

УДК 577.2

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУКТА ГЕНА *wac* БАКТЕРИОФАГА JS98C3, БЛИЗКОРОДСТВЕННОГО ФАГУ JS98

О.Р. Латыпов, А.К. Голомидова, А.В. Летаров

Аннотация

Бактериофаг *E. coli* JS98C3, относящийся к семейству T4-подобных, был выделен из проб фекалий лошади в г. Москва. Анализ нуклеотидной последовательности гена 23 данного бактериофага показал высокую степень гомологии (95%) с последовательностью гена 23 фага JS98, изолированного в 2004 г. в Бангладеш из стула пациентов с симптомами диареи. Секвенирование случайных клонов ДНК этого бактериофага также подтвердило высокую степень сходства геномов фагов JS98C3 и JS98. Нами была определена полная нуклеотидная последовательность гена *wac* фага JS98C3. Эта последовательность кодирует белок, высокоомологичный продукту гена (*pg*) *wac* фага JS98, однако, в С-концевом домене его имеется делеция 225 аминокислотных остатков (по отношению к последовательности *pg wac* бактериофага JS98). Клонирование и последующая экспрессия этого гена показала, что белок *pg wac* фага JS98C3 растворим, обладает компактной нативной конформацией. Мы также определили последовательность гена 36 фага JS98C3, С-концевой домен продукта которого предположительно формирует белок-белковое взаимодействие с *pg wac*. Последовательность *pg 36* фага JS98C3 близко родственна последовательности *pg 36* фага JS98.

Введение

Бактериофаги, вирусы бактерий, – наиболее распространенные биологические объекты на нашей планете. По некоторым оценкам их количество превосходит количество бактерий в 5–25 раз [1, 2], и в масштабах всей биосферы достигает 10^{30} [3].

T4-подобные бактериофаги – это широко распространенная группа литических бактериофагов, имеющих генетические гомологии и морфологическое сходство с хорошо изученным фагом *E. coli* T4. В силу особенностей их жизненного цикла и схемы организации генома эти бактериофаги представляют собой очень привлекательную модель для исследования эволюции на уровне генетических модулей. Кроме того, интерес к сравнительной геномике и эволюции T4-подобных бактериофагов в последние годы растет благодаря возможности их применения в качестве терапевтического агента [4].

В настоящее время в отношении бактериофагов, родственных T4, существует широко распространенная и весьма убедительная теория, объясняющая изменения спектра их хозяйской специфичности модульными перестановками доменов белков хвостовых фибрилл и ассоциированных с ними адгезинов [5]. Адгезины – это белки, непосредственно взаимодействующие с рецепторными молекулами на поверхности бактериальных клеток, а потому играющие крайне

важную роль в определении спектра хозяйской специфичности бактериофагов [5, 6]. Частица бактериофага T4 содержит три набора фибриллярных структур с различными функциями: длинные хвостовые фибриллы (ДХФ), которые принимают участие в обратимой адсорбции фага; короткие хвостовые фибриллы, которые участвуют в заключительной, необратимой стадии адсорбции; кодируемый геном *wac* комплекс «воротничок-бакенбарды». «Бакенбарды» представляют собой шесть фибрилл длиной 480 Å, отходящих от шейки фаговой частицы [7, 8]. Эти фибриллы способны временно связываться с ДХФ и должным образом ориентировать их для присоединения к базальной пластинке при сборке фаговой частицы [9, 10]. Кроме того, «бакенбарды» в случае бактериофага T4 несут функцию молекулярного сенсора, предотвращающего инфекцию в неблагоприятных условиях (например, высокая ионная сила раствора, низкий pH). Данный сенсор функционирует за счет временного связывания С-концевого домена фибритина («бакенбарды») со средним участком ДХФ, что обеспечивает удерживание последней в поднятом состоянии [10, 11]. Фибритин представляет собой тримерную альфа-спиральную coiled-coil структуру, фланкированную маленькими глобулярными N- и С-концевыми доменами [9, 12, 13]. В то время как N-домен (30 а.о.) необходим только для прикрепления тримера к «шейке» бактериофага, С-концевой домен, состоящий из 50 а.о., несет двойственную функцию: он является затравкой фолдинга всей молекулы (фолдоном), а также играет важную роль в упомянутом выше связывании с ДХФ [9, 14].

На данный момент известны нуклеотидные последовательности генов *wac* многих бактериофагов, родственных T4. Практически во всех случаях при высокой гомологии N-концевых доменов наблюдалось отличие на аминокислотном уровне в средних, coiled-coil доменах (правда, с сохранением типичной для данных структур гептадной симметрии). Что же касается С-концевых доменов, то их последовательность у большинства бактериофагов в каждом случае оказывалась новой, замещенной в результате модульной перестановки. Сходные перестановки были также обнаружены в С-концевых доменах пг 36 этих бактериофагов, являющихся, по всей видимости, мишенью для связывания ДХФ с фибритином [15].

Данная работа посвящена исследованию одного из частных случаев природных мутаций в гене *wac* вновь изолированного бактериофага JS98C3.

1. Материалы и методы

1.1. Бактериальные штаммы и культивирование бактерий и бактериофагов. В качестве индикаторного штамма мы использовали дериват штамма *E. coli* K12 C600 (*F*⁻, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *supE44*).

Для клонирования и получения плазмидной ДНК нами применялся штамм *E. coli* DH5 (*F*⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *relA1*).

Экспрессию гена *wac* проводили в клетках *E. coli* штамма BL21 (DE3) (*gal hsdS* (λ cI857 *ind-1* *Sam7* *nin5* *lacUV5-T7* gene)).

Для культивирования клеток *E. coli* мы применяли стандартную среду Luria-Bertani (LB). Отдельные фаговые бляшки получали в двухслойном агаре [17].

Экстракцию фаговых частиц из вырезанных 1-миллиметровым капилляром бляшек проводили в 40 мкл физиологического раствора в течение 1 ч при 4°C.

1.2. Изоляция бактериофагов. Проба фекалий лошади (20 г) была гомогенизована в 80 мл фагового буфера (0.2 М NaCl, 0.1 г/л азида натрия, 1 г/л Tween 20). Затем суспензия перемешивалась на роторной качалке 1 ч при комнатной температуре, после чего аликвоты были центрифугированы в течение 2 мин на микроцентрифуге при 12000 об/мин. Супернатант использовался для высева на культуру клеток индикаторного штамма.

1.3. Выделение фаговой ДНК и ее гидролиз. Фаговый лизат, полученный выращиванием с единичной бляшки, обрабатывали при комнатной температуре в течение 1 ч ДНКазой I в концентрации 0.01 мг/мл. Затем его осаждали ультрацентрифугированием в бакет-ротаторе при 90000 g в течение 1 ч. Осадок бактериофага осторожно ресуспендировали в буфере SM (50 mM Трис-HCl, (pH 7.6), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), после чего использовали для фенольной экстракции ДНК [16]. Гидролиз фаговой ДНК проводили эндонуклеазой рестрикции DraI (Fermentas, Литва) в условиях, предписанных производителем.

1.4. Библиотека случайных клонов и выделение плазмидной ДНК. ДНК бактериофага JS98C3, гидролизованную эндонуклеазой рестрикции DraI, осаждали этанолом, после чего ресуспендировали в деионизованной воде и клонировали в плазмидный вектор T-system PCR cloning kit (Promega, США) в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР-скринингом нами отбирались плазмидные конструкции размером 1–2 тыс. п.о. Плазмидную ДНК выделяли при помощи набора Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, США).

1.5. ПЦР, олигонуклеотидные праймеры и секвенирование. Для ПЦР-амплификации и секвенирования случайных клонов из плазмидной библиотеки нами применялись стандартные праймеры M13F и Sp6 (Fermentas, Литва).

Для обнаружения бактериофагов, родственных T4 мы применяли вырожденные олигонуклеотидные праймеры к гену 23 [17], MZIA1bis (5'-GAT ATT TGI GGI GTT CAG CCI ATG A) и MZIA6 (5'-CGC GGT TGA TTT CCA GCA TGA TTT C) в концентрации 0.5 пМ/мкл. Ген *wac* амплифицировали и секвенировали с использованием олигонуклеотидов JST12up (5'-AGT TAC CAT (TA)(TC)G TTG A(C\T)G GC), JS13lo (5'-ATA AAA AGC CTG ATA ACC TTT) и JS98_wacM (5'-AAC CGA GTT GAT ATT CTG G). Для амплификации и секвенирования гена 36 использовали олигонуклеотиды JS98_35up (5'-GAA TTT GG(T/C) GT(A/C) AAT GGT ATT CG) и JS98_g37lo (5'-TCT TTT AAG TTA ATA GCC AG(C/T) TC(G/A) CCT TC(A/G) GC).

ПЦР-амплификация производилась в 50 мкл ПЦР-буфера (67 mM Tris-HCl (pH 8.3), 17 mM (NH₄)₂SO₄, 0.001% Tween 20, 2.5 mM MgCl₂, 25 пМ) с Taq-полимеразой производства Sigma (США), 1.25 ед. акт. В качестве матрицы для скрининга использовался 1 мкл экстракта фаговой бляшки. Матрицей для амплификации генов *wac* и 36 служил 1 мкл лизата бактериофага JS98C3 с титром 10⁶ б. о. е./мл.

Полимеразную цепную реакцию проводили в приборе MJ Mini (Bio-Rad, США) в соответствии с программой: первичная денатурация – 3 мин при 93°C,

затем 25 циклов, состоящих из 40 с денатурации при 93°C, 30 с отжига при 56°C и 45 с элонгации при 72°C. Завершалась программа финальной достройкой в течение 3 мин при 72°C.

ПЦР-продукты анализировались путем электрофореза в 1%-ном агарозном геле в 1 × ТАЕ буфере с окрашиванием бромистым этидием [16].

Секвенирование ПЦР-продуктов и случайных клонов проводили на автоматическом секвенаторе Avant 3150 (Applied Biosystems, США) с использованием реактивов фирмы-производителя.

1.6. Электронная микроскопия. Каплю фагового лизата наносили на медную сетку с формвар-углеродным покрытием, после 5 мин инкубации на столе каплю отбирали фильтровальной бумагой. Затем сетку обрабатывали 1%-ным уранилацетатом и исследовали при помощи электронного микроскопа Jeol 100S (Япония) при 25000× увеличении.

1.7. Экспрессия, выделение и очистка пг *wac*. Культуру клеток *E. coli* BL21 (DE3), трансформированных плазмидной конструкцией pGEM12w13 с геном *wac* бактериофага JS98C3, подращивали при интенсивной аэрации на среде LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, при 37°C до $OD_{590} = 0.7$. Затем мы индуцировали экспрессию гена *wac* добавлением ИПТГ (изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид) до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали культуру при интенсивной аэрации и 37°C еще 4 ч. Биомассу осаждали центрифугированием при 6000 g и температуре 4°C в течение 20 мин, после чего ресуспендировали осадок в буфере для лизиса (50 мМ Трис-НСl (pH 8.0), 50 мМ NaCl). К клеточной суспензии добавляли лизоцим до 300 мкг/мл и ДНКазу I до 5 мкг/мл, после 20 мин инкубации на столе она была разрушена при помощи ультразвукового дезинтегратора. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 10000 g и 4°C в течение 10 мин. К осветленному лизату по каплям при интенсивном перемешивании добавляли $(NH_4)_2SO_4$ до 25% от насыщения, затем после 20 мин инкубации при 4°C высоленый белок осаждался центрифугированием при 10000 g и 4°C в течение 10 мин. Грубую очистку целевого белка проводили несколькими циклами дифференциального высаливания насыщенным раствором сульфата аммония. Степень очистки пг *wac* оценивали при помощи ДСН-ПААГ электрофореза в 10%-ном акриламидном геле по методике Лэммли [16] с окраской Кумасси R-250, а также путем измерения соотношения оптической плотности его раствора при длинах волн в 260 и 280 нм. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по методу Брэдфорда с использованием набора реактивов BioRad согласно инструкции фирмы-изготовителя.

1.8. Ограниченный протеолиз. К белку в буфере 50 мМ трис-НСl, pH 8.0, 1 мМ $CaCl_2$ добавляли трипсин (Serva, США) в различных соотношениях и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением ФМСФ до концентрации 2 мМ. Затем добавляли двукратный буфер для образцов, нагревали 3–5 мин в кипящей воде и наносили на ПААГ с ДСН.

2. Результаты

2.1. Выделение Т-4 подобного бактериофага JS98С3. В лаборатории вирусов микроорганизмов Института Микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН уже продолжительное время ведется работа по исследованию смешанных бактериально-фаговых сообществ из кишечника лошади [18]. Мы провели скрининг коллекции полевых изолятов колифагов, полученных в ходе этого исследования, с целью обнаружения бактериофагов, родственных Т-чёрным.

Вырожденные олигонуклеотидные праймеры к консервативным участкам гена 23, кодирующего основную субъединицу головки Т4-подобных бактериофагов были подобраны в 2000 г. группой Н.М. Krisch [17]. За прошедшие годы эти олигонуклеотиды зарекомендовали себя как надежное и удобное средство для быстрой идентификации бактериофагов, родственных Т4, а также установлению их систематического положения [19, 20].

Нами были проскринированы путем ПЦР-амплификации экстракты ДНК из 50 фаговых бляшек различной морфологии, высеванных из смыва фекалий лошади. В 49 случаях полимеразная цепная реакция не прошла, однако в одном случае был получен ПЦР-продукт размером около 540 п.о. Данный ПЦР-продукт был секвенирован с тех же олигонуклеотидных праймеров. Поиск гомологий в базе данных GenBank дал 95%-ное совпадение с последовательностью гена 23 бактериофага JS98, изолированного группой Н. Brussow в 2004 г. в Бангладеш из стула педиатрических пациентов с симптомами диареи [21].

Сконцентрированный и очищенный ультрацентрифугированием препарат фага был исследован методами электронной микроскопии, его морфология оказалась крайне близкой к морфологии бактериофага Т4 (рис. 1).

Кроме того, были секвенированы 3 случайных клона из полученной нами плазмидной библиотеки ДНК этого фага. Первый из этих клонов оказался фрагментом гена 55 (сигма-фактор РНК-полимеразы Т4-подобных фагов) и показал 88%-ное совпадение нуклеотидной последовательности с аналогичным геном фага JS98 (аминокислотная последовательность транслированного клона совпала на 96%). Последовательность второго клона, фрагмента гена 7 (одна из субъединиц базальной пластинки), имела гомологию в 87% (95% – в транслированном виде). Третий клон попал в область, соответствующую пока еще не депонированной в GenBank последовательности фага JS98, однако показал в транслированном виде довольно высокую (77%) гомологию с геном большой субъединицы топоизомеразы II Т-чёрного бактериофага RB69. Нуклеотидные последовательности этих трех клонов депонированы в GenBank под номерами EF618561.1, EF618562.1 и EF618563.1 соответственно.

Таким образом, полученные данные подтвердили генетическое сходство фага JS98С3 с фагом JS98.

2.2. Последовательность гена *wac*. ПЦР-амплификация с подобранных нами вырожденных олигонуклеотидных праймеров с последующим секвенированием ПЦР-фрагмента позволила нам определить полную последовательность гена *wac* фага JS98С3. Нуклеотидная последовательность этого гена депонирована в GenBank под номером EU2244220. Предсказанная аминокислотная последовательность N^o-концевого участка пг *wac* (а.о. 1–48), имеющая значи-

тельную гомологию с последовательностью фибритина фага T4, была практически идентичной в геномах фагов JS98C3 и JS98. Однако пг *wac* JS98 имеет дополнительный С-концевой домен, отсутствующий в пг *wac* фага T4. Длина этого домена составляет 272 а.о. У фага JS98C3 также имеется «дополнительный» домен, однако его длина составляет только 47 а.о. Последовательность С-концевой области пг *wac* фага JS98C3 почти идентична С-концевой последовательности пг *wac* фага JS98. Таким образом, по отношению к последнему пг *wac* фага JS98C3 имеет внутреннюю делецию 225 а.о.

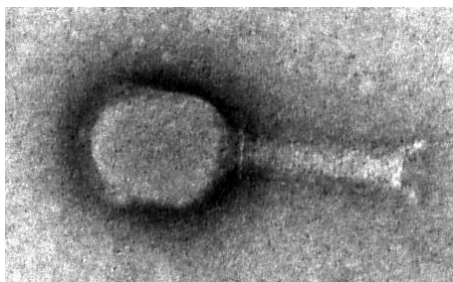


Рис. 1. Электронная микрофотография бактериофага JS98C3

2.3. Последовательность гена 36. Нами были подобраны вырожденные олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие ген 36. Полученный ПЦР-фрагмент по размерам и нуклеотидной последовательности оказался очень близким к гену 36 фага JS98 (номер в GenBank EU224421). Аминокислотная последовательность, кодируемая данными генами, оказалась практически идентичной.

2.4. Фибритин бактериофага JS98C3 и его свойства. Мы проклонировали фрагмент генома фага JS98C3 в плазмидную конструкцию. Фрагмент был амплифицирован с олигонуклеотидов, комплементарных 3'-концу гена 12 и 5'-концу гена 13, и содержал ген *wac* с естественным сайтом инициации трансляции. Экспрессия данного гена в клетках *E. coli* BL21 (DE3) под контролем T7 промотора привела к суперпродукции растворимого и ограниченно ДСН-устойчивого фибритина. Олигомерность белка анализировали путем электрофореза в 10% ДСН-ПААГ, на который наносили препараты белка в стандартном ДСН-буфере для образцов. Образцы были нанесены в двух вариантах: в первом варианте перед нанесением их прогревали 3–5 мин на кипящей водяной бане, во втором варианте их наносили сразу же после смешивания белкового препарата с буфером для образцов (рис. 2). Не прогретые образцы после окрашивания давали тонкую, высокоплотную полосу в верхней части геля, которая свидетельствует о том, что целевой белок находится в ДСН-устойчивом олигомерном состоянии [9].

Для подтверждения того, что фибритин фага JS98C3 образует компактную нативную структуру, мы подвергли его ограниченному протеолизу. К очищенному препарату фибритина в буфере для гидролиза мы добавляли трипсин в разных концентрациях. После 30 мин гидролиза при 37°C мы останавливали реакцию добавлением ФМСФ и анализировали продукты гидролиза электрофорезом в 10% ДСН-ПААГ (рис. 3).

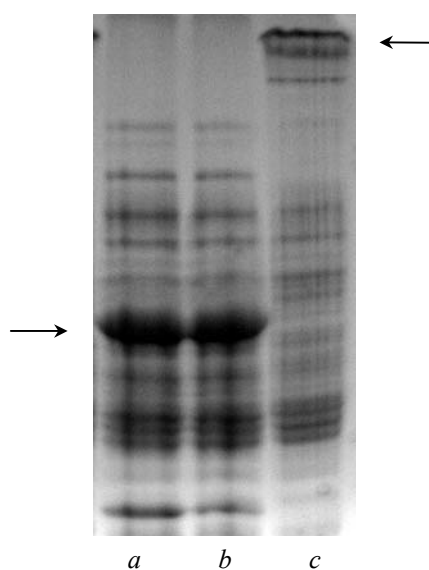


Рис. 2. Анализ экспрессии пг *wac* фага JS98C3 в 10% ПААГ-ДСН: *a* – тотальный препарат белков; *b* – осветленный лизат; *c* – не прогретый перед нанесением осветленный лизат в ДСН-буфере для образцов. Стрелками обозначены полосы, соответствующие пг *wac*

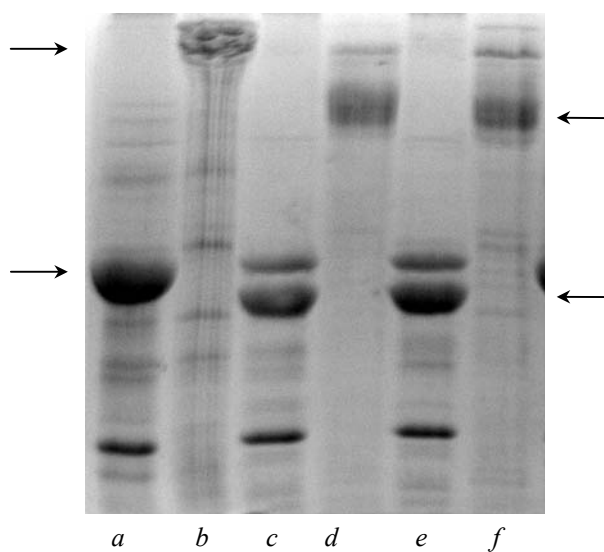


Рис. 3. Анализ гидролиза пг *wac* трипсином в 10% ПААГ-ДСН: *a* – контрольный препарат; *b* – не прогретый контрольный препарат; *c* – препарат пг *wac* после гидролиза трипсином в концентрации 0.5 мкг/мл; *d* – тот же препарат, не прогретый перед нанесением. *e* – препарат пг *wac* после гидролиза трипсином в концентрации 0.01 мкг/мл; *f* – тот же препарат, не прогретый перед нанесением. Стрелками обозначены полосы, соответствующие пг *wac*

Анализ геля показал, что молекулярная масса пг *wac* после гидролиза трипсином несколько уменьшается, однако, даже при внесении трипсина до концентрации 0.5 мкг/мл данный белок не гидролизуеться полностью и остается олигомерным. Это свидетельствует об эффективном сворачивании исследуемого

белка в компактную нативную структуру. Следовательно, имеющаяся делеция в «дополнительном» С-концевом домене не препятствует нормальному фолдингу этого белка.

3. Обсуждение

Факт изоляции бактериофага JS98C3, а также литературные данные [21] дают нам основания предполагать, что близко родственные T4-подобные бактериофаги, одним из архетипов которых является JS98, широко распространены в различных географически удаленных местообитаниях нашей планеты. Данная работа не посвящена их исследованию и описанию путей перемещения бактериофагов на большие расстояния, однако можно предположить, что эти пути могут быть разными, и за их счет пул бактериофагов и их генетических модулей пребывает в постоянном движении. Стоит отметить тот факт, что изолированный нами фаг JS98C3 и фаг JS98, обнаруженный в 2004 г. в Бангладеш, судя по гомологиям их нуклеотидных последовательностей, имеют общего предка, и эволюционное событие, приведшее к их разделению, явно произошло по эволюционным меркам недавно.

Фибритин фага JS98 содержит участок высокой (больше 60%) гомологии с последовательностью фибритина фага T4 и других фагов, близкородственных T-чётным. Предполагается [15] что участок, образующий белок-белковое взаимодействие фибритин – ДХФ у T-чётных фагов, локализован в С-концевых областях фибритина и пг 36 этих фагов. У бактериофага JS98 С-концевая область пг 36 почти идентична таковой фага T4, в отличие от иных фагов дистантно-родственных T-чётным, у которых предполагаемые участки взаимодействия замещены новыми доменами [15]. Это свидетельствует в пользу предположения, что функция образования контакта фибритин ДХФ осталась у этого вируса за теми же участками соответствующих белков, что и у фага T4. Таким образом, роль «дополнительного» С-концевого домена остаётся неясной. Делеция значительной части этого домена у фага JS98C3 не приводит к появлению ответных изменений в последовательности гена 36, что согласуется с предположением о неучастии данного модуля в образовании контакта с ДХФ.

Многообразие С-концевых модулей у бактериофагов, родственных T4, представляет собой эволюционную загадку [23]. Существенно отличающиеся по размеру и предполагаемым вторичным структурам, эти домены либо замещают С-концевой домен (фолдон) фибритина фага T4, являющегося наиболее просто устроенной структурой, либо следуют прямо за ним в виде «довеска» как у фагов JS98 и JS98C3. Подобное многообразие до сих пор не имеет адекватного объяснения: участки белка, инициирующие его фолдинг, обычно бывают эволюционно консервативны. Высокая частота модульных перестановок в этой области фибритина свидетельствует о том, что вирусы получают заметное селективное преимущество в результате части таких событий.

Мы предполагаем, что система, при которой фибритин связывается своим С-концевым доменом с пг 36 в составе длинной хвостовой фибриллы, может действовать не только по схеме, описанной для фага T4, когда в неблагоприятных условиях при сравнительно коротком фибритине его взаимодействие с ДХФ приводит последнюю в поднятое состояние. Возможно, что данная систе-

ма у других бактериофагов, родственных T4, может действовать еще и в другом направлении, а именно, при благоприятных условиях удерживать ДХФ на расстоянии, наиболее способствующем взаимодействию фагового адгезина с молекулой-рецептором на поверхности бактериальной клетки. Подобное ограничение степени подвижности ДХФ может принести бактериофагу некоторые экологические преимущества, в частности, повышать скорость адсорбции в благоприятной для этого ситуации. Это предположение согласуется с наличием в последовательностях многих «новых» С-доменов аминокислотного мотива, соответствующего фолдону бактериофага T4 – предполагаемому региону взаимодействия фибритина с пг 36. Возможно также, что у некоторых фагов С-концевые домены фибритина играют роль дополнительных адгезинов, взаимодействующих с рецепторами на поверхности клеток бактерий, увеличивая таким образом вероятность адсорбции фага у условиях низкой плотности клеток-хозяев [23].

Мы приносим свою искреннюю благодарность Артему Кононенко (Институт Микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН) за неоценимую помощь в подготовке данной рукописи и моральную поддержку.

Summary

O.R. Latypov, A.K. Golomidova, A.V. Letarov. Characterization of the *wac* gene product of bacteriophage JS98C3, which is closely related to the phage JS98.

Bacteriophage JS98C3 of *E. coli*, concerning family of T4-type phages, was isolated from samples of excrements of the horse in Moscow. The analysis of the nucleotide sequence of gene 23 of the new coliphage revealed the high homology (95%) with sequence of gene 23 of a phage's JS98, which had been isolated from faeces of patients with symptoms of a diarrhea in Bangladesh in 2004. Sequencing of random DNA clones of new coliphage also confirmed the high similarity of phage's JS98C3 and JS98 genomes.

Complete nucleotide sequence of the phage's JS98C3 gene *wac* was determined. The protein product encoded by this sequence showed the high homology with the gp *wac* of phage JS98, but differed from it by a deletion of 225 amino acids in C-terminal domain.

Cloning and expression of this gene revealed that the phage's JS98C3 gp *wac* was soluble, and possessed compact native conformation. We also determined the sequence of the phage's JS98C3 gene 36. C-terminal domain of its product presumably formed protein-protein interaction with the gp *wac*. Gene 36 product's sequences of phages JS98C3 and JS98 were in close relationship.

Литература

1. *Balter M.* Virology. Evolution on life's fringes // *Science*. – 2000. – V. 289, No 5486. – P. 1866–1867.
2. *Fuhrman J.A.* Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects // *Nature*. – 1999. – V. 399, No 6736. – P. 541–548.
3. *Brussow H., Hendrix R.W.* Phage genomics: small is beautiful // *Cell*. – 2002. – V. 108, No 1. – P. 13–16.
4. *Brussow H.* Phage therapy: the Escherichia coli experience // *Microbiology*. – 2005. – V. 151, No 7. – P. 2133–2140.

5. *Tetart F., Desplats C., Krisch H.M.* Genome plasticity in the distal tail fiber Locus of the T-even bacteriophage: recombination between conserved motifs swaps adhesion specificity // *J. Mol. Biol.* – 1998. – V. 282, No 3. – P. 543–556.
6. *Wood W.B., Eiserling F.A., Crowther R.A.* Long tail fibers: genes, proteins, structure and assembly // *Karam J.D.* (ed.), *Molecular biology of bacteriophage T4.* – Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1994. – P. 282–290.
7. *Coombs D.H., Eiserling F.A.* Studies on the structure, protein composition, and assembly of the neck of bacteriophage T4 // *J. Mol. Biol.* – 1977. – V. 116, No 3. – P. 357–405.
8. *Dewey M.J., Wiberg J.S., Frankel F.R.* Genetic control of whisker antigen of bacteriophage T4D // *J. Mol. Biol.* – 1974. – V. 84, No 4. – P. 625–634.
9. *Efimov V.P., Nepluev I.V., Sobolev B.N., Zurabishvili T.G., Schulthess T., Lustig A., Engel J., Haener M., Aebi U., Venyaminov S. et al.* Fibrin encoded by bacteriophage T4 gene *wac* has a parallel triple-stranded alpha-helical coiled-coil structure // *J. Mol. Biol.* – 1994. – V. 242, No 4. – P. 470–486.
10. *Follansbee S.E., Vanderslice R.W., Chavez L.G., Yegian C.D.* A new set of adsorption mutants of bacteriophage T4D, identification of a new gene // *Virology.* – 1974. – V. 58, No 1. – P. 180–199.
11. *Conley M.P., Wood W.B.* Bacteriophage T4 whiskers: a rudimentary environment-sensing device // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1975. – V. 72, No 9. – P. 3701–3705.
12. *Prilipov A.G., Selivanov N.A., Nikolaeva L.I., Mesyanzhinov V.V.* Nucleotide and deduced amino acid sequence of bacteriophage T4 gene *wac* // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – V. 16, No 21. – P. 10361.
13. *Sobolev B.N., Mesyanzhinov V.V.* The *wac* gene product of bacteriophage T4 contains coiled-coil structural patterns // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 1991. – V. 8, No 5. – P. 953–965.
14. *Letarov A.V., Londer Y.Y., Boudko S.P., Mesyanzhinov V.V.* The carboxy-terminal domain initiates trimerization of bacteriophage T4 fibrin // *Biochemistry.* – 1999. – V. 64, No 7. – P. 817–823.
15. *Letarov A., Manival X., Desplats C., Krisch H.M.* *gpwac* of the T4-type bacteriophages: structure, function, and evolution of a segmented coiled-coil protein that controls viral infectivity // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 187, No 3. – P. 1055–1066.
16. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular cloning: a laboratory manual.* V. 1–3. – N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
17. *Tetart F., Desplats C., Kutateladze M., Monod C., Ackermann H.W., Krisch H.M.* Phylogeny of the major head and tail genes of the wide ranging T4-type bacteriophages // *J. Bacteriol.* – 2001. – V. 183, No 1. – P. 358–366.
18. *Куликов Е.Е., Исаева А.С., Роткина А.С., Манькин А.А., Летаров А.В.* Биоразнообразие и динамика бактериофагов фекалиях лошади // *Микробиология.* – 2007. – Т. 76. – С. 271–278.
19. *Nolan J.M., Petrov V., Bertrand C., Krisch H.M., Karam J.D.* Genetic diversity among five T4-like bacteriophages // *Virology.* – 2006. – V. 3. – P. 30–44.
20. *Yoshida T, Takashima Y, Tomaru Y, Shirai Y, Takao Y, Hiroishi S, Nagasaki K.* Isolation and characterization of a cyanophage infecting the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* // *Appl. Env. Microbiol.* – 2006. – V. 72, No 2. – P. 1239–1247.
21. *Chibani-Chennoufi S., Sidoti J., Bruttin A., Dillmann M.-L., Kutter E., Qadri F., Sarker S.A., Brüssow H.* Isolation of *Escherichia coli* bacteriophages from the stool of pediatric patients in Bangladesh // *J. Bacteriol.* – 2004. – V. 186, No 24. – P. 8287–8294.
22. *Comeau A.M., Bertrand C., Letarov A., Tetart F., Krisch H.M.* Modular architecture of the T4 phage superfamily: A conserved core genome and a plastic periphery // *Virology.* – 2007. – V. 362, No 2. – P. 384–396.

23. *Летаров А.В.* Эволюционная динамика, фолдинг и функция некоторых фибриллярных белков бактериофагов, родственных Т-чётным фагам энтеробактерий // Труды ИНМИ им. С.Н. Виноградского. – 2004. – Вып. XII. – С. 269–284.

Поступила в редакцию
09.10.07

Латыпов Олег Рустамович – младший научный сотрудник, аспирант Института Микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН.

E-mail: *olatypov@rambler.ru*

Голомидова Алла Константиновна – младший научный сотрудник Института Микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН.

E-mail: *alusik81@mail.ru*

Летаров Андрей Викторович – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией вирусов микроорганизмов Института Микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН.

E-mail: *arthq@mail.ru*