

**Н.А. Король¹, Л.В. Романюк², А.Н. Остапчук², Т.В. Иваница¹,
А.И. Кушкина², Ф.И. Товкач^{1,2}**

¹ Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

² Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, D03680, Украина

ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ВИРУЛЕНТНЫХ МУТАНТОВ ЭРВИНИОФАГА ZF40

Нарушение морфопоэза, или присоединения хвостового отростка к капсиду, является характерной особенностью морфогенетического развития не только репродуктивной инфекции, но и лизогенной индукции дефектных бактериофагов *Erwinia carotovora subsp. carotovora* (Есс). На основе фага ZF40 и двух его вирулентных мутантов ZF40-421 и ZF40c_{5/5}, а также нетрадиционной для этих фагов индикаторной культуры *EccM2-4/50RI* создана модельная система для изучения морфогенетического развития и сборки вириона. С ее помощью установлено, что диаметр фагового капсида не является консервативной величиной.

Для *vir*-мутанта ZF40c_{5/5}/50RI характерно наличие капсидов двух типов со средними диаметрами 60,3 и 65,0 нм, тогда как в ходе морфогенеза фаг ZF40-421/50RI образует только один тип головок, размером около 65 нм. Эти головки, вероятно, не очень прочно соединены с хвостовыми отростками, так как степень вторичного разрушения вирионов фага ZF40-421/50RI значительно выше, чем у вирионов фага ZF40c_{5/5}/50RI. У последнего количество капсидов с диаметром 60,3 нм значительно превалирует.

Оба вирулентных мутанта, в целом, значительно стабильнее их изогенных партнеров, полученных на *EccRC5297*, что позволяет сделать вывод о значительном влиянии на морфогенез и морфопоэз специфических бактериальных белков клетки-хозяина.

Одной из актуальных проблем современной бактериофагии является процесс сборки вириона. Известно, что он включает две независимые стадии – морфогенез капсида и хвостового отростка. Окончательным этапом сборки является морфопоэз фаговой частицы, т.е. присоединение капсида к хвостовому отростку [12]. Часто именно этот этап сопряжен с разнообразными дефектами, которые приводят к abortивной инфекции, что выражается в образовании неполноценного фагового потомства [8,9]. У фагов бактерий рода *Erwinia* морфопоэз является наиболее уязвимым; его нарушение приводит к образованию отдельных хвостовых отростков и накоплению капсидных структур [7]. Это характерно не только для репродуктивной инфекции, но также проявляется на уровне экспрессии дефектных профагов, которые при лизогенной индукции образуют отдельные хвостовые отростки и капсиды. Интересно, что данный феномен наблюдается практически у всех дефектно-лизогенных штаммов *Erwinia carotovora subsp. carotovora* [5].

Ранее было показано, что вариант фага ZF40-RT80 вызывает abortивную инфекцию на неродственном индикаторном штамме (*EccJ2*), которая приводит к избыточному накоплению капсидных структур [3]. В настоящей работе мы использовали два вирулентных мутанта фага ZF40, у которых ранее наблюдали образование капсидов с измененной электрофоретической подвижностью, по сравнению с таковой капсидов фага дикого типа [2]. Было отмечено, что плейотропные эффекты, связанные с мутациями вирулентности в геноме фага, исчезают при репродукции их на индикаторном штамме – *EccM2-4/50RI*.

Целью данной работы было исследование морфогенеза двух вирулентных мутантов эрвиниофага ZF40c_{5/5} и ZF40-421 на альтернативном индикаторном штамме *EccM2-4/50RI*.

Материалы и методы. Объектами данного исследования были бактериофаги ZF40c_{5/5}, ZF40/421, адаптированные и наработанные на штамме *Ecc50RI*, а также фаг ZF40-421, полученный на *EccRC5297*. В работе использовали штамм *Ecc50RI*, который являлся спонтанным диссоциантом штамма *EccM2-4*, а *EccRC5297* – бактериоциностойчивым диссоциантом штамма *Ecc62A*.

Фаголизаты получали стандартным методом слитного лизиса.

Концентрирование фаговых частиц осуществляли с помощью ультрацентрифуги Spinco L7-70 в роторе SW28 при 26000 об/мин, 4 часа, 10С.

Плавучую плотность нативных фаговых частиц оценивали в преформированных градиентах. Двухступенчатые градиенты CsCl (1,42 г/см³ и 1,60 г/см³) готовили в центрифужных

© Н.А. Король, Л.В. Романюк, А.Н. Остапчук, Т.В. Иваница, А.И. Кушкина, Ф.И. Товкач, 2010

пробирках на 5 мл непосредственно перед центрифугированием. Суспензию фага наслаивали на градиент и центрифугировали в роторе SW55 при 35000 об/мин, 4 часа, 10С. Плотность полученных фракций (объем – 100 мкл) определяли по показателю преломления.

Фаговую ДНК получали двумя способами. В случае оценки ее количества в составе капсидов – обработкой частиц 0,5 % SDS при 60 °С в течении 10 мин. Фаговую ДНК выделяли, как описано в работе [6]. Для ее гидролиза использовали следующие эндонуклеазы рестрикции: *HpaI*, *HindIII* и *BamHI*. Электрофорез нативных фаговых частиц, их капсидов, выделенной ДНК, а также рестрикционных фрагментов проводили в 0,8–1,0 % гелях агарозы при напряженности электрического поля 6–8 В/см.

Микрофотографии фаговых частиц, контрастированных 2 %-ным раствором уранилацетата, получали на электронном микроскопе JEOL1400 при инструментальном увеличении 20000–40000х. Максимальный диаметр капсида определяли по расстоянию между противоположными вершинами его гексагональной проекции. Полную длину хвостового отростка измеряли от порталной вершины до конца базальной пластинки включительно [4].

Результаты и их обсуждения. В предыдущих работах было отмечено, что *vir*-мутант ZF40-421 слабо адаптируется к продуктивному развитию на нетрадиционном индикаторном штамме *EccM2-4*, в отличие от фага дикого типа, его *clear*-мутанта c_6 , а также *vir*-мутанта ZF40 $c_{5/5}$ [1]. Это свидетельствует о различных мутациях в геномах *vir*-фагов. Тем не менее, при титровании больших концентраций фага ZF40-421 на штамме *Ecc50RI* были обнаружены бляшки. Эффективность посева составляла $4,0 \cdot 10^{-8}$, что на три порядка ниже, чем в случае фага дикого типа и на два порядка ниже, чем у *vir*-мутанта ZF40 $c_{5/5}$. При препаративной наработке адаптированного фага ZF40-421 на хозяине *EccM2-4/50RI* титры достигали $10^{11} - 10^{12}$ БОЕ/мл, что значительно выше, чем при размножении исходного фага на традиционном штамме *EccRC5297*. В этом случае, скорее всего, стабильность фаговых частиц ZF40-421 /50RI значительно выше по сравнению с таковыми, наработанными на штамме *EccRC5297*. Для подтверждения этого тезиса мы провели центрифугирование частиц трех типов: ZF40-421/50RI, ZF40-421/5297 и ZF40 $c_{5/5}$ /50RI в градиенте CsCl. Результаты, представленные на рис. 1, демонстрируют, что пул фаговых частиц ZF40-421/50RI действительно является стабильным и образует одну полосу в градиенте, в то время как изогенные вирионы ZF40-421, наработанные на традиционном индикаторе *EccRC5297* разрушаются, подвергаясь действию осмотического шока, что приводит к образованию диффузной полосы в градиенте хлористого цезия.

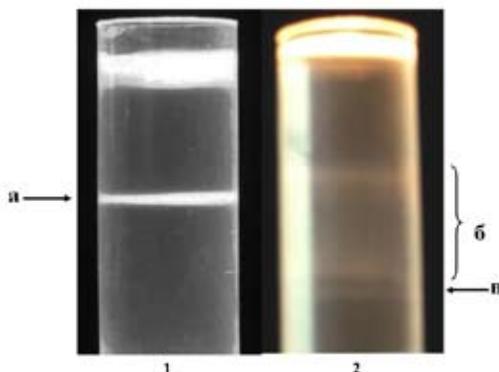


Рис. 1. Градиентные профили изогенных фагов ZF40–421/50RI (1) и ZF40–421/5297 (2). а, в – полосы нативных фаговых частиц; б – полоса разрушенных частиц.

Далее определяли плавучую плотность частиц обоих фагов в CsCl. Установлено, что для вирулентного мутанта ZF40-421/50RI показатель плотности составляет $1,45\text{г}/\text{см}^3$, а для фага ZF40 $c_{5/5}$ /50RI – $1,46\text{г}/\text{см}^3$. Поскольку эти значения находятся в пределах ошибки опыта, можно считать, что оба фага имеют одинаковую плавучую плотность со средним значением $1,455\text{г}/\text{см}^3$ (рис. 2). Ранее было показано, что вирулентные мутанты ZF40-421 и ZF40 $c_{5/5}$, полученные на штамме RC5297, теряли жизнеспособность до 0,2 % от общего количества вирионов, нанесенных на градиент. Таким образом, данный эксперимент демонстрирует возможность очистки частиц эрвиниофагов, наработанных на *Ecc50RI*, с помощью градиентного центрифугирования в хлориде цезия без значительных потерь нативных вирионов.

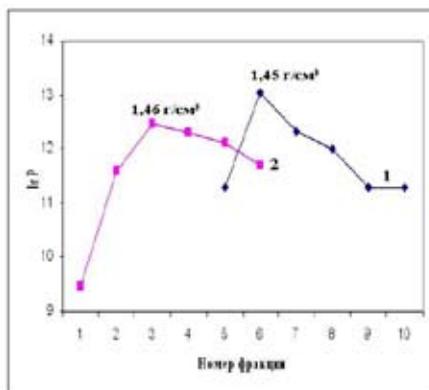


Рис. 2. Профиль седиментации частиц vir-мутантов фага ZF40 в градиенте CsCl.

P – титр фагов; 1 и 2 – ZF40–421/50RI и ZF40_{s/s}/50RI соответственно.

Для обнаружения различий в морфогенезе фаговых мутантов изучали морфолого-структурную организацию частиц обоих фагов, полученных на одном и том же хозяине. С помощью электронной микроскопии были установлены количественные параметры составных частей вирионов (таблица). Данные, представленные в таблице, демонстрируют, что модальные и средние значения максимального диаметра в высокой степени согласуются для обоих фагов. В случае фага ZF40_{s/s}/50RI эти значения совпадают с таковыми для фага дикого типа [4]. Однако, данный параметр капсида у фага ZF40–421/50RI на 10 % больше, чем таковой фага ZF40_{s/s}/50RI. Кроме того стандартные отклонения от среднего в случае последнего меньше на 3,3 %. Эти данные позволяют предположить, что у фагового мутанта ZF40–421/50RI за счет существенного изменения размера капсида и, возможно, изменения конекторной части, в целом изменена морфолого-структурная организация вириона.

Таблица

Параметры частиц вирулентных мутантов эрвиниофагов ZF40

Структурные компоненты частиц	ZF40 _{s/s} /50RI			ZF40–421/50RI		
	Модальный размер, нм	Средний размер, нм	Стандартное отклонение, нм (%)	Модальный размер, нм	Средний размер, нм	Стандартное отклонение, нм (%)
Капсид	59,5	60,3	3,2 (5,3%)	66,6	65,0	5,6 (8,6%)
Хвостовой отросток	92,1	87,5	7,4 (8,5%)	87,9*	88,7	9,6 (10,8%)
				77,7		

* объяснение в тексте

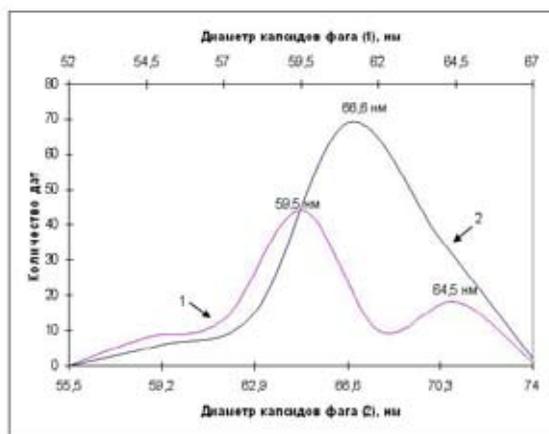


Рис. 3. Вариационные кривые распределения значений диаметров капсидов фагов ZF40_{s/s}/50RI (1) и ZF40–421/50RI (2).

59,5; 66,6; 64,5 нм – модальные значения капсидов.

Как видно из гистограммы (рис. 3), наличие капсидов большего размера характерно также и для фага ZF40c_{s/s}/50RI, модальный диаметр которого – 64,5 нм – в пределах ошибки соответствует модальному диаметру частиц диаметром 66,6 нм, преобладающих в лизатах фага ZF40-421/50RI. Из этих результатов следует, что у вирулентных мутантов размер капсида не является величиной консервативной. Несмотря на различные размеры головок фагов ZF40-421/50RI и ZF40c_{s/s}/50RI и, соответственно, на различные объемы капсидов, вероятнее всего оба фага упаковывают геномы одинаковых размеров, что удалось подтвердить с помощью рестрикционного анализа вирионных ДНК.

Непрочное соединение фаговой головки с хвостовым отростком сказывается на ориентации последнего на подложке и отражается на распределении его длины (рис. 4). Как видно из рис. 4, вариационный ряд линейного размера хвостовых отростков фага ZF40c_{s/s}/50RI близок к таковому для нормального распределения. В отличие от этого распределение длины хвостового отростка ZF40-421/50RI свидетельствует о наличии нескольких классов с модальными величинами 78, 88 и 98 нм. Это однозначно свидетельствует о гибкости коннекторной части и различной ориентации хвостового отростка на поверхности сетки-подложки, что приводит к невозможности достаточно точных измерений.

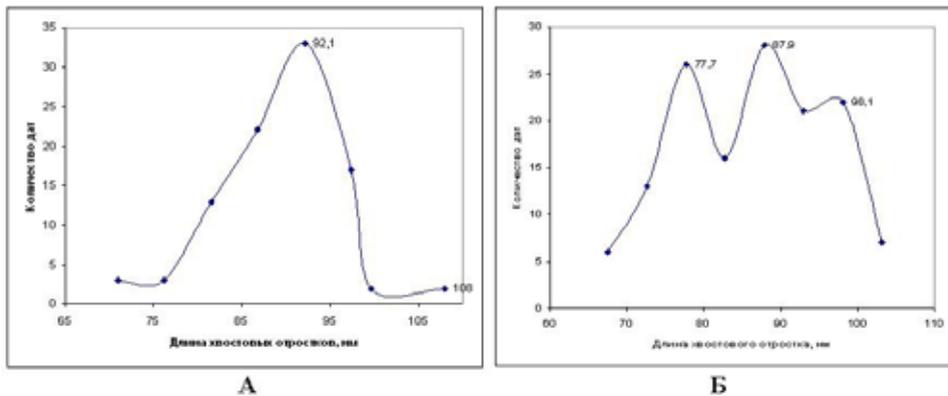


Рис. 4. Вариационные кривые распределения значений длин хвостовых отростков фагов ZF40c_{s/s}/50RI (А) и ZF40-421/50RI (Б).

Нарушение морфопоэза, т.е. стадии соединения хвостового отростка и фаговой головки, делает вирулентный мутант ZF40-421/50RI менее стабильным, по сравнению с ZF40c_{s/s}/50RI, и приводит к трехкратному увеличению количества отдельных капсидных структур и хвостовых отростков, которые образуются в результате вторичного разрушения вирионов (рис. 5). Для оценки количества капсидов, полученных после спонтанного вторичного разрушения в цезиевых градиентах, был предложен оригинальный подход. После электрофоретического разделения капсидных структур и ДНК, выделенных из них, определяли соотношение интенсивности флуоресценции этидий бромид в полосках, соответствующих капсиду и ДНК (рис. 6). В результате этих исследований установлено, что данные соотношения составляют 0,47, 1,13 и 1,41 для фагов ZF40c_{s/s}/50RI, ZF40-421/50RI и ZF40-421/5297 соответственно. Таким образом, действительно, вторичное разрушение вирионов после центрифугирования является наибольшим у ZF40-421/5297 и наименьшим у ZF40c_{s/s}/50RI.

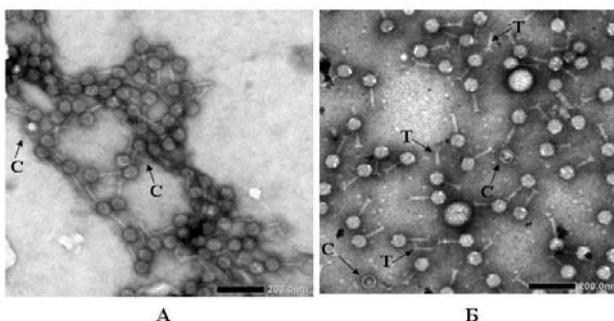


Рис. 5. Микрофотографии частиц vir-мутантов ZF40c_{s/s}/50RI (А) и ZF40-421/50RI(Б). С – фаговый капсид, Т – отдельный хвостовой отросток.

Изучение процессов сборки и структуризации фагового вириона является одной из основополагающих задач современной бактериофагии. Такие модели дают возможность понять принцип построения завершенных биологических кристаллов, каковыми представляются бактериофаги. Все системы морфогенеза и морфопоэза изучаются на стандартных бактериофагах, таких как λ , P22, T3, T4, T5 [11,13.15], которые включают стандартные системы фаг-бактерия. При этом используются наборы стандартных амбер-мутантов и исследование морфогенеза происходит на уровне отдельных молекулярных процессов.

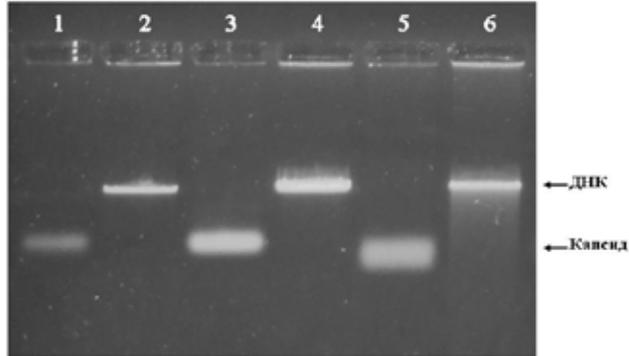


Рис. 6. Электрофореграмма нативных фаговых частиц и ДНК *vir*-мутантов фага ZF40.

1 – ZF40_{s/s}/50R; 3 – ZF40–421/50RI; 5 – ZF40–421/5297; 2, 4 и 6 – пул фаговой ДНК.

Очень часто исследователи выпускают из внимания влияние бактерии-хозяина на процесс фаговой сборки, хотя общеизвестно, что многие бактериальные белки-шапероны являются неотъемлемыми компонентами морфогенеза фаговой частицы [14]. Так сборка фагового вириона проходит несколько стадий развития прокапсидов, в ходе которых для созревания необходимым является протеолиз некоторых структурных белков, который обеспечивается продуктами генов бактерии-хозяина [10]. Еще одним значительным фактором, обуславливающим жесткость структуры фагового капсида, является наличие скафолдинговых белков клетки-хозяина, а также системы *groEL/ES*, изменяющей конформацию основных белков головки [14].

Результаты представленной работы создают перспективу изучения процессов – морфогенеза и морфопоэза на уровне не только фаговых мутаций, но и на уровне бактерии хозяина. На основе применения альтернативной индикаторной культуры впервые удалось получить стабильные жизнеспособные вирионы фага ZF40, что делает возможным надежную очистку вирионов в градиенте CsCl и исследование структурных белков методом протеомики. Несмотря на то, что оба вирулентных мутанта фага ZF40 показали устойчивость к осмотическому шоку в градиенте хлористого цезия, мутант ZF40-421/50RI является менее стабильным и приводит к троекратному увеличению количества капсидных и хвостовых структур в результате вторичного разрушения вирионов. Это свидетельствует о значимых мутациях в геноме фага, которые являются ощутимыми для его функционирования и развития в клетках индикаторного штамма, по сравнению с вирулентным мутантом ZF40_{s/s}/50RI [7]. Определение характера этих мутаций было бы важным для последующего изучения морфопоэза у фага ZF40 и влияния на этот процесс хозяйских белков типа шаперонов. Очевидно, что модельная система на основе фага ZF40, а также двух его вирулентных мутантов, является удобной для изучения дефектной лизогении и формирования фагоподобных частиц *E. carotovora*.

Таким образом, данная работа создает перспективу для оригинальных исследований морфогенеза и морфопоэза, а также для получения отдельных фаговых компонентов, которые могут быть использованы для изучения наноструктурных систем фаговой природы.

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.

**Н.А. Король¹, Л.В. Романюк², А.М. Остапчук², Т.В. Іваниця¹,
А.І. Кушкіна², Ф.І. Товкач^{1,2}**

¹ Одеський національний університет ім. І.І.Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна
² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного,
154, Київ, ГСП, D03680, Україна

ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕТИЧНОГО РОЗВИТКУ ВІРУЛЕНТНИХ МУТАНТІВ ЕРВІНІОФАГА ZF40

Резюме

Порушення морфопоезу, або приєднання хвостового відростка до капсиду, являється характерною особливістю морфогенетичного розвитку не лише репродуктивної інфекції, але і лізогенної індукції дефектних бактеріофагів *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*). На основі фага ZF40 та двох його вірулентних мутантів ZF40-421 і ZF40_{5/5}, а також нетрадиційної для цих фагів індикаторної культури *Ecc*M2-4/50RI, створена модельна система для вивчення морфогенетичного розвитку і збору віріона. З її допомогою визначено, що діаметр фагового капсиду не є консервативною величиною.

Для *vir*-мутанта ZF40_{5/5}/50RI характерна наявність капсидів двох типів з середніми діаметрами 60,3 і 65,0 нм, тоді як в ході морфогенезу фаг ZF40-421/50RI утворює лише один тип голівок, розміром біля 65 нм. Ці голівки, імовірно, не дуже щільно з'єднані з хвостовими відростками, так як ступінь вторинного руйнування віріонів фага ZF40-421/50RI значно вище, ніж у віріонів фага ZF40_{5/5}/50RI. У останнього кількість капсидів з діаметром 60,3 нм значно преважує.

Обидва вірулентних мутанти, загалом, значно стабільніші за їх ізогенних партнерів, отриманих на *Ecc*RC5297, що дозволяє зробити висновок про значний вплив на морфогенез і морфопоез специфічних бактеріальних білків клітини-хазяїна

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, бактеріофаг, дефектна лізогенія, капсиди.

**N.A.Korol¹, L.V.Romanyuk², A.N.Ostapchuk²,
T.V.Ivanytsa, A.I.Kushkina, F.I.Tovkach^{1,2}**

¹ Mechnikov Odessa National University, Odessa
² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

PECULIARITIES OF MORPHOGENETICAL DEVELOPMENT OF VIRULENT MUTANTS OF ERWINIOPHAGE ZF40

S u m m a r y

The distortion of morphopoiesis or tail attachment to the capsid is a characteristic feature of morphogenetical development not only of a reproductive infection but also of the lysogenic induction of the defective bacteriophage *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*). A model system for studying morphogenetical development and assembling of the virion was created on the basis of the phage ZF40 and its two virulent mutants ZF40-421 and ZF40_{5/5}, as well as the indicator culture *Ecc* M2-4/50 R1 being nontraditional host for these phages. It has helped to establish that the diameter of the phage capsid is not a conservative value.

The presence of capsids of two types with the average diameters 60.3 and 65.0 nm is characteristic of the *vir*-mutant ZF40_{5/5} / 50RI, while in the course of morphogenesis the phage ZF40-421 / 50RI forms only one type of heads of 65 nm in size. These heads are probably not firmly connected to the tails since the degree of the secondary destruction of the virions of the phage Zf40-421/50RI is considerably higher, than that of the virions of the phage ZF40_{5/5} / 50RI. The number of capsids being 60.3 nm in diameter prevails considerably in the latter.

The both virulent mutants as a whole are essentially more stable than their isogenic partners obtained on *Ecc* RC5297 which helps to make a conclusion about considerable influence of specific bacterial proteins of the host-cell on morphogenesis and morphopoiesis.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Erwinia carotovora*, bacteriophage, defective lysogeny, capsids.

The authors' address: Korol N.A., Mechnikov Odessa National University; 2 Dvoryanskaya St., Odessa, 65082, Ukraine.

1. Кушкіна А.И., Товкач Ф.И. Индикаторная система для изучения лизогенного развития умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Мікробіол. журн. – 2005. – **67**, № 3. – С. 50–60.
2. Паницина А.И., Товкач Ф.И., Романюк Л.В., Максименко Л.А. Физико-химические свойства умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Мікробіол. журн. – 2007. – **69**, № 2. – С. 15–22.
3. Романюк Л.В., Товкач Ф.И., Иваница Т.В., Кушкіна А. И., Остапчук А.Н., Горб Т.Е.Abortивная инфекция у *Erwinia carotovora* как источник наночастиц фаговой природы // Мікробіол. журн. – 2010 – **72**, № 6. – С. 51–57.
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. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – **71**, № 3. – С. 359–367.
6. 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.
7. Товкач Ф.И., Иваница Т.В., Кушкіна А.И. Характеристика дефектных частиц вирусной природы у бактерий рода *Erwinia* // Доповіді НАН України. – 2008. – № 7. – С. 170–175.
8. Chopin M.C., Chopin A., Bidnenko E. Phage abortive infection in lactococci: Variations on a theme // Curr. Opin. Microbiol. - 2005. – **8**. – P.473–479.
9. 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.
10. Lata R., Conway J.F., Cheng N. Et.al. Maturation dynamics of a viral capsid visualization of transitiond intermediate states // Cell. - 2000. - **100**, №1. С 253-263.
11. Lorenzen K., Olia A.S., Utrecht C., Cingolani G., Heck A.J. Determination of stoichiometry and conformational changes in the first step of the P22 tail assembly // J. Mol. Biol. - 2008. - **379**, №2. С.385-396.
12. Miller E.S., Kutter E., Mosig G., Arisaka F., Kunisawa T., Ruger W. Bacteriophage T4 Genome //Microbiol. Mol.Biol.Rev. - 2003. - 67, N1. – P. 86–156.
13. Nurmemedov E., Castelnovo M., Catalano C.E., Evilevitch A. Biophysics of viral infectivity: matching genome length with capsid size //Quart. Rev. Biophys. – 2007. - **40**, N4. – P. 327–356.
14. Rao V.B., Black L.W. Structure and assembly of bacteriophage T4 head // Virology journal. 2010. №7. - С.356-371.
15. Steinmetz N. F. Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices//Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine – 2010. – **6** – P. 634–641.I; 3 – ZF40/421/50RI; 5 – ZF40/421/5297; 2, 4 и 6 – пул фаговой ДНК.

Отримано 20.04.2010