

**Л.В. Романюк¹, Ф.И. Товкач¹, Т.В. Иваница², А.И. Кушкина¹,
А.Н. Остапчук¹, Т.Е. Горб¹**

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, D03680, Украина

²Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

АБОРТИВНАЯ ИНФЕКЦИЯ У *ERWINIA CAROTOVORA* КАК ИСТОЧНИК НАНОЧАСТИЦ ФАГОВОЙ ПРИРОДЫ

Впервые показана возможность получения наночастиц фаговой природы с использованием abortивной фаговой инфекции. Обнаружено, что при инфицировании фагом ZF40-RT80 неспецифического хозяина Erwinia carotovora subsp. carotovora J2. Клетки образуют стократный избыток капсидных структур. С помощью электронного микроскопа обнаружено два типа фаговых капсидов, которые отличаются друг от друга, а также имеют разные модальные диаметры – 47,5 и 71,5 нм. Обнаруженные капсиды упаковывают фаговую ДНК, которая освобождает их при обработке препаратов ДНКазой I. Предложен простой метод очистки капсидных структур от зрелых вирионов, которые в незначительном количестве образуются в процессе abortивной фаговой инфекции.

Полученные результаты создают предпосылки для получения капсидных наночастиц, а также для исследования этапов морфогенеза и морфологизации фага ZF40 без привлечения специальных фаговых мутантов.

Ключевые слова: Erwinia carotovora, бактериофаг, abortивная фаговая инфекция, капсиды, наночастицы.

Abortивная инфекция (Abi) является одним из многих механизмов проявления устойчивости бактериальной клетки к бактериофагу. Часто этот фенотип экспрессируется криптическими плазмидами. Активация Abi-систем приводит к ингибированию репликации, транскрипции и белкового синтеза бактериофагов. Abortивные фаговые инфекции широко распространены у грам-положительных бактерий [7], а также обнаружены во многих энтеробактериях, в том числе у важного фитопатогена Erwinia carotovora [8].

Особый интерес могут вызывать abortивные инфекции, которые приводят к накоплению в фаговых лизатах отдельных компонентов вириона, например, таких как капсиды, прокапсиды, хвостовые отростки и нитчатые фибриллы. В свою очередь эти частицы могут выступать как объекты современной нанобиотехнологии [11], а также играть неопределимую роль при изучении процессов самосборки фаговых частиц [10] без получения специальных мутантов в структурной области фагового генома.

Цель представленной работы состояла в исследовании abortивной инфекции, вызываемой фагом ZF40-RT80 у E. carotovora subsp. carotovora J2, особенность которой заключается в избыточном накоплении фаговых капсидов.

Материалы и методы. Объектами настоящего исследования были бактериофаги ZF40, ZF40-RT80 и ZF40с₆ E. carotovora. В работе использовали штамм E. carotovora subsp. carotovora J2 (EccJ2) и диссоциант штамма E. carotovora subsp. carotovora 62A – EccRC5297.

Бактериофаги получали методом слитного лизиса. Фаговые частицы концентрировали и очищали дифференциальным ультрацентрифугированием (ротор SW28, Spinco L8-70, 26000 об/мин, 80 мин).

Оптимальные условия адсорбции варианта фага ZF40-RT80 на неадекватном штамме *EccJ2* составляли: 15 мин, 28 °С, множественность инфекции свыше 100 фаговых частиц на клетку.

Электрофорез фаговых частиц, капсидов, ДНК проводили в 0,8–1,0%-ных гелях агарозы NA (фирма LKB, Швеция) при напряженности электрического поля 6–8 в/см.

Выделение фаговых ДНК и их гидролиз эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI, *Hpa*I, *Hind*III осуществляли, как описано в работе [5].

Частицы фага адсорбировали на коллоидных подложках, контрастировали 2%-ным уранилацетатом, наблюдали и фотографировали в электронном микроскопе JEOL 1400 при инструментальном увеличении 20000–40000х.

Результаты и их обсуждение. В процессе работы был обнаружен вариант фага ZF40-RT80, способный инфицировать клетки *E. carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*) J2. Последующие исследования показали, что этот бактериофаг не способен вызывать полноценную инфекцию штамма *Ecc* J2, а эффективность его посева в 100 раз ниже, чем на адекватной индикаторной культуре *E. carotovora* subsp. *carotovora* RC5297 [4]. Уменьшение количества жизнеспособных фаговых частиц при каждом новом цикле репродукции не связано с системой рестрикции-модификации индикаторного штамма *Ecc* J2. Наблюдения показывают, что инфицирование клеток *Ecc*J2 фагом ZF40-RT80 носит абортивный исход, т.е. характеризуется избыточным накоплением капсидных фаговых структур по сравнению с нативными вирионами.

Электронно-микроскопические исследования позволили обнаружить два типа капсидов (рис. 1). К первому типу относятся капсидные структуры, не имеющие выраженной оболочки. Модальное значение их диаметров составляет 47,5 нм. Капсиды второго типа представляют собой частицы с четко выраженной оболочкой и внутренним кором, морфология и размер диаметра которых близка к таковым капсидам типа I. Модальный диаметр капсидов типа II составляет 71,5 нм, а максимальный размер этих частиц превышает 100 нм (рис. 2). Так как минимальный диаметр капсидов, входящих в состав целостного инфекционного вириона фага ZF40 составляет 54,5 нм [4], то часто встречаемые в лизатах структуры типа I (рис. 1, 2) можно принять как истинные капсиды фага ZF40-RT80. Вероятно, они подверглись полной инкапсидации молекулами ДНК. Что касается природы частиц типа II, то, предположительно, они являются продуктами неполного разрушения капсидов первого типа вследствие осмотического шока. Возможно также, что эти структуры только частично заполнены фаговой ДНК и являются промежуточными продуктами сборки фагового капсида. В пользу данного предположения свидетельствуют редко встречающиеся «фаговые тени», которые не содержат молекул ДНК (частицы типа III – рис. 1). Однако, необходимы более детальные исследования для того, чтобы соотнести частицы третьего типа или с капсидными компонентами, потерявшими ДНК, или с прокапсидами, которые, как правило, предшествуют образованию зрелых капсидов [10].

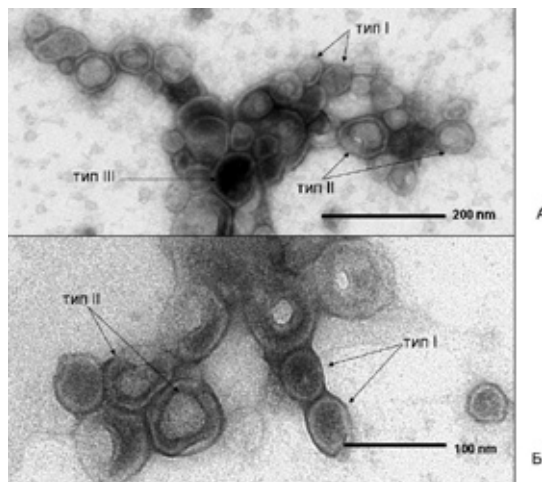


Рис. 1. Электронограммы частиц бактериофага ZF40-RT80 при различных увеличениях (А и Б). Обозначение частиц – см. текст.

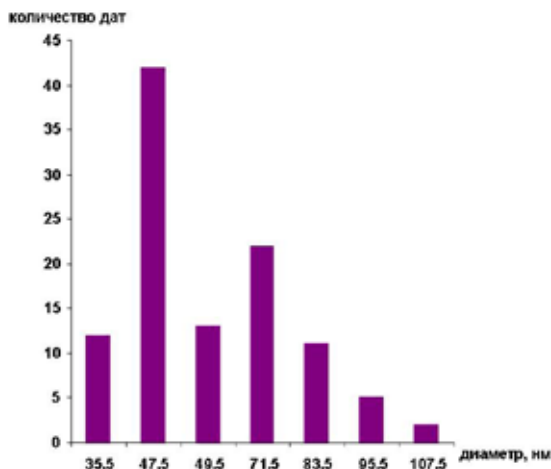


Рис. 2. Гистограмма распределения значений диаметров капсидов бактериофага ZF40-RT80

Данные электронной микроскопии показали наличие в фаговых лизатах не только капсидных структур, но и нативных вирионов, а также хвостовых отростков и базальных пластинок. С помощью непосредственного подсчета в поле электронного микроскопа, а также методом титрования установлено, что количество жизнеспособных вирусных частиц достигает несколько процентов. В целом, эти результаты свидетельствуют об abortивном характере инфекции, осуществляемой фагом ZF40-RT80 при его репродукции на индикаторной культуре *EccJ2*.

Последующая задача заключалась в определении наличия молекул ДНК в составе капсидных структур. Для этого ДНК-содержащие частицы алиэрировали с помощью электрофореза в нативных гелях агарозы [1, 6]. В концентрированных фаговых препаратах было обнаружено три типа частиц, содержащих нуклеиновые кислоты. Как будет показано далее, все эти молекулы представляют собой высокомолекулярную фаговую ДНК. Для первого типа ДНК-частиц свойственна низкая электрофоретическая подвижность, а также избыточное количество по сравнению с частицами второго и третьего типов (рис. 3,А). Электрофоретическая подвижность двух последних типов ДНК-частиц составляет 1,6 и 1,8, если значение таковой для частиц первого типа принять за единицу. В рамках данного исследования типы капсидных структур, классифицированные с помощью электронной микроскопии (рис. 1 и 2), пока не удалось соотнести с их электрофоретическими типами.

Для анализа молекул, упакованных в частицы, использовали гидролиз суммарной ДНК с помощью рестриктаз *Bam*HI, *Hpa*I, *Hind*III. Несмотря на одинаковый узор полученных рестрикционных фрагментов, количественное соотношение ДНК-фрагментов *Bam*HI и *Hind*III у бактериофага ZF40 отличается от таковых ДНК, упакованных в частицы фага ZF40-RT80 (рис. 3,Б). Это подтверждает предположение, что ZF40-RT80 является вариантом исходного бактериофага ZF40. Аналогичные фаговые варианты были получены при поиске *ts*-мутантов фага ZF40, которые характеризовались переходом непрерывной пермутации фагового генома в дискретную. При этом наблюдалось сохранение постоянного размера упакованной ДНК [2]. Дополнительно к этому, для всех используемых рестриктаз был характерен неспецифичный гидролиз ДНК, который на электрофореграммах проявлялся в виде трековых полос (рис. 3,Б). Происхождение этих полос может быть связано с экзогенной ДНК, которая случайно адсорбируется на частицах, или клеточной ДНК, которая упакована в незначительную часть капсидов.

Для окончательного доказательства того, что капсидные структуры фага ZF40-RT80 упаковывают исключительно фаговую ДНК, был предложен оригинальный подход. Для этого проводили адсорбцию инфекционных фаговых частиц на живых клетках *Ecc J2*. По нашим оценкам этот прием позволяет удалять из концентрированных препаратов свыше 95 % жизнеспособных вирионов. Последующие исследования очищенных суспензий проводили по вышеописанной схеме с использованием методов электронной микроскопии, ультрацентрифугирования, электрофореза частиц в гелях агарозы и рестрикционного анализа ДНК (рис. 4). В результате этих опытов было установлено, что капсидные структуры не адсорбируются на живых клетках *Ecc J2* и представляют собой соответствующий компонент вириона. Как видно из элект-

рофореграммы, приведенной на рис. 4,А в препараты, очищенные от полноценных фаговых частиц, характеризуются полосой (частицы типа I), которая по подвижности и интенсивности не отличается от таковой неочищенной смеси частиц (рис. 3,А). В препаратах присутствуют также неизменные частицы типа II. Однако при очистке теряется третий компонент смеси. Частицы типа I и II, вероятно, содержат молекулы ДНК одинакового размера, которые отличаются плотностью упаковки. Результаты рестриционного анализа (рис. 4,Б) позволяют сделать окончательный вывод о том, что указанные частицы содержат исключительно фаговую ДНК, которая специфично гидролизуется рестриктазами *Bam*HI, *Hpa*I, *Hind*III на характерное количество дискретных фрагментов.

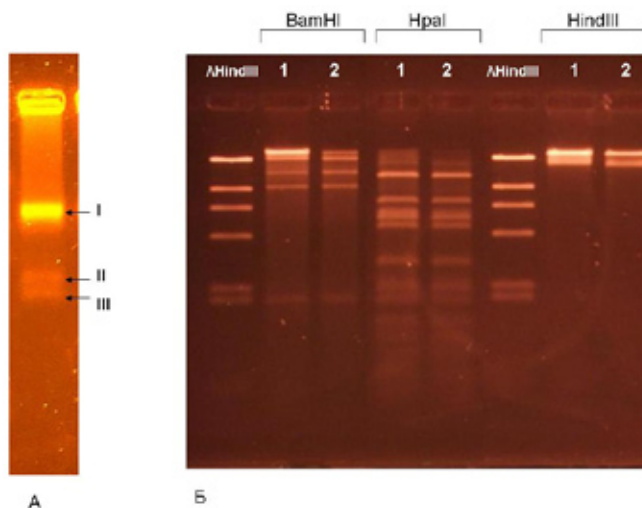


Рис. 3. Электрофореграмма исходного бактериофага ZF40-RT80 (А) и рестриционный анализ ДНК, упакованной в частицы (Б) Частицы типов I, II, III были разделены в 0,8 % агарозном геле при напряженности электрического поля 6 в/м в течение 4-х часов (А и Б,1). Рестриционный анализ ДНК, выделенных с частиц ZF40-RT80 (1) и ZF40с₆ (2), проводили с помощью эндонуклеаз *Bam*HI, *Hpa*I, *Hind*III (Б). Продукты гидролиза ДНК фага λ рестриктазой *Hind*III использованы как контроль.

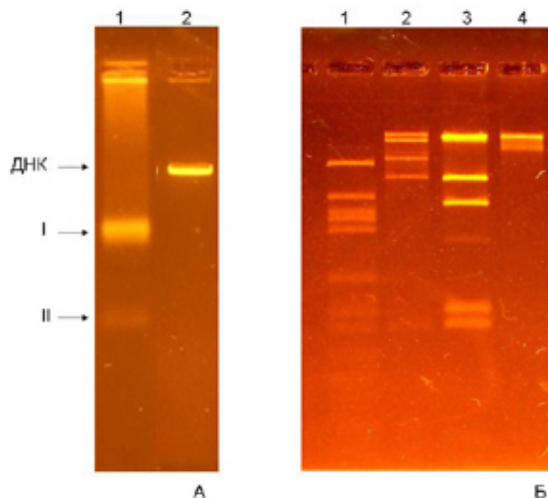


Рис. 4. Электрофореграмма ДНК очищенных капсидов фага ZF40-RT80 (А,1) и рестриционный анализ ДНК (Б) Для визуализации молекул ДНК, частицы обрабатывали 0,5 % SDS при 60 °С в течение 10 мин (А,2) Б: 1 – *Hpa*I; 2 – *Bam*HI; 4 – *Hind*III; 3 – фрагменты ДНК фага λ

Последующие опыты показали, что капсиды I и II типов не чувствительны к РНКазе, однако чувствительны к действию ДНКазыI. Обработка вышеназванных частиц, очевидно, приводит к изменению степени экспансии капсидов молекулой ДНК, так как подвижность этих структур

уменьшается (рис. 5). Обращает на себя внимание тот факт, что молекула ДНК, упакованная в созревшие капсиды, становится доступной для действия фермента, на что указывает трековая полоса. Таким образом, мы наблюдаем различную степень гидролиза ДНК в составе частиц. Это свойство открывает перспективу для получения наночастиц вирусной природы, не содержащие информационного материала в виде фаговой ДНК.

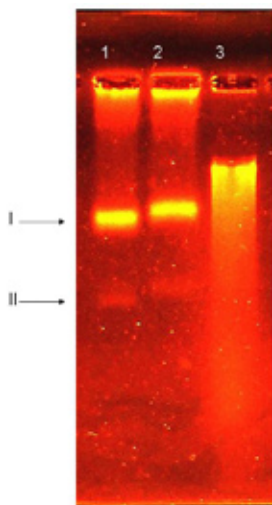


Рис. 5. Электрофореграмма очищенных капсидных структур фага ZF40-RT80. Капсиды типа I и II (1) обрабатывали ДНКазой I (2) или ДНКазой I с последующим разрушением частиц 0,5 % SDS (3)

Дальнейшие исследования были направлены на доказательства того, что капсиды представляют собой промежуточные продукты морфопоэза бактериофага ZF40-RT80 (рис. 6). Мы сравнили полипептидный состав фага ZF40с₆ [3] с таковым исходного препарата ZF40-RT80, который как было показано выше, кроме отдельных компонентов вириона, содержит также нативные фаговые частицы. Как видно из электрофореграммы, представленной на рис. 6, общий характер распределения полипептидов по размеру совпадает в обоих случаях. Однако препарат ZF40-RT80 содержит мажорные полипептиды, которые не обнаруживаются в составе частиц ZF40с₆ или превалируют количественно по отношению к полипептидам одинакового размера. Эти результаты свидетельствуют о том, что капсидные структуры, хвостовые отростки и другие компоненты вириона, обнаруживаемые в лизатах клеток ЕссJ2, причастны к промежуточным продуктам сборки вириона фага ZF40-RT80.

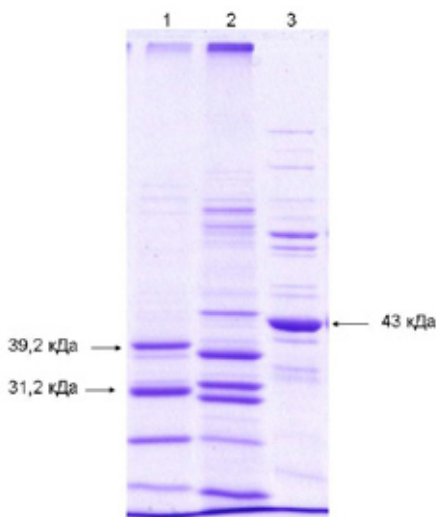


Рис. 6. Электрофоретическое разделение полипептидов фагов ZF40с₆, ZF40-RT80, T4 *E. coli* в 12 % ПААГ- SDS. Справа отмечена полоса, соответствующая основному белку капсид фага T4 gp23 [9], слева мажорные белки фага ZF40с₆, 1 – ZF40с₆; 2 – ZF40-RT80; 3 – T4.

Таким образом, данные о ДНК, которая упаковывается в капсиды типа I и II наряду с их полипептидным составом свидетельствует о том, что abortивная инфекция в системе бактериофаг ZF40-RT80 – неадекватный индикатор *Ecc J2* действительно приводит к образованию избыточного количества вирионных структур типа капсидов. Кроме того, наличие отдельных хвостовых отростков говорит о том, что основной дефект состоит в отсутствии морфопоэтического этапа сборки на уровне объединения хвостового отростка и фаговой головки. С другой стороны abortивная инфекция может быть использована для получения наноструктур фаговой природы, содержащих инфекционную ДНК. Трансформация этих структур в частицы, не содержащие ДНК, может быть осуществлена прямой обработкой ДНКазой I.

Приведенное выше сообщение создает предпосылки для исследования этапов морфогенеза и морфопоэза бактериофага ZF40 без привлечения фаговых мутантов amber-типа, а также для исследования аттенуации вирусов при смене хозяина.

Представленная работа частично профинансирована из фонда целевой комплексной программы фундаментальных исследований НАН Украины «Фундаментальные проблемы наноструктурных систем, наноматериалов, нанотехнологий» и выполняется в рамках научного проекта №0110U006115.

**Л.В. Романюк¹, Ф.І. Товкач¹, Т.В. Іваниця², А.І. Кушкіна¹,
А.М. Остапчук¹, Т.Ю. Горб¹**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, ГСП, D03680, Україна

²Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, вул. Дворянська 2, Одеса, 65082, Україна

АБОРТИВНА ІНФЕКЦІЯ У *ERWINIA CAROTOVORA* ЯК ДЖЕРЕЛО НАНОЧАСТОК ФАГОВОЇ ПРИРОДИ

Резюме

Вперше показана можливість отримання наночастинок фагової природи з використанням abortивної фагової інфекції. Виявлено, що при інфікуванні фагом ZF40-RT80 неспецифічного хазяїна *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* J2 клітини утворюють стократний надлишок капсидних структур. За допомогою електронного мікроскопа виявлено два типи фагових капсидів, які відрізнялися один від одного, а також мали різні модальні діаметри – 47,5 нм і 71,5 нм. Виявлені капсиди упаковували фагову ДНК, яка звільняла їх при обробці препаратів ДНКазою I. Запропоновано простий метод очистки капсидних структур від зрілих віріонів, які в незначній кількості утворюються під час abortивної фагової інфекції.

Отримані результати створюють передумови для отримання капсидних наночастинок, а також для дослідження етапів морфогенеза і морфопоэза фага ZF40 без залучення спеціальних фагових мутантів.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, бактериофаг, abortивна фагова інфекція, капсиди, наночастилки.

**L.V.Romanyuk¹, F.I.Tovkach¹, T.V.Ivanitsa², A.I.Kushkina¹,
A.N.Ostapchuk¹, T.E.Gorb¹**

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Mechnikov Odessa National University, Odessa

ABORTIVE INFECTION IN *ERWINIA CAROTOVORA*, AS A SOURCE OF NANOPARTICLES OF PHAGE NATURE

S u m m a r y

A possibility to obtain nonparticles of phage nature using abortive phage infection was shown for the first time. It was found out that the nonspecific host *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* J2 being infected by phage ZF 40-RT80, the cells form a 100-fold surplus of capsid structures. Using the electron microscope the authors have found two types of phage capsids which differ from each other and have different modal diameters – 47.5 and 71.5 nm. The found capsids pack the phage DNA which releases them under treatment of the preparations by DNase I. A simple method of purification of capsid structures from mature virions which are formed in inconsiderable quantity in the process of abortive phage infection is proposed.

The obtained results create preconditions for obtaining capsid nanoparticles as well as for studying the stages of morphogenesis and morphopoiesis of phage ZF40 without attracting special phage mutants.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Erwinia carotovora*, bacteriophage, abortive phage infection, capsids, nanoparticles.

The author's address: *Romanyuk L.V.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Иваница Т.В., Товкач Ф.И.* Предварительная характеристика ДНК-содержащих вирусоподобных частиц *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2007. – **69**, № 3. – С. 19–26.
2. *Паницина А.И., Товкач Ф.И.* Внутригеномная гетерогенность умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2006. – **68**, № 6. – С. 35–43.
3. *Паницина А.И., Товкач Ф.И., Романюк Л.В., Максименко Л.А.* Физико-химические свойства умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2007. – **69**, № 2. – С. 15–22.
4. *Товкач Ф.И.* Структурная организация частиц и рестрикционный анализ ДНК умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – **71**, № 1. – С. 75–81.
5. *Товкач Ф.И., Григорян Ю.А., Рубан В.И., Данилейченко В.В., Кушко Я.Г.* Рестрикционная карта пермутированной ДНК умеренного бактериофага 59 *Erwinia carotovora* // Мол. генетика, микробиол., вирусол. – 1988. – № 1. – С. 20–24.
6. *Товкач Ф.И., Иваница Т.В., Куликина А.И.* Характеристика дефектных частиц вирусной природы у бактерий рода *Erwinia* // Доповіді НАН України. – 2008. – № 7. – С. 170–175.
7. *Chopin M.C., Chopin A., Bidnenko E.* Phage abortive infection in lactotocci: Variations on a theme // Curr. Opin. Microbiol. – 2005. – **8**. – P. 473–479.
8. *Finerana P.C., Blowera T.R., Fouldsa I.J., Humphreys D.P., Lilley K.S., Salmond G.P. C.* The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – 106, N 3. – P. 894–899.
9. *Miller E.S., Kutter E., Mosig G., Arisaka F., Kunisawa T., Ruger W.* Bacteriophage T4 Genome // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2003. – **67**, N 1. – P. 86–156.
10. *Nurmemmedov E., Castelnovo M., Catalano C.E., Evilevitch A.* Biophysics of viral infectivity: matching genome length with capsid size // Quart. Rev. Biophys. – 2007. – **40**, N 4. – P. 327–356.
11. *Steinmetz N.F.* Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. – 2010. – **6**. – P. 634–641.

Отримано 13.09.2009