

УДК579.258

АНАЛИЗ ГЕНОМНЫХ ВАРИАНТОВ КЛЕТОК *E. coli* , УСТОЙЧИВЫХ К ИНФЕКЦИИ ФАГА T7

Аксенов Р.Г. (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»)

Комиссарова А.В. (Федеральное государственное образовательное бюджетное учреждение высшего образования «Финансовый университет при Правительстве Российской Федерации»)

Научные руководители – аспирант Скутель М.А., к.б.н. Исаев А.Б.

(Лаборатория анализа метагеномов, Сколковский институт науки и технологий)

Введение. Вирусы бактерий или бактериофаги (фаги), являются паразитами бактерий и играют важную роль в регулировании численности этих организмов. Фаги представляют собой наиболее распространенные биологические объекты на Земле и являются ключевыми экологическими движущими силами динамики активности и адаптации микробного сообщества, тем самым влияя на циклы обмена питательных веществ в окружающей среде, сельскохозяйственную продукцию и здоровье человека и животных. Эволюционная гонка между фагами и бактериями является одной из ключевой движущей силой изменений этих сообществ и источником возникновения новых молекулярных механизмов поддержания стабильности этих живых систем [1].

Для более глубокого понимания способов взаимодействия фагов и бактерий, а также формирования фенотипов устойчивости проводятся всесторонние генетические скрининги, успешно генотипирующие известные рецепторы и другие факторы, важные для инфекции. Такие исследования в масштабе генома обладают уникальным потенциалом для выявления разнообразных механизмов резистентности [1, 2]. Так, на данный момент известно свыше 100 молекулярных систем защиты бактерий от вирусов, предотвращающих инфекцию на разных этапах развития вируса, начиная от блокировки адсорбции фага и заканчивая деградацией фагового генома в ходе второго цикла инфекции соседних клеток.

Однако понимание полного спектра возможных способов бактерий предотвратить инфекцию фагов все еще остается ограниченным. Это особенно важно для развития новых методов фаговой терапии — перспективного способа лечения бактериальных болезней человека фагами в эпоху возрастающего риска возникновения множественно лекарственно устойчивых вариантов патогенов.

Основная часть. В ходе работы мы отобрали мутантов клеток *E. coli* K-12 BW25113, которые демонстрировали рост в культуре клеток спустя более 20 часов после инфекции бактериофагом T7. Полученные мутанты обладали слизистым фенотипом, что позволило предположить появление мутаций, приводящих к усиленному синтезу клеточной капсулы или других способов модификации поверхности клетки. С целью идентификации конкретных мутаций, произошедших в клетках, мы осуществили полногеномное секвенирование бактериальной ДНК на платформе Illumina/Solexa и произвели SNP calling. В результате нам удалось обнаружить ряд несинонимичных мутаций в генах *igaA* и *RcsC* — основных компонентах регуляторного Rcs каскада передачи сигнала. Известно, что ген *igaA* является отрицательным регулятором пути фосфорилирования и передачи сигнала Rcs, функционирующего как система реагирования на повреждения клеточной стенки и неблагоприятные условия внешней среды. Эта система в норме контролирует состав клеточной поверхности и экспрессию большого количества генов, участвующих в синтезе капсулы и образовании биопленок. Регуляция активации пути Rcs геном *igaA* капсулярного биосинтеза необходима для выживания бактерии в различных стрессовых условиях окружающей среды, при повреждении мембран и при воздействии антибиотиков

[3, 4]. Интересно, что помимо мутаций в регуляторном каскаде мы также нашли большое число мутаций в разных генах *ujbEFGH* оперона — биосинтетического кластера колановой кислоты, ключевого компонента колановой капсулы, защищающей бактериальную клетку от вышеупомянутых факторов. Важно, что Rcs каскад является ключевым регулятором экспрессии *ujbEFGH* оперона, поэтому идентифицированные мутации связаны в одном биохимическом пути.

Эти данные указывают на то, что обнаруженная нами мутация в гене *igaA*, вероятно, привела к конститутивной активации Rcs каскада, способствовавшей повышенному биосинтезу колановой кислоты. За счёт этого клетки приобрели капсулу, которая стала физическим барьером между бактериофагами и рецепторами, необходимыми фагам для начала инфекции и локализующимся на внешней мембране бактерий. Таким образом, физическая изоляция фаговых рецепторов привела к блокировке адсорбции фаговых частиц к поверхности клетки, а значит позволила *E. coli* приобрести резистентность к фагу T7.

Выводы. В ходе работы были изолированы штаммы клеток *E. coli* K-12 BW25113, устойчивые к инфекции фага T7 и обладающие мукоидным фенотипом. Были идентифицированы мутации в генах Rcs регуляторного каскада и генах синтеза колановой кислоты, приводящие к продукции капсулы. Появление резистентности может быть объяснено образованием капсулы, предотвращающей адсорбцию фагов на поверхности клеток. Результаты этого исследования и текущие усилия по поиску механизмов устойчивости бактерий к фагам расширяют наше понимание коэволюции бактерий и фагов, которое может быть использовано в процессе разработки более эффективных фagoтерапевтических методов лечения бактериальных инфекций человека и инструментов для геной инженерии микробиома.

Список использованных источников

1. Shaer Tamar E., Kishony R. Multistep diversification in spatiotemporal bacterial-phage coevolution //Nature Communications. – 2022. – Т. 13. – №. 1. – С. 7971.
2. Mutalik V. K. et al. High-throughput mapping of the phage resistance landscape in *E. coli* //PLoS biology. – 2020. – Т. 18. – №. 10. – С. e3000877.
3. Wall E., Majdalani N., Gottesman S. The complex Rcs regulatory cascade //Annual review of microbiology. – 2018. – Т. 72. – С. 111-139.
4. Hussein N. A. et al. Distinct domains of *Escherichia coli* IgaA connect envelope stress sensing and down-regulation of the Rcs phosphorelay across subcellular compartments //PLoS genetics. – 2018. – Т. 14. – №. 5. – С. E1007398.