucleotide sequence of the region of bacteriophage T4 inh(lip)-hoc genes // Nucleic Acids Res. – 1990. – Т.25. – №18(14). – С.4277.
22. Vieira J, Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers //Gene. – 1982. – Т.19. – №3. – С. 259-68.
23. Appleyard, RK et al. (1956) Mutation to extended host range and the occurrence of phenotypic mixing in the temperate coliphage lambda // Virology -№2. – С. 565-74.
24. Appleyard, RK (1954) Segregation of New Lysogenic Types during Growth of a Doubly Lysogenic Strain Derived from Escherichia Coli K12 //Genetics. – №39. – С.440-52.
25. Berlyn, M.K.B. (1996). In F.C. Niedhardt et al. (Ed.), Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology, (2nd ed.), Vol. 2, (pp. 1715-1902).
26. Selick HE, Kreuzer KN, Alberts BM. The bacteriophage T4 insertion/substitution vector system. A method for introducing site-specific mutations into the viruschromosome //J Biol Chem. – 1988. – Т. 263. – №23. – С.11336-47.
27. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
28. De Bruyne K., Slabbinck B., Waegeman W., et al. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning //Systematic Appl. Microbiol. – 2011. – Т.34. – №1 – С. 20-29.
29. Dabrowska K, Switała-Jeleń K, Opolski A, Górski A. Possible association between phages, Hoc protein, and the immune system //Arch Virol. -2006. – Т.151. – №2. – С. 209-215.