

# ГОМОЛОГИ ОСНОВНОГО АНТИГЕНА ФАГА RB30 ИЗ МЕТАГЕНОМА МОРСКОЙ ПЛАНКТОНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОТЫ

Зимин А.А.<sup>1</sup>, Дроздов А.Л.<sup>2</sup>

1 - Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской Академии Наук»,

г. Пушкино, Российская Федерация, dr.zimin8@yandex.ru

2 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток

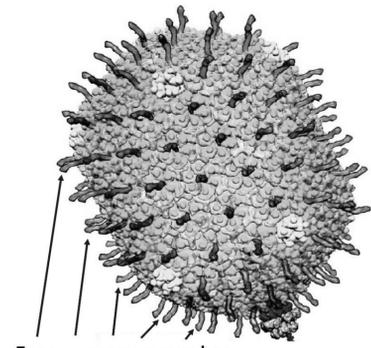


Рис. 3. Структурная модель капсида бактериофага Т4  
Модифицировано из Shylaja Hegde et al. J. Virol. 2012; 86: 4046-4057

Белок – продукт гена нос – основной антиген фага Т4  
~ 150 копий на вирус

## Введение

Метагеномика океана является источником новых последовательностей самых разных белков. Поиск гомологов среди метагеномных последовательностей – это метод, позволяющий шире взглянуть на конкретное семейство белков, а также найти аминокислотные последовательности с конкретными прикладными целями. В данной работе мы решили провести в метагеноме планктонической микробиоты океана поиск последовательностей, сходных с полным невырожденным повтором PKD – иммуноглобулинподобного домена у Ca<sup>2+</sup> - связывающего декорирующего белка капсида бактериофага RB30 [1-3]. Основной идеей работы было предположение о том, что такой повтор мог иметь большую аффинность к связыванию олиго- и полисахаридов у белков морской микробиоты и его можно использовать для повышения производительности бактериофаговой терапии в марикультуре после доработки фаговых лечебных агентов путем геномной инженерии. Одновременно данный белок капсида Т4-фагов интересен тем, что является носителем в фаговом дисплее, что мы показали ранее при создании вакцин и диагностикумов нового поколения [3]. Мы проводим подобные исследования океанических метагеномов на регулярной основе с 2012 года, и наиболее интересные результаты были получены для РНК-лигазы 2 и DenV фага Т4 [5,6].

## Цели и задачи работы

В задачу данной работы входил поиск в метагеноме морской планктонической микробиоты гомологов основного антигена бактериофага фага RB30, близкородственного Т4, но отличающегося по структуре основного антигена (Рис.1. и Рис.3.), и эволюционное исследование найденных последовательностей с целью характеристики их распространения в океанической микробиоте.

## Методы

Сравнение аминокислотной последовательности основного антигена фага RB30 [1,2], с базами данных белковых последовательностей из метагеномов планктонической микробиоты океана на сервере NCBI проводили с помощью алгоритма PSI-BLAST [7], используя четыре последовательные итерации. То есть до тех пор пока картина сходства последовательностей не становилась константной. Нами было введено ограничение на уровень достоверности результатов - E-value < 2e-11. Найденные последовательности с более высоким уровнем достоверности использовали для последующего филогенетического исследования. Найденные последовательности сохраняли в виде текстового файла, содержащего полные аминокислотные последовательности белков-аналогов. На основе полученных данных был осуществлен филогенетический анализ. Для этого предварительно были проведены выравнивания последовательностей с помощью программы MUSKLE, филогенетическое дерево строилось с помощью пакета программ MegaB [8]. Длина основного антигена фага RB30 472 аминокислотных остатка. Программные средства пакета MegaB, в отличие от алгоритма PSI-BLAST, ограничены в своих возможностях при анализе последовательностей значительно более коротких, чем основной объект сравнения. Поэтому ряд найденных в базах данных последовательностей аминокислот гомологов пришлось убрать из рассмотрения.

### Структурная организация белка НОС

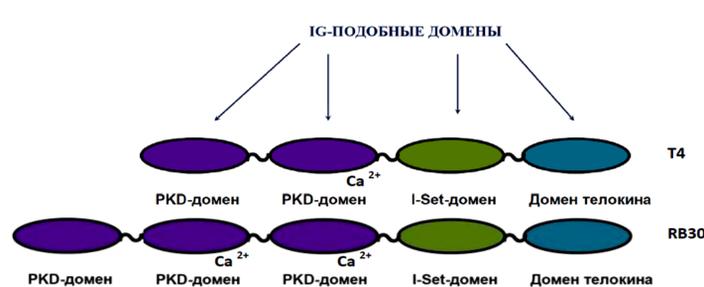
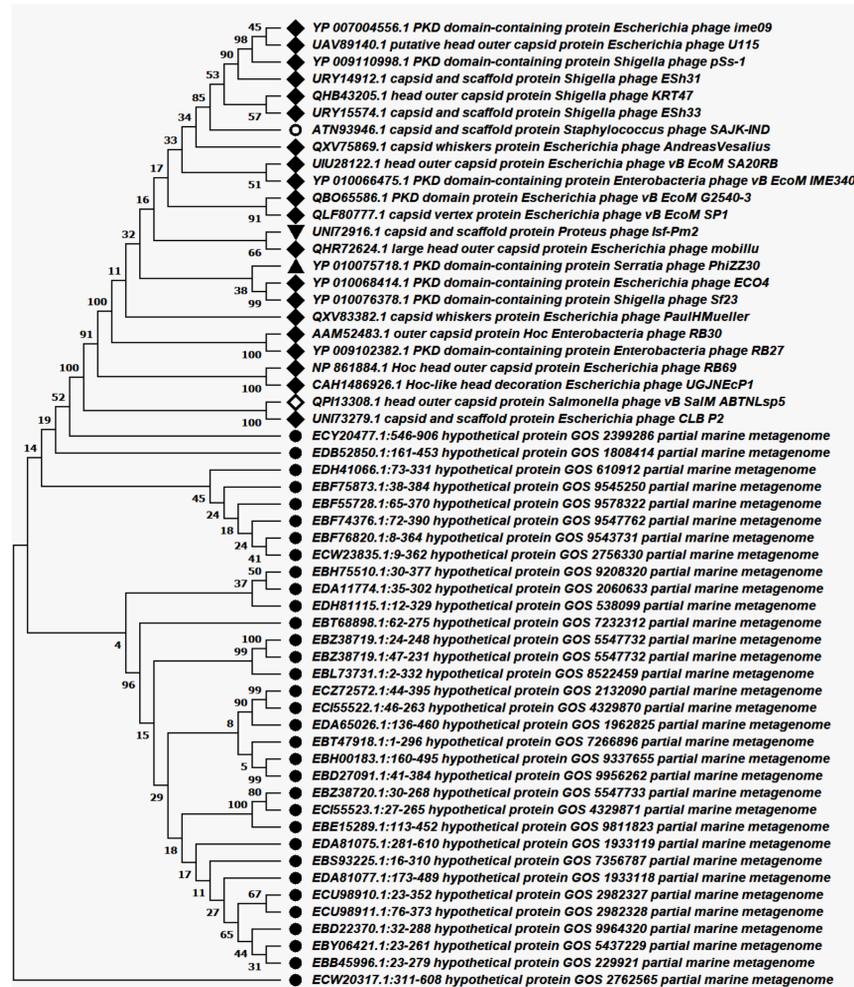


Рис. 1. Схема структурной организации Нос – белков (от англ. Highly antigenic Outer Capsid protein) бактериофагов Т4 и RB30. Видна дубликация второго Ca<sup>2+</sup> - зависимого PKD – домена у Нос бактериофага RB30.

## Результаты



## Рис.2. Филогенетический анализ гомологов основного антигена фага RB30 из метагенома морской микробиоты

Аминокислотная последовательность Нос – белка бактериофагов энтеробактерий, родственных Т4 отмечены черными ромбами, сальмонеллы – белым ромбом, фага протея - треугольником с широкой стороной сверху, сарацин – треугольником с широкой стороной внизу, стафилококка – белым кружком, GOS – последовательности отмечены черными кружками.

Мы провели поиск гомологов белка Нос-RB30 среди аминокислотных последовательностей в метагеноме Global Ocean Sampling, полученном в результате секвенирования ДНК из проб планктонической микробиоты Атлантического и Тихого океанов в области экватора. Было найдено 42 гомолога со статистическим порогом E ниже или равно 0,004. Для изучения эволюционной близости найденных гомологов к белкам Нос различных Т4-бактериофагов мы провели сравнительный филогенетический анализ как найденных гомологов, так и Нос-белков длиной 472 аминокислоты из геномов различных Т4-подобных бактериофагов. Эволюционная история в виде филогенетического дерева была выведена с использованием метода максимальной экономии. Было получено самое экономичное дерево длиной = 2581. Индекс согласованности этого дерева составил 0,604061, индекс удержания - 0,840766 и составной индекс был равен - 0,510454. Устойчивость этого дерева было проверена в статистическом бутстреп-тесте путем 1000 повторов. МР-дерево было получено с использованием алгоритма Tree-Bisection-Regrafting, в котором исходные деревья были получены путем случайного добавления последовательностей путем 10 повторов этого анализа. В этом анализе участвовало 57 аминокислотных последовательностей гомологов белка Нос бактериофага RB30. Эволюционные анализы проводились в пакете программных средств MEGA X (Рис.2.).

**Обсуждение.** Последовательность GOS 2762565 образует отдельную ветвь и укореняет полученное эволюционное дерево. Остальная часть дерева состоит из двух ветвей. Одна из этих ветвей содержит только последовательности из метагенома микробиоты океана, полученном К.Вентером и коллегами в ходе сбора проб в экваториальной части мирового океана в экспедициях Sorser I и Sorser II. Другая ветвь образована как фаговыми, так и океаническими белками. При этом лишь 8 последовательностей из метагенома Global Ocean Sampling расположились на той же ветви филогенетического дерева, что и последовательности декорирующих белков бактериофагов Т4 типа. Это последовательности: GOS 2399286, GOS 1808414, GOS 610912, GOS 9545250, GOS 9578322, GOS 9547762, GOS 9543731, GOS 2756330, которые образовали три подветви. Две первые из этого списка образовали отдельные подветви. Эти восемь последовательностей проявили наибольшее сходство с четырьмя функциональными доменами белка Нос бактериофага RB30. Можно предположить, что они могут иметь сходные функции, и даже сходную аффинность к лигандам, характерным для морских биотопов.

## Заключение

1. С помощью программного средства Psi-BLAST мы обнаружили в метагеноме Global Ocean Sampling, 42 гомолога высокоантигенного декорирующего капсида белка Нос бактериофага RB30.  
2. Анализ сходства этих океанических последовательностей с последовательностями гомологов Нос RB30 у бактериофагов подсемейства Tevenvirinae с помощью множественного наложения средством ClustalW и путем построения филогенетического дерева с использованием метода Maximum Parsimony показал, что к наиболее близким к фаговым антигенам могут быть отнесены только восемь из них, а именно : GOS 2399286, GOS 1808414, GOS 610912, GOS 9545250, GOS 9578322, GOS 9547762, GOS 9543731, GOS 2756330.  
3. Выявлены специфические белковые последовательности, которые могут быть использованы для активации бактериофагов суши для повышения их терапевтического эффекта при антибактериальной обработке марикультуры. Так как лишь примерно четверть генов являются существенными для развития бактериофагов Т4-типа [9], то все эти 8 последовательностей могут быть с помощью мультиплексного геномного редактирования [10] экспонированы на поверхности капсида бактериофагов любой специфичности к бактерии-хозяину, и могут быть обеспечивать аккумуляцию бактериофагов в различных морских биотопах.

## Благодарности

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

## Литература

- Зимин А.А., Микулинская Г.В., Нигматуллина Л.Ф., Назипова Н.Н. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей отдельных доменов белков Нос бактериофагов подсемейства Teequatrovirinae. Математическая биология и биоинформатика. Том 7, номер 2, 2012 г., стр. 611–631.
- Zimin A.A., Mikoulskaia G.V., Nigmatullina L.F., Nazipova N.N. Comparative Analysis of Amino Acid Sequences in Particular Domains of Hoc Proteins in Teequatrovirinae Subfamily Bacteriophages. Mathematical Biology and Bioinformatics 2018. V. 13. No S. P. t39-t58. doi: 10.17537/2018.13.t39.
- Zimin, A.A. and Mikoulskaia, G.V. 2002, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAM52483.1>
- Зимин А.А., Калиман А.В., Шляпников М.Г., Кадыров Ф.А., Крюков В.М., Рубцов П.М., Танышин В.И., Баев А. А. Конструирование универсального метода селекции белков с измененной способностью к связыванию с помощью бактериофагов экспонирующих гормон роста на поверхности своего капсида., 1994, Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 4, 9-10.
- Zimin A.A., Nikulin N.A., Nazipova N.N. Homologs of Bacteriophage T4 RNA Ligase 2 in Metagenomes of Ocean Microbiota. Mathematical Biology and Bioinformatics, 2020. V. 15. № Suppl. P. t88-t108.
- Karmanova A.N., Zimin A.A. Oceanic evolution of the enzyme repairing the UV-induced DNA lesions. Journal of Physics: Conference Series, Volume 1701 (2020) 012022, doi:10.1088/1742-6596/1701/1/012022
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 2013. V. 30. P. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Nikulin, N.A., Zimin, A.A. Influence of Non-canonical DNA Bases on the Genomic Diversity of Tevenvirinae. Front. Microbiol., 2021 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.632686>
- Yawei Zhao, Jinzhong Tian, Guosong Zheng, Jun Chen, Chuanwen Sun, Zhongyi Yang, Andrei A. Zimin, Weihong Jiang, Zixin Deng, Zhijun Wang and Yinhua Lu. Multiplex genome editing using a dCas9-cytidine deaminase fusion in Streptomyces. Sci China Life Sci. 2020 Jul;63(7):1053-1062. doi: 10.1007/s11427-019-1559-y.