

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.06.082>

УДК 578.4:578.81:579.842.1/2

М.А. Златогурская¹, Ф.И. Товкач²

¹ Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова

² Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

E-mail: zlatohurska@gmail.com

Геномика и структура вирионных ДНК умеренных эрвиниофагов 49 и 59

Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Ф.И. Товкачем

Проведено сравнительное изучение вирионной ДНК эрвиниофагов 49 и 59 с применением биоинформатического анализа и стандартной рестрикции. Установлено, что геномы обоих фагов циклически пермутированные, однако пермутация ДНК фага 59 является непрерывной, в то время как у фага 49 она носит дискретный характер. Вирионная ДНК фага 49 имеет аномальный SmaI-сайт, который, в отличие от остальных сайтов для эндонуклеазы SmaI, не подвергается полному гидролизу, что, скорее всего, связано с влиянием ближайшего нуклеотидного окружения.

Ключові слова: бактериофаги 49 и 59, рестрикционный анализ, биоинформатический анализ, headful-механизм упаковки, циклическая и дискретная пермутация.

Ввиду стремительного развития технологий секвенирования анализ первичной последовательности геномов становится незаменимым для современной классификации вирусов прокариот, понимания их эволюции и молекулярных основ фаговой физиологии, а также характера их взаимодействия с бактериями-хозяевами [1]. Однако традиционные методы секвенирования не позволяют установить такие аспекты структурной организации молекулы ДНК бактериофага, как природа концевых последовательностей, наличие и характер пермутации, метилирование нуклеотидов [2]. В связи с этим изучение вирионной ДНК требует комбинации различных подходов и методов исследования.

Автономные генетические элементы и особенно вирусы бактерий рода *Erwinia* описываются редко, а информация о их свойствах является крайне ограниченной, несмотря на огромную практическую значимость этих фитопатогенных бактерий.

Ранее были обнаружены три эрвиниофага — 49, 59 и E105. Два из них, 49 и 59, представляют собой умеренные фаги, способные лизировать и лизогенизировать клетки фитопатогенной бактерии *Erwinia "horticola"* [3]. Последующие исследования показали, что их геномы характеризуются значительной степенью гомологии, относящейся в основном к структурным полипептидам капсида и хвостового отростка [4]. Для вирионной ДНК фага

59 был установлен непрерывный характер кольцевой перестановки нуклеотидов и концевая избыточность в 2,2 %. Геном фага 49 предположительно является циклически пермутированным и его пермутация, скорее всего, имеет дискретный характер [4, 5]. При анализе первичной последовательности ДНК нам не удалось получить подтверждение этим фактам.

В связи с вышеизложенным цель исследования состояла в изучении структуры вирионной ДНК, а также осуществлении предварительного сравнения геномов эрвиниофагов 49 и 59 на основе данных геномики и рестрикционного анализа.

В исследовании использовали ДНК умеренных бактериофагов 49 и 59 *E. "horticla"*. Выделение ДНК и рестрикционный анализ проведены на основе схемы, описанной в работе [4]. Применяли следующие эндонуклеазы рестрикции: *HpaI*, *EcoRI*, *SmaI*, *SalI*, *KpnI*, *XhoI*, *DraI* и *BglII*.

Первичная последовательность генома установлена с использованием технологии Illumina Solexa. Анализ и визуализация данных секвенирования осуществлялись с помощью следующих программ: анализ ГЦ-состава нуклеотидных последовательностей — DNA/RNA GC Content Calculator, поиск открытых рамок считывания — GLIMMER, GeneMark.hmm 2.0, поиск сайтов рестрикции — A plasmid editor, попарное выравнивание нуклеотидных последовательностей геномов — mVista, CG view, поиск тРНК — tRNAscan-SE, ARAGORN, дот-плот сравнение геномов — PipeAlign. Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей относительно референтных геномов, генов и аминокислот баз NCBI проводилось с помощью инструментов BLASTn и BLASTp

Исходя из предварительного биоинформатического анализа ДНК, фаг 49 имеет геном размером 46,8 тыс. п. н., для фага 59 этот показатель составляет 48,1 тыс. п. н., что хорошо согласуется с данными предыдущих исследований [4]. Содержание ГЦ-пар является приблизительно одинаковым для обоих вирусов и равно около 50 % (таблица). В геноме фага 49 выявлено 84 открытых рамок считывания, что на одну рамку считывания меньше, чем в геноме фага 59. Количество обнаруженных гипотетических полипептидов составляет 60 и 66 для фага 49 и 59 соответственно.

При сравнении нуклеотидных и аминокислотных последовательностей не удалось установить наличие гомологичных последовательностей фагов 49, 59 и геномов референтных

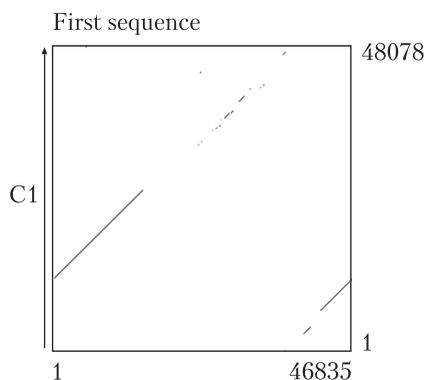


Рис. 1. Выравнивание последовательностей генома бактериофага 49 к геному фага 59

Сравнение характеристик геномов фагов 49 и 59

Характеристика	Фаг	
	49	59
Размер генома, т. п. н.	46,8	48,1
ГЦ-состав, %	50,8	50,5
Открытые рамки считывания	84	85
Гипотетические полипептиды	60	66
тРНК	—	тРНК ^{arg}

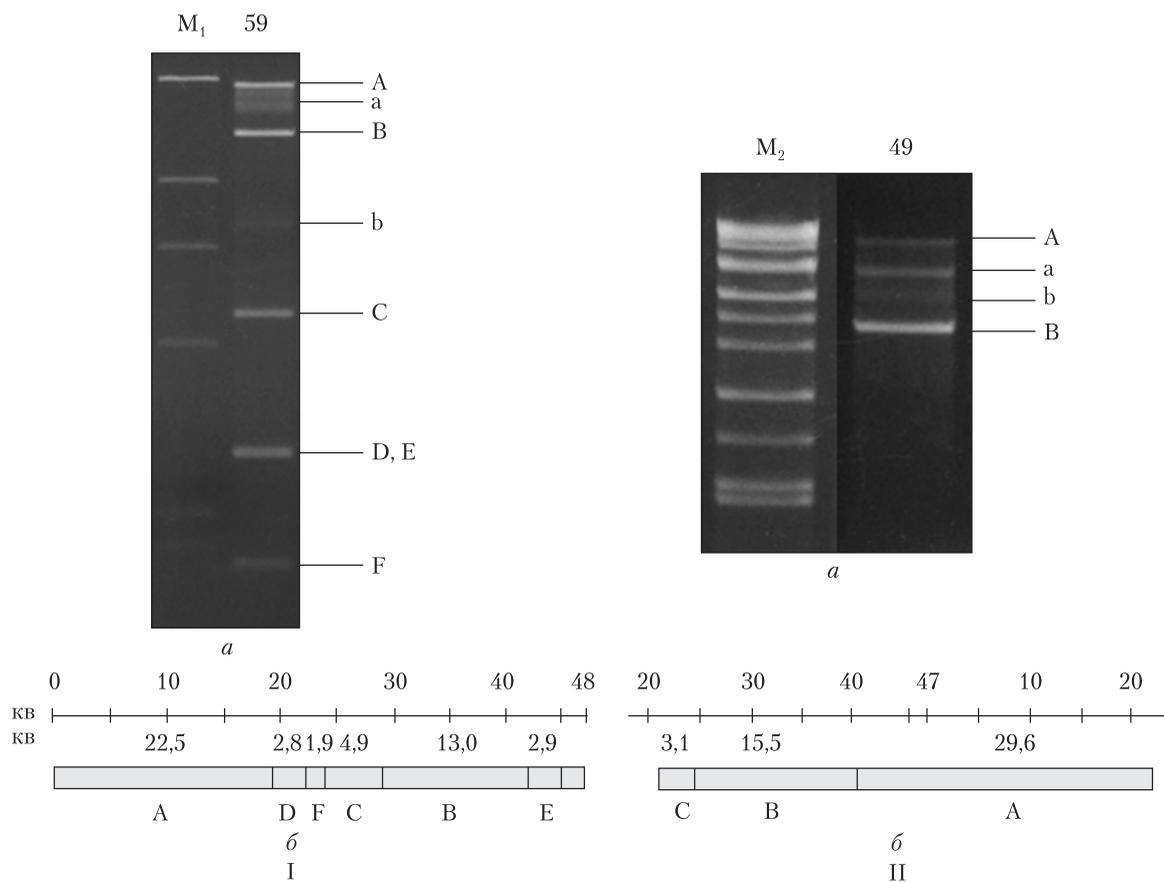


Рис. 2. I: *a* – *Sma*I-гидролиз вирионной ДНК фага 59. M_1 – *Hind*III фрагменты ДНК бактериофага λ ; *b* – *Sma*I-сайты в геномной ДНК фага 59. II: *a* – *Kpn*I-гидролиз вирионной ДНК фага 49. M_2 – λ Mix Marker, 19 (“Fermentas”, США); *b* – *Kpn*I-сайты в геномной ДНК фага 49. *a*, *b* – дополнительные фрагменты

бактериофагов, представленных в базе данных NCBI. В то же время между собой эрвиниофаги показали 47 % гомологии первичной последовательности нуклеотидов (рис. 1). Этот факт также согласуется с данными предыдущих исследований, в которых с помощью блот-гибридизации установлено 50 % гомологии ДНК этих фагов [6]. При сравнении геномов эрвиниофагов обнаружено 30 идентичных генов, которые, скорее всего, кодируют структурные белки головки и некоторые регуляторные полипептиды. У обоих фагов кодирующими являются как плюс-, так и минус-цепь. Кроме того, ДНК фага 59 несет ген тРНК, кодирующий аргинин.

Были подтверждены данные предыдущих исследований относительно циклической пермутации вирионной ДНК бактериофагов 49 и 59 [4, 5]. Наличие дополнительных фрагментов в гидролизной смеси было характерным для вирионных ДНК и отличало их от таковых, полученных *in silico* (рис. 2). Мы предположили, что гетерогенный фрагмент “а” и субмолярный фрагмент “b” при *Sma*I-гидролизе вирионной ДНК фага 59 происходит от гетерогенных концов молекул ДНК и рас-сайта (см. рис. 2, I, *a*). Такой рестрикционный профиль указывает на непрерывный характер пермутации генома фага 59, а также упаковку вирионной ДНК по headful-механизму [4]. Эрвиниофаг 49, очевидно, упаковывает ДНК по

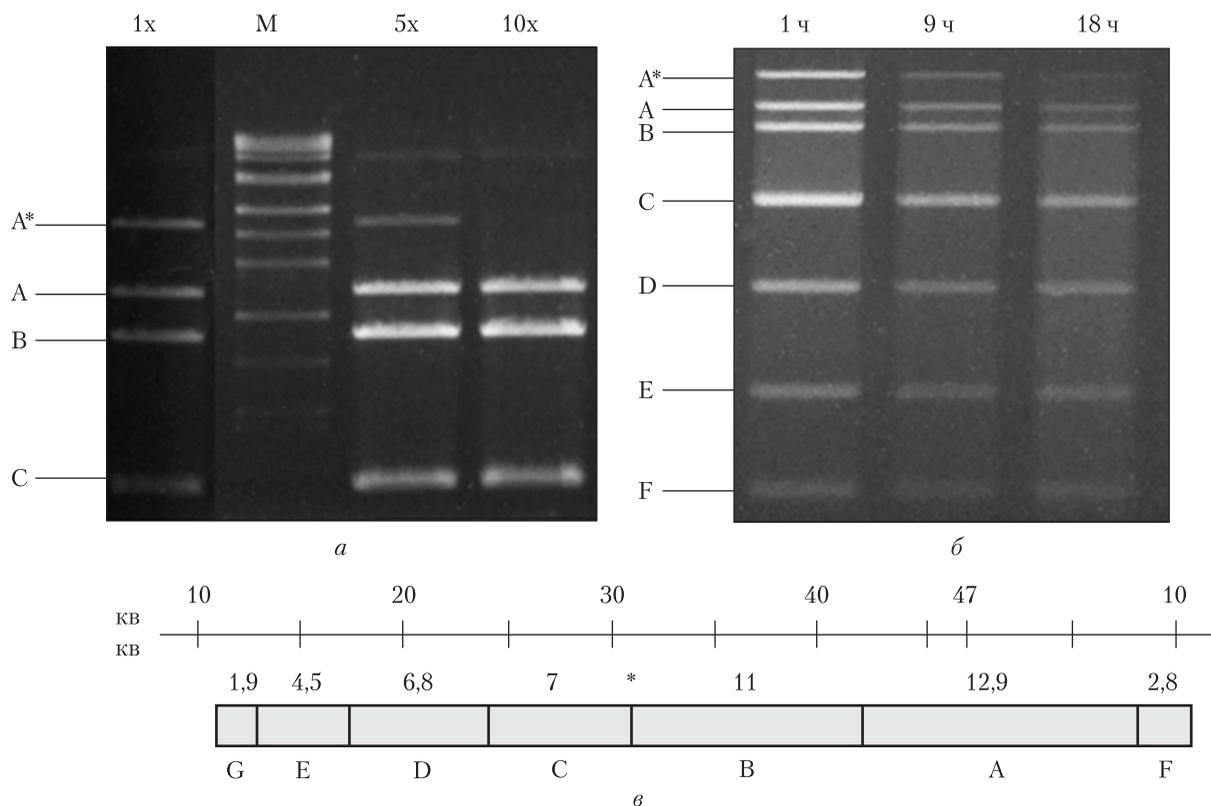


Рис. 3. Влияние концентрации фермента (*а*) и элонгации инкубации (*б*) на *SmaI*-рестрикционный патерн вирионной ДНК фага 49. *A** – “аномальный” фрагмент. *в* – *SmaI*-сайты рестрикции геномной ДНК фага 49; * – “аномальный” сайт

аналогичной схеме, однако пермутация его генома имеет дискретный характер. Об этом свидетельствует как отсутствие гетерогенных концевых фрагментов, так и наличие двух субмолярных фрагментов “а” и “б” при *KpnI*-гидролизе (см. рис. 2, II, *а*).

Еще один “аномальный” фрагмент обнаружен при электрофоретическом разделении продуктов двойного гидролиза ДНК фага 49 эндонуклеазами *KpnI* и *XhoI*. Так как данный субмолярный фрагмент размером 11 тыс. п. н. не исчезал при увеличении концентрации рестриктаз, он, скорее всего, является рас-фрагментом, образованным ДНК паказой и рестриктазой. Аналогично фагу 59 аномальные фрагменты также не обнаруживались при изучении первичной последовательности нуклеотидов геномной ДНК фага 49, полученной традиционным методом секвенирования.

В ДНК фага 49 выявлен необычный сайт, который в стандартных условиях не подвергался полному расщеплению рестриктазой *SmaI*, о чем может свидетельствовать дополнительный фрагмент “*A**” размером около 18 тыс. п. н. (рис. 3, *а*, *б*). Для установления происхождения этого “аномального” фрагмента применили две стратегии: удлинение времени реакции гидролиза ДНК и увеличение концентрации фермента. Как следует из рис. 3, *а*, по мере увеличения концентрации рестриктазы интенсивность свечения на электрофореграмме “аномального” фрагмента уменьшалась вплоть до полного исчезновения полосы при десятикратной концентрации эндонуклеазы. В то же время пропорционально увеличи-

валась интенсивность фрагментов В и С размером 11 и 7 тыс. п. н. соответственно. Схожий эффект наблюдался при увеличении времени реакции, хотя полного гидролиза данного фрагмента после 24 ч инкубации реакционной смеси так и не удалось достичь.

Подобные аномальные сайты связывают как с наличием частичного метелирования, так и со специфическим влиянием ближайшего нуклеотидного окружения [7, 9]. Последующий геномный анализ показал, что этот сайт находится между двумя прямыми повторами нуклеотидов размером 16 пар оснований, которые по своей структуре напоминают промоторные участки фага λ [8]. Возможно, такое ближайшее окружение сайта физически влияет на его доступность действию рестриктазы. Кроме того, ряд необычных сайтов также был обнаружен при *DraI*-гидролизе ДНК фагов 49 и 59, объяснить природу которых пока не представляется возможным.

Таким образом, сравнительный анализ сайтов рестрикции с использованием традиционного и биоинформатического подходов достоверно показал, что геномы эрвиниофагов 49 и 59 являются циклически пермутированными. Обнаруженная пермутация имеет непрерывный характер в случае вирионной ДНК фага 59 и дискретный — для ДНК фага 49. Предварительные геномные исследования свидетельствуют о достаточно большой гомологии геномов, составляющей 47 % и коррелирующей с ранее полученными данными. Наличие аномальных сайтов рестрикции указывает на существенное различие между реальной структурой вирионной ДНК и первичной нуклеотидной последовательностью геномов, полученной с использованием классических методов секвенирования. Умеренные бактериофаги 49 и 59 фитопатогенных энтеробактерий неидентичны другим известным вирусам и принадлежат к уникальным фагам семейства *Siphoviridae*.

Авторы выражают благодарность PhD А. Kropinski (University of Guelph, Канада) за помощь в сборке фаговых геномов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Ackermann H.W., Kropinski A.M. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes. *Res Microbiol.* 2007. **158**, № 7. P. 555–566.
2. Sherwood R., Casjens S.R., Gilcrease E.B. Determining DNA packaging strategy by analysis of the termini of the chromosomes in tailed-bacteriophage virions. *Meth. Mol. Biol.* 2009. **502**. P. 91–111.
3. Товкач Ф.И., Григорян Ю.А., Рубан В.И., Кишко Я.Г. Сравнительная характеристика умеренных фагов *Erwinia caratovora* 268. *Мікробіол. журн.* 1985. **47**, № 1. С. 59–64.
4. Товкач Ф.И., Шевченко Т.В., Горб Т.Е., Муквич Н.С., Романюк Л.В. Сравнительное изучение свойств умеренных эрвиниофагов 49 и 59. *Мікробіол. журн.* 2002. **64**, № 2. С. 65–81.
5. Товкач Ф.И., Григорян Ю.А., Рубан В.И., Данилейченко В.В., Кишко Я.Г. Рестрикционная карта пермутированной ДНК умеренного бактериофага 59 *Erwinia caratovora*. *Мол. генетика, микробиология и вирусология.* 1988. **1**. С. 20–24.
6. Кишко Я.Г., Григорян Ю.А., Товкач Ф.И., Рубан В.И., Машковский Н.Н. Изучение гомологии умеренных вирусов полилизогенной культуры *Erwinia caratovora*. *Докл. АН СССР.* 1984. **277**, № 5. С. 1250–1251.
7. McClelland M., Nelson M., Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 1994. **22**, № 17. P. 3640–3659.
8. Ptashne M. A Genetic Switch: Phage Lambda. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. 155 p.
9. Armstrong K., Bauer W.R. Preferential site-dependent cleavage by restriction endonuclease PstI. *Nucleic Acids Res.* 1982. **10**, № 3. P. 993–1007.

Поступило в редакцию 16.02.2017

REFERENCES

1. Ackermann, H. W. & Kropinski, A. M. (2007). Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes. *Res Microbiol.*, 158, No. 7, pp. 555-566.
2. Sherwood, R., Casjens, S. R. & Gilcrease, E. B. (2009). Determining DNA packaging strategy by analysis of the termini of the chromosomes in tailed-bacteriophage virions. *Meth. Mol. Biol.*, 502, pp. 91-111.
3. Tovkach, F. I., Grigoryan, Yu. A., Ruban, V. I. & Kishko, Ya. G. (1985). Comparative description of temperate phages *Erwinia carotovora* 268. *Microbiol Zh.*, 47, No. 1, pp. 59-64 (in Russian).
4. Tovkach, F. I., Shevchenko, T. V., Gorb, T. E., Mukvich, N. S. & Romanyuk, L. V. (2002). Comparative study of properties of temperate erwiniofages 49 and 59. *Microbiol Zh.*, 64, No. 2, pp. 65-81 (in Russian).
5. Tovkach, F. I., Grigoryan, Yu. A., Ruban, V. I., Danileichenko, V. V. & Kishko, Ya. G. (1988). Restriction map of permutants DNA of temperate bacteriophage 59 *Erwinia carotovora*. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, 1, pp. 20-24 (in Russian).
6. Kishko, Ya. G., Grigoryan, Yu. A., Tovkach, F. I., Ruban, V. I. & Mashkovsky, N. N. (1984). Study of homology of temperate viruses of polylysogenic culture *Erwinia carotovora*. *Dokl. AN SSSR*, 277, No. 5, pp. 1250-1251 (in Russian).
7. McClelland, M., Nelson, M. & Raschke, E. (1994). Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res.*, 22, No. 17, pp. 3640-3659.
8. Ptashne, M. A. (2004). *Genetic Switch: Phage Lambda*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
9. Armstrong, K. & Bauer, W. R. (1982). Preferential site-dependent cleavage by restriction endonuclease PstI. *Nucleic Acids Res.*, 10, No. 3, pp. 993-1007.

Received 16.02.2017

М.А. Златогурська¹, Ф.І. Товкач²

¹ Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова

² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

E-mail: zlatohurska@gmail.com

ГЕНОМІКА І СТРУКТУРА ВІРІОННИХ ДНК
ПОМІРНИХ ЕРВІНІОФАГІВ 49 І 59

Здійснено порівняльне дослідження віріонної ДНК ервініофагів 49 і 59 за допомогою біоінформатичного аналізу та стандартної рестрикції. Встановлено, що геноми обох фагів циклічно пермутовані, однак перmutація ДНК фага 59 є неперервною, тоді як у фага 49 вона має дискретний характер. Віріонна ДНК фага 49 має аномальний *SmaI*-сайт, який не піддається повному гідролізу, що, найімовірніше пов'язано з впливом найближчого нуклеотидного оточення.

Ключові слова: бактеріофаги 49 і 59, рестрикційний аналіз, біоінформатичний аналіз, *headful*-механізм упаковки, циклічна та дискретна перmutація.

М.А. Zlatohurska¹, F.I. Tovkach²

¹ Mechnikov Odessa National University

² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: zlatohurska@gmail.com

GENOMICS AND VIRION DNA STRUCTURE
OF TEMPERATE ERWINIOPHAGES 49 AND 59

A comparative study of virion DNAs of phages 49 and 59 by the standard restriction and bioinformatic analyses is conducted. It has been shown that the genomes of both bacteriophages are cyclically permuted, but phage 59 is characterized by continuous permutation of the genome, while phage 49 has discrete permutation. Virion DNA of phage 49 has an abnormal cleavage site for *SmaI* restriction enzyme that, unlike the rest *SmaI*-sites, is not completely hydrolyzed.

Keywords: bacteriophages 49 and 59, restriction analysis, bioinformatic analysis, *headful* packaging mechanism, circular and discrete permutation.