

М. А. Златогурская, Ф. И. Товкач

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,
тел.: +38(044)526 61 57, e-mail: zlatohurska@gmail.com

СТРУКТУРА ВИРИОННЫХ ДНК УМЕРЕННЫХ ЭРВИНИОФАГОВ 49 И 59

Цель работы: сравнительное изучение структуры вирионных ДНК умеренных фагов 49 и 59 *Erwinia «horticola»*. **Методы.** Исследования свойств ДНК бактериофагов осуществлялось с применением стандартной рестрикции, а также биоинформатического анализа. **Результаты.** Геномы изучаемых эрвиниофагов содержат по 84 открытых рамки считывания. Количество генов, кодирующих гипотетические полипептиды с неизвестными функциями, составляет 57 и 52 для фага 49 и 59 соответственно. Поиск в базе данных NCBI показал, что фаг 49 не имеет вирусных гомологов среди референсных геномов вирусов прокариот. Для бактериофага 59 таковым является фаг ENT47670 бактерии *Cronobacter sakazakii*. Между собой эрвиниофаги демонстрируют 47% гомологии первичной последовательности нуклеотидов. Большинство обнаруженных идентичных открытых рамок считывания относится к структурной области генома, а также к модулю лизиса клеток бактерии-хозяина. Установлено, что геномы обоих фагов циклически пермутированы и упаковываются в соответствии с *headful*-механизмом. 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. **Выводы.** Умеренные бактериофаги 49 и 59 *E. «horticola»* неидентичные другим известным вирусам прокариот и принадлежат к уникальным фагам семейства *Siphoviridae*.

Ключевые слова: умеренные бактериофаги 49 и 59, *headful*-механизм упаковки, циклическая и дискретная пермутация.

Благодаря стремительному развитию 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 описуються рідко, а інформація про їхні властивості є надзвичайно обмеженою, незважаючи на величезну практичну значимість цих фітопатогенних бактерій.

Раніше були виявлені три ервініофаги – 49, 59 і E105. Два з них, 49 і 59, представляють собою помірні фаги, здатні лізувати та лізогенізувати клітини фітопатогенної бактерії *Erwinia «horticola»* [3]. Наступні дослідження показали, що їхні геноми характеризуються значущою ступенем гомології, зокрема до структурних поліпептидів капсиду та хвостового відрізка [4]. Для вірионної ДНК фага 59 було встановлено неперервний характер кільцевої перестановки нуклеотидів та кінцева надлишковість на 2,2%. Геном фага 49, ймовірно, є циклічно перемутуваним, і його перемутація, швидше за все, має дискретний характер [4, 5]. При аналізі первинної послідовності ДНК нам не вдалося отримати підтвердження цим фактам. У зв'язі з цим метою даної роботи було вивчення структури вірионної ДНК, а також виконання попереднього порівняння геномів ервініофагів 49 і 59 на основі даних геноміки та рестрикційного аналізу.

Матеріали та методи

У роботі використовували ДНК помірних бактериофагів 49 і 59 *E. «horticola»*. Виділення ДНК та рестрикційний аналіз були виконані за схемою, наведеною в роботі [4]. Використовували наступні ендонуклеази рестрикції: *HpaI*, *EcoRI*, *SmaI*, *SalI*, *KpnI*, *XhoI*, *DraI* та *BglII*.

Первинна послідовність геному була встановлена за допомогою технології Illumina Solexa. Аналіз та візуалізація даних секвенування виконувалися за допомогою наступних програм: аналіз ГЦ-складу нуклеотидних послідовностей – DNA/RNA GC Content Calculator, пошук відкритих рамок читання – GLIMMER, GeneMark.hmm 2.0, пошук сайтів рестрикції – APE plasmid, парне вирівнювання нуклеотидних послідовностей геномів – mVista, CG view, пошук тРНК – tRNAscan-SE, ARAGORN, дот-плот порівняння геномів – PipeAlign. Порівняння нуклеотидних та амінокислотних послідовностей відносно референсних геномів, генів та амінокислотних баз NCBI проводилося за допомогою інструментів BLASTn та BLASTp.

Результати та їх обговорення

Виходячи з попереднього біоінформатичного аналізу ДНК, фаг 49 має геном розміром 46,8 тисяч пар нуклеотидів, для фага 59 цей показник становить 48,1 тисяч пар нуклеотидів, що добре узгоджується з даними попередніх досліджень [4]. Вміст ГЦ-пар є приблизно однаковою для обох вірусів і становить близько 50% (таблиця). У геномах фагів також виявлено однакове число відкритих рамок читання (84). Кількість виявлених гіпотетичних поліпептидів становить 57 і 52 для фагів 49 і 59, відповідно.



Таблица

Сравнение геномов фагов 49 и 59

Table

Comparison of phages 49 and 59 genomes

Характеристика	Фаг	
	49	59
Размер генома, т.п.н.	46,8	48,1
ГЦ-состав, %	50,8	50,5
Открытые рамки считывания	84	84
Гипотетические полипептиды	57	52
тРНК	–	тРНК ^{arg}

Поиск гомологических нуклеотидных последовательностей в базе данных NCBI показал, что фаг 49 не имеет гомологов среди геномов референсных бактериофагов. В случае фага 59 наибольшей степенью гомологии характеризуется фаг ENT47670 микроорганизма *Cronobacter sakazakii* (NC_019927.1). 25% его генома выравняется относительно нуклеотидных последовательностей геномной ДНК фага 59 с показателем идентичности в 72%. Нуклеотидные последовательности с большей степенью гомологии к ДНК фагов 49 и 59 были найдены среди геномов бактерий *Escherichia coli* 09-00049 (NZ_CP015228.1), *C. sakazakii* CMCC 45402 (CP006731.1), ATCC BAA-894 (NC_009778.1), *Cronobacter universalis* NCTC 9529 (NZ_CAKX00000000.1), *Yersinia enterocolitica* FORC-002 (NZ_CP009456.1), *Pantoea* sp. PSNIH1 (NZ_CP010325.1), а также *Erwinia* sp. Leaf53 contig_9 (NZ_LMLK01000027.1). С помощью программы PHASTER (<http://phaster.ca/>) удалось установить, что данные бактериальные геномы имеют в своем составе ряд интактных и дефектных профаговых элементов.

Между собой эрвиниофаги демонстрируют 47% гомологии первичной последовательности нуклеотидов (рис. 1). Этот факт также согласуется с дан-

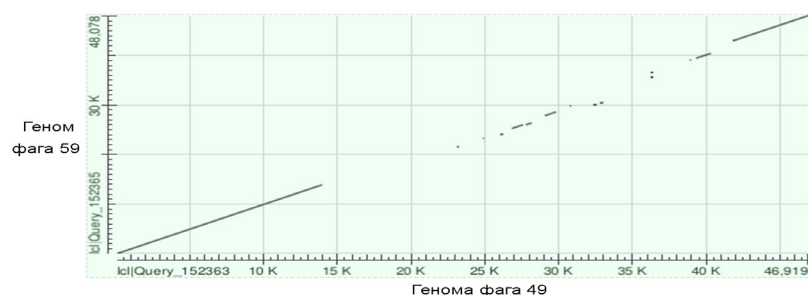


Рис. 1. Выравнивание последовательностей генома бактериофага 59 к геному фага 49

Fig. 1. Alignment of phages 49 and 59 genome sequences



ними предыдущих исследований, в которых при помощи блот-гибридизации установлено 50% гомологии ДНК фагов 49 и 59 [6]. Сравнение геномов эрвиниофагов обнаружило 30 идентичных генов, которые кодируют структурные белки головки, белки лизиса бактерии-хозяина, а также 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 *SmaI*-гидролизе вирионной ДНК фага 59 происходит от гетерогенных концов молекул ДНК и рас-сайта (рис. 2, IA). 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 схожей схеме, однако пермутация его генома имеет дискретный характер. Об этом свидетельствует как отсутствие гетерогенных концевых фрагментов, так и наличие двух субмолярных фрагментов «а» и «b» при *KpnI*-гидролизе (рис. 2, IIА).

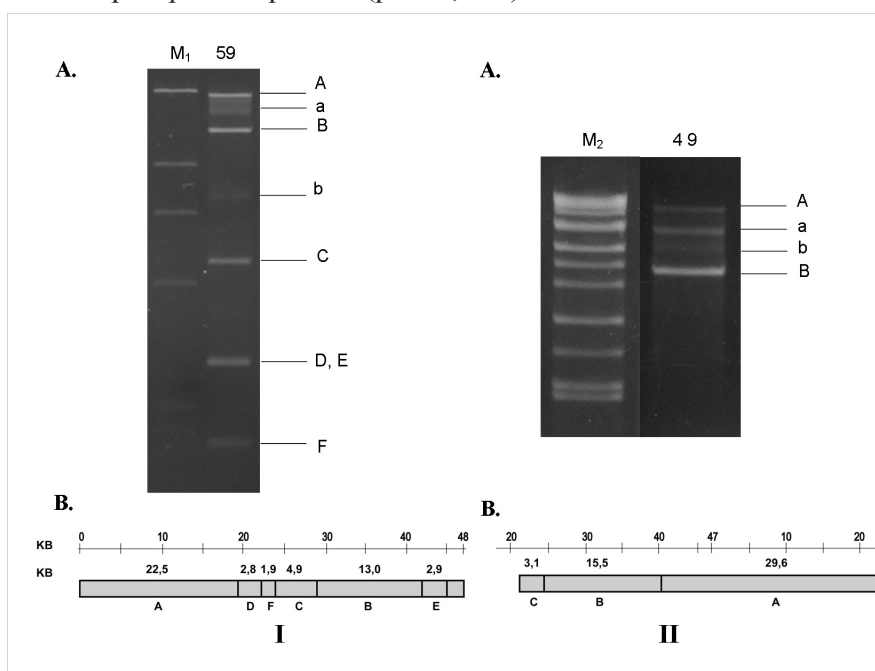


Рис. 2. I: А – *SmaI*-гидролиз вирионной ДНК фага 59. М₁ – *HindIII* фрагменты ДНК бактериофага λ; В – *SmaI*-сайты в геномной ДНК фага 59. II: А – *KpnI*-гидролиз вирионной ДНК фага 49. М₂ – λ Mix Marker, 19 (Fermentas, USA); В – *KpnI*-сайты в геномной ДНК фага 49. а, b – дополнительные фрагменты.

Fig. 2. I: А – *SmaI* digestion pattern of the phage 59 virion DNA. М₁ – *HindIII*-fragments of λ DNA; В – *SmaI* restriction map of the phage 59 genomic DNA. II: А – *KpnI* digestion pattern of the phage 49 virion DNA. М₂ – λ Mix Marker, 19 (Fermentas, USA); В – *KpnI* restriction map of the phage 49 genomic DNA. а, b – additional fragments.

Еще один «аномальный» фрагмент был обнаружен при электрофоретическом разделении продуктов двойного гидролиза ДНК фага 49 эндонуклеазами *KpnI* и *XhoI*. Так как данный субмолярный фрагмент размером 11 тысяч пар нуклеотидов не исчезал при увеличении концентрации рестриктаз, он, скорее всего, является рас-фрагментом, образованным при гидролизе генома 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 был обнаружен необычный сайт, который в стандартных условиях не подвергался полному расщеплению рестриктазой *SmaI*, о чем может свидетельствовать дополнительный фрагмент «а» размером около 18 тысяч пар нуклеотидов (рис. 3 А, В).

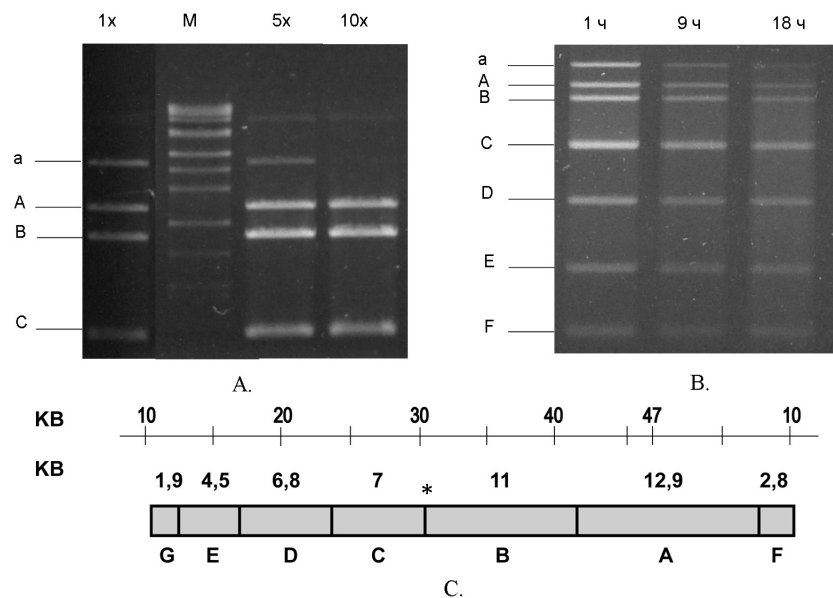


Рис. 3. Влияние концентрации фермента (А) и элонгации инкубации (В) на *SmaI*-рестрикционный паттерн вирионной ДНК фага 49
 а – «аномальный» фрагмент. С – *SmaI*-сайты рестрикции геномной ДНК фага 49;
 * – «аномальный» сайт.

Fig. 3. Effect of ferment concentration (A) and elongation of incubation time (B) on *SmaI* restriction pattern of the phage 49 virion DNA
 а – “abnormal fragment”. С – *SmaI* restriction map of the phage 49 genomic DNA;
 * – “abnormal site”.

Для установления происхождения этого «аномального» фрагмента применили две стратегии: удлинение времени реакции гидролиза ДНК и увеличение концентрации фермента. Как видно на рисунке 3А, по мере увеличения концентрации рестриктазы интенсивность свечения на электрофореграмме «аномального» фрагмента уменьшалась вплоть до полного исчезновения по-



лосы при десятикратной концентрации эндонуклеазы. В то же время пропорционально увеличивалась интенсивность фрагментов В и С размером 11 и 7 тысяч пар нуклеотидов, соответственно. Схожий эффект наблюдался при увеличении времени реакции, хотя полного гидролиза данного фрагмента после 24 часов инкубации реакционной смеси так и не удалось достичь.

В литературе подобные аномальные сайты связывают как с наличием частичного метилирования, 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, что 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 предоставляется возможным.

Таким образом, сравнительный анализ сайтов рестрикции с использованием традиционного и биоинформатического подходов достоверно показал, что геномы эрвиниофагов 49 и 59 являются циклически пермутированным. 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 указывают 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 Andrew Kroponski (University of Guelph, Канада) за помощь в сборке фаговых геномов.

М. А. Златогурська, Ф. І. Товкач

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,
тел.: +38(044)526 61 57, e-mail: zlatohurska@gmail.com

СТРУКТУРА ВІРІОННИХ ДНК ПОМІРНИХ ЕРВІНІОФАГІВ 49 І 59

Реферат

Мета роботи: порівняльне вивчення структури вірионних ДНК помірних фагів 49 і 59 *Erwinia «horticola»*. **Методи.** Дослідження властивостей ДНК бактеріофагів здійснювалося за допомогою стандартної рестрикції, а також біоінформатичного аналізу. **Результати.** Геноми досліджуваних ервініофагів містять по 84 відкриті рамки зчитування. Кількість генів, що кодують гіпотетичні поліпептиди з невідомими функціями, складає 57 та 52 для фага 49 і 59 відповідно. Пошук в базах даних NCBI показав, що фаг



49 не має вірусних гомологів серед референсних геномів вірусів прокаріот. Для бактеріофага 59 таким є фаг ENT47670 бактерії *Cronobacter sakazakii*. Між собою ервініофаги демонструють 47% гомології первинної послідовності нуклеотидів. Більшість виявлених ідентичних відкритих рамок зчитування належить до структурної області генома, а також до модуля лізису клітин бактерії-хазяїна. Встановлено, що геноми обох фагів є циклічно пермутованими і упаковуються згідно з headful-механізмом. Пермутація ДНК фага 59 являється неперервною, в той час як у фага 49 вона має дискретний характер. Віріонна ДНК фага 49 має аномальний *SmaI*-сайт, котрий, на відміну від інших сайтів ендонуклеази *SmaI* не піддається повному гідролізу.

Висновки. Помірні бактеріофаги 49 і 59 *E. «horticola»* являються неідентичними іншим відомим вірусам прокаріот і належать до унікальних фагів родини *Siphoviridae*.

Ключові слова: помірні бактеріофаги 49 і 59, headful-механізм упаковки, циклічна та дискретна пермутація.

M. A. Zlatohurska, F. I. Tovkach

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Acad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine, tel.: +38(044)526 61 57, e-mail: zlatohurska@gmail.com

VIRION DNAs STRUCTURE OF TEMPERATE ERWINIOPHAGES 49 AND 59

Summary

The aim was to conduct a comparative study of the phages 49 and 59 virion DNAs. **Methods.** Properties of phage DNA were studied using the standard restriction and bioinformatic analyses. **Results.** The genomes of erwiniaphages 49 and 59 encode 84 open reading frames. 57 and 52 hypothetical proteins with unknown function were identified within the genome of phage 49 and 59, respectively. The search through NCBI databases indicates that phage 49 has no viral homologs among genomes of prokaryotic viruses. In case of phage 59, it is *Cronobacter sakazakii* bacteriophage ENT47670. It was identified that the phages 49 and 59 share 47% homologies of nucleotide sequences. Most of identical open reading frames belong to the structural region of the genome and the host cell lysis module. It has been shown that the genomes of both bacteriophages are permuted and packaged according to the headful mechanism. Phage 59 is characterized by circular permutation of the genome, while phage 49 has discrete permutation. The virion DNA of phage 49 has an abnormal cleavage site for *SmaI* restriction enzyme that, unlike the rest *SmaI*-sites, is not completely hydrolyzed. **Conclusions.** Temperate bacteriophages 49 and 59 are not identical to the other known prokaryotic viruses and belong to unique phages of *Siphoviridae* family.

Key words: temperate bacteriophages 49 and 59, the headful packaging mechanism, circular and discrete permutation.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ackermann H. W., Kropinski A. M. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes // Res Microbiol. – 2007. – 158, № 7. – P. 555–566. doi: 10.1016/j.resmic.2007.07.006.
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 // Methods Mol Biol. – 2009. – 502. – P. 91–111. doi: 10.1007/978-1-60327-565-1_7.
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. – P. 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 Ген Микробиол Вирусол. – 1988. – 1. – P. 20–24.
6. Кишко Я. Г., Григорян Ю. А., Товкач Ф. И., Рубан В. И., Машиковский Н. Н. Изучение гомологии умеренных вирусов полилизогенной культуры *Erwinia caratovora* // Доклады академии наук СССР. – 1984. – 277, № 5. – P. 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. – Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. – 155 p.
9. Armstrong K., Bauer W. R. Preferential site-dependent cleavage by restriction endonuclease *Pst*I. // Nucleic Acids Research. – 1982. – 10, № 3. – P. 993–1007.

References

1. Ackermann HW, Kropinski AM. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes. Res Microbiol. 2007;158(7):555-566. doi: 10.1016/j.resmic.2007.07.006.
2. Sherwood R, Casjens SR, Gilcrease EB. Determining DNA packaging strategy by analysis of the termini of the chromosomes in tailed-bacteriophage virions. Methods Mol Biol. 2009;502:91-111. doi: 10.1007/978-1-60327-565-1_7.
3. Tovkach FI, Grigoryan YuA, Ruban VI, Kishko YaG. The comparative characteristics of temperate *Erwinia caratovora* 268 phages. Microbiol Z. 1985;47(1):59-64 (in Russian).
4. Tovkach FI, Shevchenko TV, Gorb TE, Mukvich NS, Romanyuk LV. Comparative studies of temperate erwiniophage 49 and 59. Microbiol Z. 2002;64(2):65-81 (in Russian).
5. Tovkach FI, Grigoryan YuA, Ruban VI, Danileichenko VV, Kishko YaG. Restriction map of the permuted DNA of *Erwinia carotovora* temperature bacteriophage 59. Mol Gen Mikrobiol Virusol. 1988;1:20–24 (in Russian).



6. Kishko YaG, Grigoryan YuA, Tovkach FI., Ruban VI, Mashkovsky NN. Study of homology of temperate viruses of polylysogenic culture of *Erwinia carotovora* 268. Reports of the National Academy of Sciences of USSR. 1984;277(5):1250-1251 (in Russian).

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):3640-3659.

8. Ptashne MA. Genetic Switch: Phage Lambda. – Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2004. – 155 p.

9. Armstrong K, Bauer WR. Preferential site-dependent cleavage by restriction endonuclease *Pst*I. Nucleic Acids Research. 1982;10(3):993-1007.

Стаття надійшла до редакції 11.12.2017 р.

