

РЕВИЗИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ И АННОТАЦИИ ГЕНОМА
БАКТЕРИОФАГА *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI/THAILANDENSIS*
Вр-AMP1 – ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО АГЕНТА,
КОНТРОЛИРУЮЩЕГО ПОПУЛЯЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

© 2019 г. А. В. Летаров^{a, b, *}, М. А. Летарова^a, Е. Е. Куликов^a

^aИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, 119192 Россия

*e-mail: letarov@gmail.com

Поступила в редакцию 16.06.2019 г.

После доработки 08.07.2019 г.

Принята к публикации 29.07.2019 г.

В последние годы в литературе неоднократно высказывалось предположение, что бактериофаги возбудителя мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei*, родственные фагу Вр-AMP1, могут быть существенным фактором, контролирующим популяции этой бактерии в агроэкосистемах регионов, эндемичных по мелиоидозу. Предполагается, что свойственная этим вирусам зависимость жизненного цикла от температуры может обуславливать модуляцию природного фагового биоконтроля и вносить вклад в сложную феноменологию сезонной динамики заболеваний мелиоидозом. Для успешного развития исследований по физиологии инфекции фага Вр-AMP1 были уточнены сведения об организации его генома. В настоящей работе было установлено истинное положение физических концов вирионной ДНК; выявлено присутствие терминальных повторов длиной в 389 п.н., а также проведена ревизия аннотации генома данного бактериофага.

Ключевые слова: бактериофаг Вр-AMP1, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, геномика, мелиоидоз

DOI: 10.1134/S0026365619060089

Возбудитель мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei* является естественным обитателем почвенных и водных экосистем в регионах мира, эндемичных по данному заболеванию (Limmathurotsakul et al., 2016). Заражение мелиоидозом обычно происходит в результате контакта человека с почвой, поэтому наиболее подвержены данной инфекции работники сельскохозяйственной отрасли. Предшествующие исследования показали, что в почвах и воде агроландшафтов (преимущественно рисовых полей) северо-восточного Таиланда, наряду с *B. pseudomallei*, содержатся бактериофаги этой бактерии, причем большинство изолятов фагов, несмотря на то, что они получены в различных географических пунктах, близкородственны друг другу. Типовым представителем данной группы фагов является бактериофаг Вр-AMP1 (Gatedee et al., 2011; Shan et al., 2014; Withatanung et al., 2016). Интересно, что фаг Вр-AMP1 инфицирует не только *B. pseudomallei*, но и близкородственный непатогенный вид *B. thailandensis*, который также встречается в почве и воде северо-

восточного Таиланда и других эндемичных по мелиоидозу регионов. Это существенно облегчает работу с бактериофагом, поскольку большинство лабораторных экспериментов можно проводить с использованием непатогенного хозяина без применения специальных мер безопасности.

Интересной особенностью физиологии инфекции фага Вр-AMP1 является то, что этот вирус эффективно лизирует клетки хозяев и образует хорошо заметные бляшки на их газонах при 37°C, однако при 25°C этого не происходит (Shan et al., 2014). Авторы предположили, что инфекция клеток при пониженной температуре ведет к образованию лизогенных (или, возможно, псевдолизогенных) бактерий, которые стабильно размножаются в этих условиях, однако подвержены лизису при повышении температуры (Shan et al., 2014). Математическое моделирование динамики развития популяций бактерий и бактериофагов в воде (например, в воде рисовых чеков) с учетом описанного эффекта показало, что фаги могут вносить существенный вклад в регуляцию чис-

ленности свободных и вирус-инфицированных (лизогенных или псевдолизогенных) бактерий в различных условиях. При этом конкретный результат существенно зависит не только от температуры, но и от других факторов, например, прозрачности воды для ультрафиолетового излучения (Egilmez et al., 2018). Действие подобных факторов по-видимому может объяснить наблюдаемые различия в сезонной динамике мелиоидоза в соседних районах северо-восточного Таиланда, которые не различаются климатически. Постулируемая важная экологическая роль, которую играют Вр-АМР1-подобные вирусы, делает актуальным детальное исследование молекулярных и физиологических механизмов, лежащих в основе температурного контроля развития жизненного цикла этих фагов.

Экспериментальная работа с фагом Вр-АМР1 существенно облегчается тем фактом, что полная геномная последовательность данного бактериофага была определена, аннотирована и депонирована ранее (Shan et al., 2014). Из числа биологически охарактеризованных вирусов одними из наиболее генетически родственных фагу Вр-АМР1 оказались описанные нами ранее колифаги phiKT и фаг PGT2, который очень близок к phiKT (83% идентичности полных нуклеотидных последовательностей геномов) (Golomidova et al., 2018).

Проведенное нами биоинформационное сравнение депонированной последовательности Вр-АМР1 (GenBank ID HG793132) и фага phiKT (GenBank ID NC_019520) обнаружило существенное различие в организации их генетической карты, имеющее вид кольцевой перестановки геномного фрагмента. Мы предположили, что указанное различие является артефактом, связанным с неверным определением физических концов генома в одной из последовательностей. Поскольку приблизительное положение концов генома фага phiKT ранее было нами проверено экспериментально (наши неопубликованные данные), то наиболее вероятным мы сочли ошибочное расположение концов в депонированной последовательности фага Вр-АМР1. Более того, и фаг Вр-АМР1, и фаг phiKT представляют собой вирусы, отдаленно родственные бактериофагу T7 (Shan et al., 2014; Golomidova et al., 2018). Для фага T7 и подобных ему вирусов свойственно наличие прямых концевых повторов генома протяженностью в несколько сотен пар нуклеотидов (Molineux, 2006). Эти повторы были обнаружены у родственных Вр-АМР1 колифагов phiKT и PGT2 (Golomidova et al., 2018), но их наличие не отражено в депонированной геномной последовательности фага Вр-АМР1.

Сравнение опубликованных геномов фагов phiKT и Вр-АМР1 позволило предположить, что в депонированной последовательности последнего фрагмент около 5000 п.н. от левого физического

конца геномной ДНК до 1 н.п. депонированной последовательности оказался размещен на правом конце генома. Для проверки этого предположения необходимо было провести повторный анализ ДНК бактериофага.

Бактериофаг Вр-АМР1 и штамм хозяина *B. thailandensis* DW503 были любезно предоставлены нам проф. Martha Clokie (University of Leicester, UK). Фаг был выращен согласно стандартным процедурам (Shan et al., 2014), и его геномная ДНК была выделена в препаративных количествах.

Анализ последовательности генома с помощью модуля GeneQuest программного пакета Lasergene 8 ("DNASar", США) позволил подобрать эндонуклеазы рестрикции, для которых в геноме фага Вр-АМР1 имеются сайты, расположенные поблизости от предполагаемых физических концов упакованной в вирионы ДНК. В частности, нами были выбраны ферменты *NheI* и *HindIII*. С помощью этих эндонуклеаз был проведен гидролиз фаговой ДНК. Продукты гидролиза разделяли в 1% агарозном геле, при этом выбор нагрузки дорожек позволил визуализировать небольшие фрагменты. Полученные электрофореграммы сравнивали с теоретическими профилями фрагментов, рассчитанными, исходя из искусственно замкнутой в кольцо уникальной последовательности генома (рис. 1). Из полученных данных было очевидно, что левый конец генома содержится в *NheI*-фрагменте ~350 п.н., так как в уникальной последовательности генома имеется лишь один сайт *NheI*, расположенный вблизи предполагаемого левого конца. Соответственно, один из концов короткого *NheI*-фрагмента должен быть образован физическим концом генома. Этот же конец содержится и в *HindIII*-фрагменте длиной около 770 п.н., который исчезает при дополнительном гидролизе ферментом *NheI* (рис. 1).

Для точной локализации левого конца генома *HindIII* фрагмент длиной ~770 п.н. был элюирован из геля и направлен на секвенирование по Сэнгеру с обратным праймером AMP-LendR (5'-CACAGGCAGCACAGCACA), гибридизующимся примерно в 500 п.н. правее предполагаемого левого конца генома. По резкому обрыву сигнала (рис. 2) удалось установить положение левого конца, начиная с последовательности tagcgccg-ss.....

После того, как была получена последовательность генома с выверенным положением левого конца, стало очевидно, что профиль рестриционных фрагментов фага по ферменту *HindIII* отличается от предсказанного отсутствием фрагмента ~1300 п.н. Указанный фрагмент должен содержать правый конец генома. Вместо фрагмента ~1300 п.н. в экспериментально определенном профиле рестриционных фрагментов присутствовал фрагмент около 500 п.н., который отсутствует в теорети-

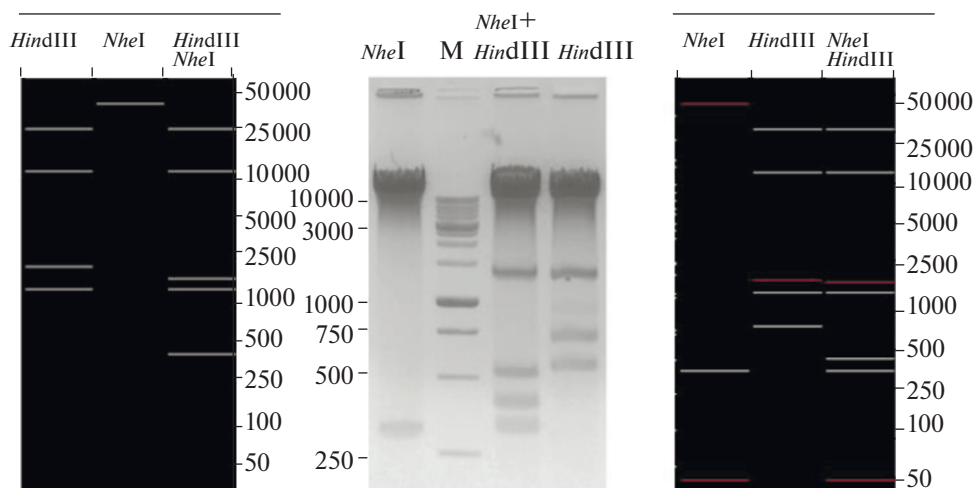


Рис. 1. Слева – предсказанный рестрикционный профиль ДНК фага Bp-AMP1, исходя из искусственно замкнутой в кольцо уникальной последовательности генома. В центре – разделения рестрикционных фрагментов ДНК фага Bp-AMP1 в 1% агарозном геле с маркером 1kb Ladder (“СибЭнзим”, Россия). Справа – предсказанный рестрикционный профиль для линейной откорректированной последовательности с учетом терминальных повторов.

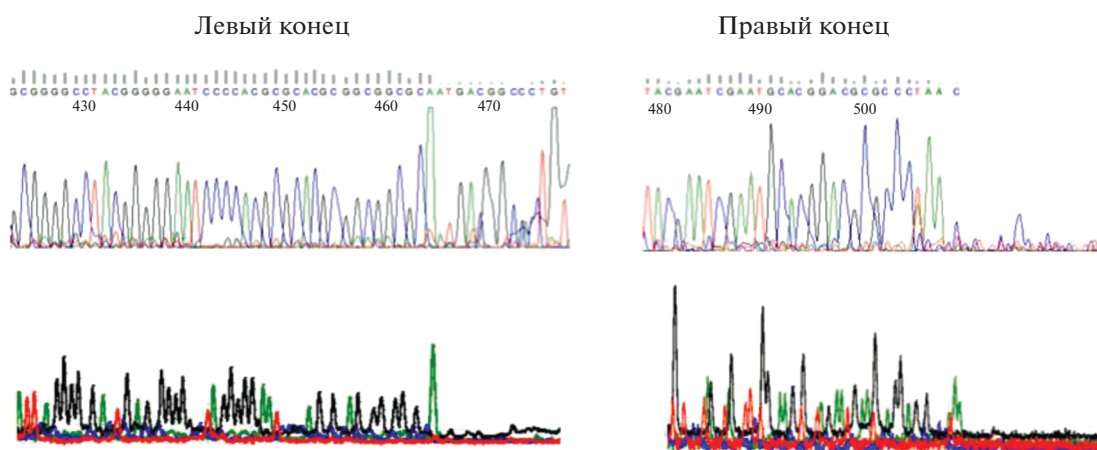


Рис. 2. Хроматограммы автоматического секвенирования по Сэнгеру фрагментов, содержащих физические концы ДНК фага Bp-AMP1 (run-off эксперимент). Верхние панели – обработанные данные, нижние панели – исходные данные (raw data).

чески рассчитанном профиле. Это свидетельствовало о предположительном наличии у варианта фага, с которым мы работали, обширной делеции около 1000 п.н. в районе гена интегразы. Наличие данной делеции было подтверждено с помощью ПЦР (данные не приводятся). Используя ПЦР-скрининг фаговых бляшек, мы обнаружили вариант фага, в котором такой делеции нет. Его профиль рестрикционных фрагментов содержал *Hind*III-фрагмент длиной около 1700 п.н. Секвенирование этого фрагмента с праймером AMP-end-D2 (5'-СТ CTG CTG TAC CAG TCA) позволило установить точное положение правого конца по обрыву сигнала секвенирования (рис. 2) по последовательностиggacgccccta. Таким об-

разом, фаг Bp-AMP1 обладает концевыми повторами длиной в 389 п.н.

Для подтверждения соответствия депонированной последовательности, ДНК фага, свободная от делеции в гене интегразы, была направлена на полногеномное секвенирование. Полученная последовательность оказалась идентична ранее депонированной последовательности фага Bp-AMP1. Вместе с тем инспекция имеющейся аннотации генома фага Bp-AMP1 выявила ряд неточностей. Мы вручную отредактировали аннотацию, в результате чего были дополнительно описаны некоторые рамки считывания, уточнены предсказанные функции некоторых фаговых белков. Поскольку в исходной аннотации значительное чис-

ло рамок считывания не имело никакого названия, мы ввели сквозную нумерацию ORF, начиная с идентифицированного нами левого конца генома. Кроме этого, мы добавили к последовательности правый терминальный повтор, в результате чего общая длина последовательности стала составлять 42798 п.н. вместо 42409 п.н. в исходной версии. Полученная аннотированная последовательность депонирована в базу данных GenBank под номером MN191861.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит материалов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Egilmaz H.I., Morozov A.Y., Clokie M.R.J., Shan J., Letarov A., Galyov E.E. Temperature-dependent virus lifecycle choices may reveal and predict facets of the biology of opportunistic pathogenic bacteria // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 9642.

Gatedee J., Kritsiriwuthinan K., Galyov E.E., Shan J., Dubinina E., Intarak N., Clokie M.R., Korbsrisate S. Isolation and characterization of a novel podovirus which infects *Burkholderia pseudomallei* // *Virology*. 2011. V. 8. P. 366.

Golomidova A.K., Kulikov E.E., Kudryavtseva A.V., Letarov A.V. Complete genome sequence of *Escherichia coli* bacteriophage PGT2 // *Genome Announc.* 2018. V. 6. pii: e01370-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01370-17>

Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis // *Nat. Microbiol.* 2016. V. 1. pii: 15008.

Molineux I.J. The T7 group // *The Bacteriophages* / Eds. Calendar R., Abedon S. Oxford, UK—New York, USA: Oxford University Press, 2006. P. 277–301.

Shan J., Korbsrisate S., Withatanung P., Adler N.L., Clokie M.R., Galyov E.E. Temperature dependent bacteriophages of a tropical bacterial pathogen // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. P. 599.

Withatanung P., Chantratita N., Muangsombut V., Saiprom N., Lertmemongkolchai G., Klumpp J., Clokie M.R., Galyov E.E., Korbsrisate S. Analyses of the distribution patterns of *Burkholderia pseudomallei* and associated phages in soil samples in Thailand suggest that phage presence reduces the frequency of bacterial isolation // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016. V. 10. P. e0005005.

Revised Sequence and Annotation of *Burkholderia pseudomallei/thailandensis* Bacteriophage Bp-AMP1—A Potential Agent of Natural Biocontrol of the Populations of the Melioidosis Causative Agent

A. V. Letarov^{1,2,*}, M. A. Letarova¹, and E. E. Kulikov¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119192 Russia

*e-mail: letarov@gmail.com

Received June 16, 2019; revised July 8, 2019; accepted July 29, 2019

Abstract—Significant impact of Bp-AMP1-related bacteriophages on the population dynamics of *Burkholderia pseudomallei* in agroecosystems of the regions endemic for melioidosis has been repeatedly hypothesised in recent years. Temperature-dependent life cycle of these viruses may be responsible for modulation of the natural phage-mediated biocontrol, and thus it may contribute to the complexity of the seasonal dynamics of melioidosis observed. Refined data on Bp-AMP1 phage genome organization are a prerequisite for the ongoing research on infection physiology of this virus. In the present work, location of the physical ends of the virion-encapsidated phage DNA was determined, 389-bp long terminal repeats were revealed, and the annotation of the phage Bp-AMP1 genome sequence was revised.

Keywords: bacteriophage Bp-AMP1, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, genomics, melioidosis