

На правах рукописи

Тимошина Ольга Юрьевна

**Бактериофаги *Acinetobacter baumannii* семейства *Autographiviridae*:
ферментативное взаимодействие с полисахаридами**

Специальность – 1.5.3. Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2023

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биоинженерии отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Мирошников Константин Анатольевич, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Прилипов Алексей Геннадьевич, доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной генетики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Захарова Юлия Александровна, доктор медицинских наук, заместитель директора Института дезинфектологии ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора.

Ведущая организация:

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится 4 октября 2023 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « » _____ 2023 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
В.А. Олейников



Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Большую угрозу мировому здравоохранению представляет распространение мультирезистентных клонов патогенов группы ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и представители рода *Enterobacter*). Наиболее важной характеристикой инфекций, вызванных патогенами данной группы, является высокая вероятность летального исхода, связанная с трудностью подбора эффективной антимикробной терапии. В 2017 году Всемирной организацией здравоохранения был предложен расширенный список наиболее значимых групп антибиотикорезистентных бактерий, в отношении которых необходима разработка новых антибиотиков. Первое место в группе критического приоритета занял устойчивый к карбапенемам *Acinetobacter baumannii*. Препаратами выбора для терапии инфекций, вызванных *A. baumannii*, традиционно считались карбапенемы, однако на данный момент наблюдается высокий уровень распространённости нозокомиальных штаммов *A. baumannii*, устойчивых к данному классу антибиотиков. По результатам многоцентровых исследований доля карбапенем-резистентных нозокомиальных штаммов *A. baumannii* среди всех собранных на территории РФ в 2015-2016 гг. приблизилась к отметке в 80%; 20,5% всех исследованных изолятов были устойчивы ко всем антибиотикам, кроме колистина (Shek E.A. et al., 2019). Возможным компонентом антимикробной терапии инфекций, вызванных экстремально лекарственно устойчивыми штаммами *A. baumannii*, могут служить литические бактериофаги.

Бактериофаги как антибактериальные агенты были известны с начала XX века, однако исследования в области фаготерапии проводились, в основном, в СССР. В западном мире бактериофаги как компоненты антимикробной терапии уступили своё место открытым в конце 1920-х годов антибиотикам, но широко использовались в качестве модельных объектов в фундаментальных научных работах в области молекулярной биологии. На сегодняшний день в англоязычной научной литературе можно наблюдать увеличение количества публикаций, посвящённых использованию бактериофагов в медицине, что свидетельствует о возрождении интереса к фаготерапии во всём мире.

Бактериофаги широко распространены в окружающей среде, что обуславливает простоту изоляции терапевтических штаммов для каждого клинического случая. Важным свойством бактериофагов как антибактериальных агентов является их высокая специфичность, что, с одной стороны, может расцениваться как преимущество перед использованием антибиотиков, а с другой, - как недостаток: антимикробная терапия бактериальной инфекции не может быть проведена с использованием лишь одного набора литических бактериофагов, а каждый раз

требует подбора комбинации штаммов фагов, специфичных к конкретным субтипам и вариантам патогена. Таким образом, рациональным подходом к применению бактериофагов в клинической практике представляется использование персонализированных коктейлей бактериофагов, специфичных в отношении конкретного штамма, выделяемого от пациента в процессе активной инфекции.

Первичными рецепторами для значительного числа типов бактериофагов, лизирующих клетки патогенов группы ESKAPE, являются бактериальные экзополисахариды, а именно капсульные полисахариды и/или O-антиген поверхностные полисахариды. На данный момент установлено, что патогены группы ESKAPE характеризуются широким разнообразием структур экзополисахаридов, что обусловлено высокой вариабельностью генетических кластеров, ответственных за их синтез. Понимание молекулярных основ фаговой инфекции, а также биологии бактериофагов, инфицирующих экстремально лекарственно устойчивые штаммы основных бактериальных патогенов, позволяет рационализировать подбор терапевтических бактериофагов и оптимизировать методы антимикробной химиотерапии.

На данный момент в научной литературе можно найти сведения о более чем ста различных бактериофагах, специфически инфицирующих *A. baumannii*, продолжают выявляться новые. Однако далеко не все из них достаточно хорошо охарактеризованы и имеют потенциал применения в медицине. Создание локальных коллекций литических бактериофагов, специфичных к штаммам различных капсульных типов *A. baumannii*, способно значительно упростить подбор компонентов для персонализированных коктейлей для фаготерапии инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами данного патогена.

Цель работы и основные задачи исследования

Целью диссертационной работы являлось создание коллекции исчерпывающе охарактеризованных литических бактериофагов семейства *Autographiviridae*, специфически инфицирующих штаммы *A. baumannii* различных капсульных типов.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Поиск и выделение из объектов окружающей среды ранее неизвестных литических бактериофагов, инфицирующих штаммы *A. baumannii* различных капсульных типов.
- 2) Изучение биологических и молекулярно-генетических свойств выделенных капсулоспецифичных бактериофагов, определение их таксономического положения.
- 3) Выявление генов, кодирующих белок хвостового шипа, в геномах выделенных капсулоспецифичных бактериофагов, получение рекомбинантных препаратов полисахарид-деполимеризующих ферментов, изучение их субстратной специфичности и механизма действия.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

В ходе работы из образцов сточной и речной воды были изолированы 9 ранее неизвестных литических бактериофагов, специфически инфицирующих штаммы *A. baumannii* девяти различных капсульных типов. Для бактериофагов, входящих в сформированную в ходе исследования коллекцию, определены: полная нуклеотидная последовательность и структура геномов; таксономическое положение на основе анализа геномов и данных электронной микроскопии; параметры инфекционного процесса; определены механизмы, лежащие в основе ферментативной активности полисахарид-деполимеризующих ферментов исследуемых бактериофагов. Полученные данные по характеристике бактериофагов вносят вклад в формирование общей картины, касающейся классификации, систематизации и изучения геномного разнообразия вирусов, инфицирующих *A. baumannii*.

Вновь обнаруженные в ходе работы бактериофаги рода *Friunavirus* имеют потенциал использования в качестве компонентов персонифицированных коктейлей для фаготерапии ввиду того, что они являются высокоспецифичными, строго литическими, быстро адсорбируются на бактериальных клетках и дают хороший выход фаговых частиц. Более «медленный» бактериофаг *Aristophanes* является первым представителем ранее неопisanного рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae* семейства *Autographiviridae*.

Представленная работа, таким образом, является частью работ по поиску альтернативных методов борьбы с мультирезистентными штаммами *A. baumannii*, основанных на использовании природных вирусов бактерий – бактериофагов и закодированных в их геномах экзополисахарид-деполимеризующих ферментов.

Положения, выносимые на защиту

1) Выделенные в ходе проведенных исследований бактериофаги АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127 и АРК128 высоко специфичны в отношении штаммов *A. baumannii* капсульных типов К09, К14, К16, К37/К3-v1, К26, К86, К127 и К128, соответственно.

2) Очищенные рекомбинантные деполимеразы расщепляют О-гликозидные связи капсульных полисахаридов по гидролитическому пути, то есть являются специфическими гликозидазами класса гидролаз.

3) Впервые показано использование механизма О-деацетилирования капсульного полисахарида бактериофагом, специфически инфицирующим *A. baumannii*.

Апробация результатов и публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 6 полноразмерных научных статьях, опубликованных в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах РИНЦ, Scopus и Web of Science, а также представлены на 2-х научных конференциях в формате устных и стендовых докладов.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 122 страницах, содержит 33 рисунка и 6 таблиц. Текст рукописи содержит следующие разделы: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Библиографический указатель включает ссылки на 197 источников на русском и на английском языках.

Содержание работы

1. Общая характеристика бактериофагов *A. baumannii*, вошедших в сформированную в ходе работы коллекцию

Бактериофаги являются естественными регуляторами популяции микроорганизмов, их разнообразие в природе чрезвычайно велико, и они используют ряд стратегий для заражения и уничтожения бактерий. Активный поиск фагов, инфицирующих *A. baumannii*, начался в начале XXI века в связи с распространением мультирезистентных штаммов данного патогена в отделениях реанимации и интенсивной терапии медицинских учреждений по всему миру. На текущий момент более сотни расшифрованных геномов фагов *A. baumannii* депонировано в базу данных GenBank. Данные об известных фагах *A. baumannii* были обобщены в двух научных обзорах, 2018 года (37 геномов) (Turner D. et al., 2018) и 2022 года (134 генома) (Oliveira H. et al., 2022).

Способность бактериофагов заражать бактериальные клетки, в первую очередь, зависит от их способности распознавать специфические детерминанты на поверхности клетки бактерии. В этом отношении фаги, инфицирующие *A. baumannii*, делятся на две большие группы, – для первой капсульные полисахариды являются основными рецепторами, частицы таких фагов как правило несут полисахарид-деградирующие ферменты. Ко второй группе относятся все остальные фаги, фибриллы которых в качестве рецепторов распознают липолигосахариды, белки-порины и другие поверхностные детерминанты.

Бактериофаги, обладающие полисахарид-деполимеризующими ферментами, высоко специфичны в отношении капсульных полисахаридов своих штаммов-хозяев. При этом полиморфизм локусов синтеза капсульных полисахаридов у *A. baumannii* ведёт к большой вариабельности капсульных полисахаридов, и следовательно, к большому разнообразию бактериофагов, инфицирующих такие штаммы. Таким образом, изучение именно этого класса бактериофагов представляется приоритетным для формирования коллекций литических фагов, которые могут быть использованы при приготовлении персонафицированных коктейлей для фаготерапии.

Поиск новых литических бактериофагов представляется возможным только при наличии коллекции предварительно охарактеризованных штаммов целевого патогена. Штаммы *A. baumannii*, использованные в ходе выполнения данной диссертационной работы, были любезно предоставлены для исследования М. В. Эйдельштейном, И. С. Азизовым, а также Alexandr Nemes, Bin Liu, Lei Wang, Dean Scholl, Johanna Kenyon, Ruth Hall, Raffaele Zarrilli, Veeraraghavan Balaji и Indranil Biswas. Штамм B05 получен из коллекции ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора, г. Оболенск. Штаммы 36–1454, KZ1101, KZ1093, KZ1098, MA55-66, MAR-303, MAR13-1452 получены из коллекции НИИ антимикробной химиотерапии, г. Смоленск.

Для выделения новых бактериофагов в ходе диссертационной работы был использован метод обогащения, предложенный сотрудниками нашей лаборатории. Согласно этому методу, целевые штаммы *A. baumannii* были инокулированы в питательные среды, приготовленные с использованием образцов сточной и речной воды, собранных на территории г. Москвы в 2018–2020 гг. Полученные после ночной инкубации накопительные культуры обезвреживали хлороформом, избавляли от клеточного дебриса и использовали для дальнейшего обнаружения литических бактериофагов с помощью спот-теста.

Важной характеристикой бактериофагов является морфология формируемых ими негативных колоний. Наличие вокруг прозрачной литической бляшки заметной зоны просветления (гало) является свидетельством полисахарид-деполимеризующей активности фаговых ферментов. Таким образом, после проведения спот-теста в дальнейшую работу были взяты бактериофаги, формирующие крупные бляшки с большими зонами просветления и специфически инфицирующие следующие штаммы *A. baumannii*:

- 1) KZ-1098 (МК420047), изолированный из респираторного тракта госпитализированного пациента в Астане, Казахстан, в 2016 году. В соответствии с базой SNPTAb, штамм *A. baumannii* KZ-1098 принадлежал к сиквенс-типу ST218^{Pas}/ST184^{Oxf}, капсульному типу K26, а также нес ген карбапенемазы *bla*_{OXA-58-like}.
- 2) B05, принадлежащий к капсульному типу K9 (МК331712).
- 3) AB5256, принадлежащий к капсульному типу K14 (NZ_AHA100000000).

- 4) D4, принадлежащий к капсульному типу K16 (NZ_CP048849).
- 5) KZ-1101, выделенный из очага инфекции мягких тканей госпитализированного пациента в Нур-Султане, Казахстан, в 2016 году (NZ_JAPYKX000000000). В соответствии с базой SNPTAb, штамм *A. baumannii* KZ-1101 принадлежал к сиквенс-типу ST132^{Pas}/ST2213^{Oxf} и капсульному типу K37 и был чувствителен к карбапенемам.
- 6) MA-55-66, выделенный в Москве в 2015 году (МК399432). В соответствии с базой SNPTAb, штамм *A. baumannii* MA-55-66 принадлежал к сиквенс-типу ST824^{Pas}/ST1129^{Oxf} и капсульному типу K86.
- 7) 36–1454, выделенный в Москве в 2013 году (NZ_JANTLN000000000). В соответствии с базой SNPTAb, штамм *A. baumannii* 36–1454 принадлежал к сиквенс-типу ST448^{Pas}/ST1174^{Oxf}, капсульному типу K127 и был чувствителен к карбапенемам.
- 8) KZ1093, изолированный из респираторного тракта госпитализированного пациента в Нур-Султане, Казахстан, в 2016 году (NZ_JAJAWC000000000). В соответствии с базой SNPTAb, штамм *A. baumannii* KZ1093 принадлежал к сиквенс-типу ST1574^{Pas}/ST2240^{Oxf}, капсульному типу K128 и был чувствителен к карбапенемам.

Выделенные бактериофаги были наименованы в соответствии с номером капсульного типа штамма-хозяина, где **АРКХХ** расшифровывается как *Acinetobacter* **Phage** **КХХ** (номер капсульного типа штамма-хозяина). Таким образом, бактериофаги, выделенные на клинических штаммах *A. baumannii* B05, AB5256, D4, KZ-1098, KZ-1101, MA55-66, 36-1454 и KZ-1093, принадлежащих к капсульным типам K9, K14, K16, K26, K37, K86, K127 и K128, соответственно, получили названия АРК09, АРК14, АРК16, АРК26, АРК37.1, АРК86, АРК127v и АРК128. Также в работу был взят бактериофаг, впоследствии названный Aristophanes, который формировал бляшки с и без видимого гало (в зависимости от концентрации используемого «верхнего» агара) (Рисунок 1А) на культуре штамма KZ-1098.

Очищенные в градиенте CsCl препараты выделенных бактериофагов были исследованы методом электронной микроскопии с негативным окрашиванием, по результатам которой было установлено, что все фаги имели икосаэдрический капсид порядка 50–60 нм в диаметре с коротким несократимым хвостом (Рисунок 1В, на примере бактериофага Aristophanes).

Характеристики инфекционного процесса, вызываемого каждым из выделенных бактериофагов, были исследованы в рамках экспериментов по установлению эффективности адсорбции фаговых частиц и определению параметров единичного цикла роста. Для бактериофагов АРК09, АРК14, АРК16, АРК26, АРК37.1 АРК86, АРК127v и АРК128 наблюдалась картина яркой инфекции со следующими параметрами: адсорбция 95% фаговых частиц в течение первых 5 мин инфекции, выход 150–300 частиц на клетку.

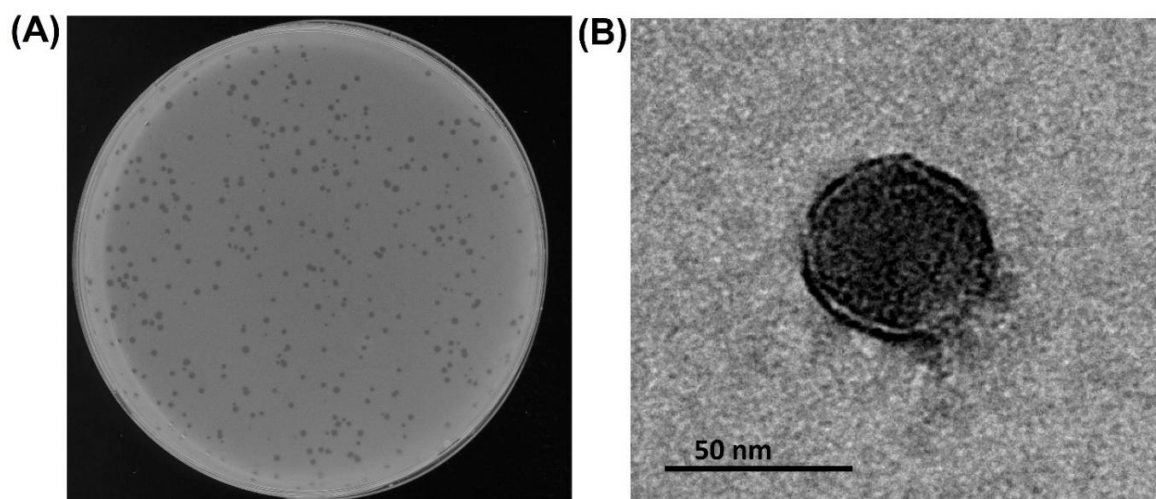


Рисунок 1. Морфологические характеристики бактериофага *Aristophanes*. **А.** Фаговые бляшки на газоне штамма *A. baumannii* KZ-1098. **В.** Электронная микрофотография бактериофага *Aristophanes*.

Динамика инфекционного процесса, вызываемого фагом *Aristophanes*, существенно отличалась. Согласно полученным данным (Рисунок 2А), в течение первых 5 мин после добавления бактериофага адсорбировались только 50% вирусных частиц, в течение первых 20 мин – 80% вирусных частиц. Константа адсорбции составила $1,3 \times 10^{-9}$ мл/мин. Латентный период инфекции составил 20 мин, выход фаговых частиц оказался низким – всего 15 фаговых частиц на одну инфицированную клетку (Рисунок 2В).

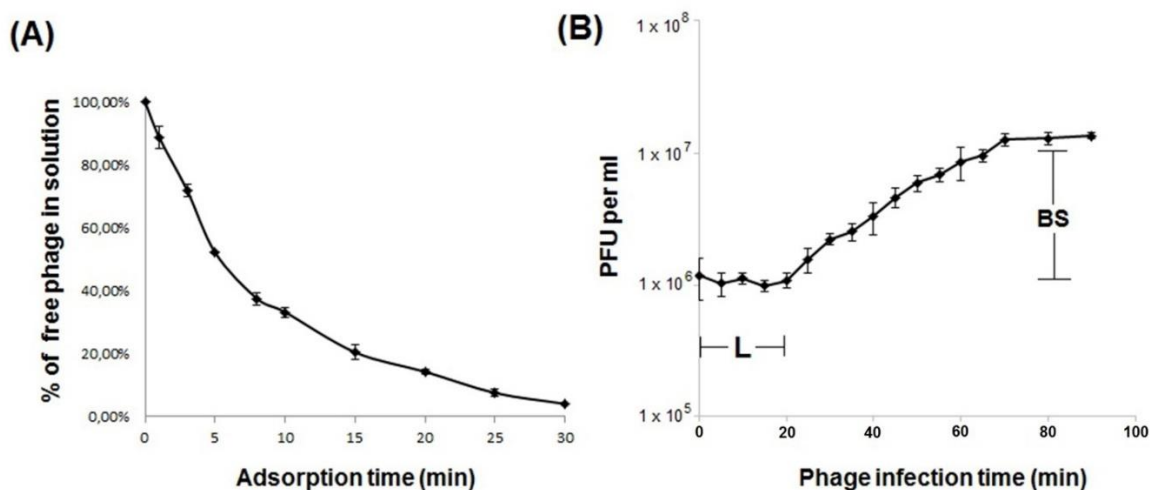


Рисунок 2. Параметры инфекционного процесса бактериофага *Aristophanes*. Определение скорости адсорбции (А) и эксперимент по единичному циклу роста (В). L – длительность латентного периода, BS – выход фаговых частиц.

Специфичность бактериофагов была протестирована на коллекции из 51 штамма *A. baumannii* различных капсульных типов (K1, K2, K3/22, K6, K7, K8, K11, K15, K17, K19, K20, K21, K24, K25, K27, K30, K32, K33, K35, K42, K43, K44, K45, K46, K47, K48, K51, K52, K53, K54, K55, K57, K58, K61, K73, K74, K80, K81, K82, K83, K84, K85, K87, K88, K89, K90, K91, K92, K93, K116, K125), имеющейся в распоряжении сотрудников нашей лаборатории (подробный список штаммов указан в полном тексте диссертационной работы). Бактериофаги Aristophanes, АРК09, АРК14, АРК16, АРК26, АРК127v и АРК128 были высоко специфичны и инфицировали только клетки штаммов, на которых были выделены. Бактериофаг АРК37.1 проявил способность инфицировать клетки штаммов KZ-1101 и АВ5001, относящихся к капсульным типам K37 и K3-v1 (дефектный). Было также установлено, что бактериофаг АРК86 способен инфицировать штаммы *A. baumannii* МА-55-66 и LUN5547 капсульных типов K86 и K87, соответственно. Способность фагов инфицировать штаммы *A. baumannii*, принадлежащие к разным капсульным типам, можно объяснить тем фактом, что полисахарид-деполимеризующие ферменты, кодируемые в геномах фагов, могут распознавать и разрушать одинаковые связи, присутствующие в структурах капсульных полисахаридов этих штаммов.

Полученные в ходе проведенных экспериментов данные свидетельствовали о том, что девять вновь выделенных бактериофагов являются высоко специфичными подовирусами, а установленный характер инфекционного процесса, вызываемого фагами АРК09, АРК14, АРК16, АРК26, АРК37.1, АРК86, АРК127v и АРК128, позволил сделать вывод о том, что данные фаги могут быть рассмотрены как потенциальные агенты для формирования персонифицированных коктейлей для использования в медицинской практике.

2. Характеристика геномов выделенных бактериофагов *A. baumannii*

Следующим важным этапом диссертационной работы стало определение молекулярно-генетических свойств выделенных капсулоспецифичных бактериофагов. Для этого из очищенных и концентрированных фаговых стоков были выделены образцы ДНК фагов, которые затем были секвенированы на платформе MiSeq (Illumina, США). Полученные риды далее были собраны *de novo* в контиги с использованием программы SPAdes v. 3.11.1. Геномы фагов были аннотированы с использованием программ Prodigal 2.6.1, GeneMarkS 4.3 и Glimmer 3.02 с последующей ручной верификацией идентифицированных открытых рамок считывания. Функции генов были определены с использованием поиска в базах данных BLAST NCBI и HHPred. Положение и длина концевых повторов были определены путем поиска областей с двойной глубиной считывания по сравнению со средней глубиной считывания по всему геному.

Аннотированные геномы вновь обнаруженных бактериофагов *A. baumannii* были размещены в международной базе данных NCBI GenBank под номерами: Aristophanes - MT783706, APK09 - MZ868724, APK14 - MK089780, APK16 - MZ868725, APK26 - MW345241, APK37.1 - MZ967493, APK86 - MZ936314, APK127v - ON210142, APK128 - MW459163.

Таблица 1. Характеристика геномов исследуемых бактериофагов *A. baumannii*, положение в геномах белков хвостового шипа

Название бактериофага	Длина генома (п.н.)	DTR длина (п.н.)	G+C (%)	Кол-во генов	Номер Genbank	Положение TSP в геноме (ID)
Aristophanes	43505	184	42.5	46	MT783706	Aristophanes_gp41 (QNO11465)
APK09	41477	409	39.2	56	MZ868724	APK09_gp48 (UAW09804)
APK14	41767	405	39.2	55	MK089780	ABPK14_gp49 (AYR04394)
APK16	41135	357	39.4	54	MZ868725	APK16_gp47 (UAW09859)
APK26	41097	345	39.3	54	MW345241	APK26_gp48 (QQO97001)
APK37.1	40966	339	39.2	56	MZ967493	APK37.1gp49 (UAW07728)
APK86	41297	383	39.2	56	MZ936314	APK86_gp49 (UAW09972)
APK127v	41380	422	39.2	53	ON210142	APK127v_gp47 (URQ05189)
APK128	42013	428	39.2	52	MW459163	APK128_gp45 (QVD48888)

Геномы бактериофагов APK09, APK14, APK16, APK26, APK37.1, APK86, APK127v и APK128 были представлены линейной двуцепочечной молекулой ДНК размером от 40966 до 42013 п.н. с прямыми концевыми повторами от 339 до 428 п.н., с содержанием от 52 до 56 предсказанных генов, расположенных только в прямом направлении (Таблица 1). Концы геномов фланкированы прямыми концевыми повторами (DTR - direct terminal repeat) длиной от 339 до 428 п.н. Содержание G+C в геномах фагов составляло от 39,2% до 39,4%, что близко к G+C контенту генома *A. baumannii* (около 39%).

Геном бактериофага Aristophanes значительно отличался от геномов остальных исследуемых фагов (Таблица 1). Он также был представлен линейной двуцепочечной молекулой ДНК объемом 43505 п.н., однако прямые нуклеотидные повторы на концах генома были существенно короче, чем у остальных выделенных фагов, и составляли всего 184 п.н. Содержание G+C в геноме также отличалось и составляло 42,5%.

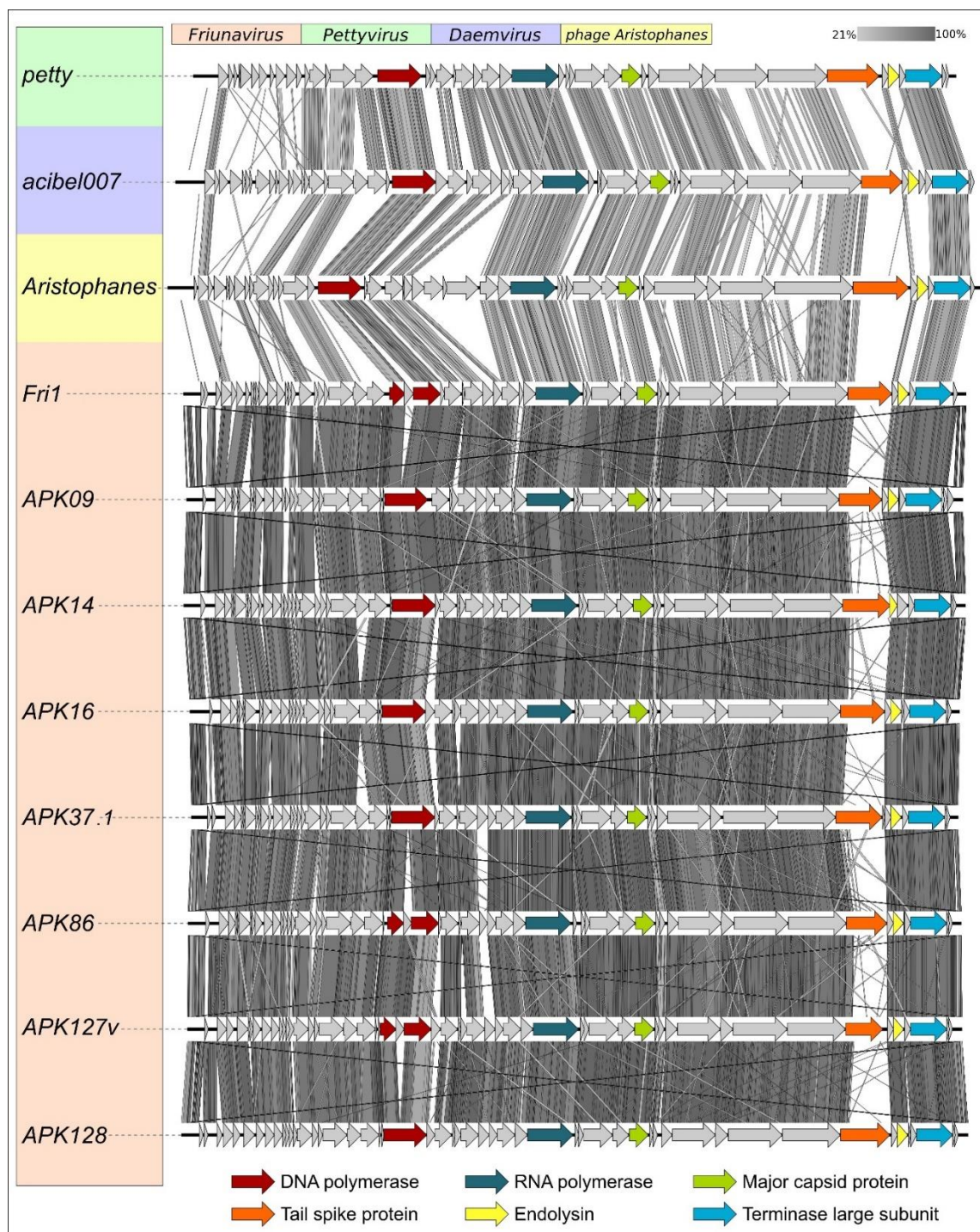


Рисунок 3. Сравнение геномов 11 бактериофагов подсемейства *Beijerinckvirinae*, инфицирующих *A. baumannii*. Степень идентичности нуклеотидной последовательности обозначена интенсивностью линий серого цвета.

Организация геномов выделенных бактериофагов совпадала с типичной организацией геномов ранее известных фагов семейства *Autographiviridae*: геномы имели в своем составе участки ранних (отвечающих за репликацию ДНК фага и метаболизм нуклеиновых кислот), средних (отвечающих за морфогенез капсида фага) и поздних (отвечающих за лизис клетки-хозяина и упаковку вирионов) генов. Методом сравнения полных геномов было установлено, что

наиболее вариабельные участки располагались в центральной и 3'- частях генов, кодирующих белок хвостового шипа бактериофагов, который отвечает за узнавание и ферментативное взаимодействие с капсульными полисахаридами *A. baumannii*, а также в регионе ранних генов, необходимых для первых шагов фаговой инфекции (Рисунок 3).

Гены ДНК-полимеразы в геномах бактериофагов АРК127v и АРК86 были разделены на две части, между которыми находился ген HNH - эндонуклеазы. Все фриунавирусы *A. baumannii*, для которых было проведено сравнение геномов, обладали одинаковым геном эндолизина, отличающимся от генов эндолизинов фагов Petty (род *Pettyvirus*) и Acibel007 (род *Daemvirus*), инфицирующих *A. baumannii*, а также фага Aristophanes.

Биоинформатический анализ межгеномного сходства (Рисунок 4) показал, что бактериофаги АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 имеют высокую идентичность последовательностей геномов с геномами ранее известных бактериофагов рода *Friunavirus* подсемейства *Beijerinckvirinae* семейства *Autographiviridae*. Нуклеотидные последовательности геномов исследуемых бактериофагов на 82–87% совпадали с нуклеотидными последовательностями геномов других известных фриунавирусов, инфицирующих *A. baumannii*, что выше порогового значения для определения рода фага (70%).

Оценка средней идентичности нуклеотидов (ANI) генома бактериофага Aristophanes с геномами известных фагов семейства *Autographiviridae* показала наибольшее сходство с геномами ацинетобактерных фагов vB_AbaP_Acibel007 рода *Daemvirus* (66.9% идентичности) и AbKT21phiIII рода *Friunavirus* (66.4% идентичности), что ниже порогового значения в 70% для отнесения бактериофага к какому-либо из известных на данный момент родов семейства *Autographiviridae*.

Филогенетический анализ, основанный на сравнении аминокислотных последовательностей основного белка капсида, большой субъединицы терминазы, белка-коннектора хвоста и головы, а также ДНК- и РНК-полимераз, показал, что исследуемые фаги, обладающие полисахарид-деполимеризующими ферментами, принадлежат к одной кладе с ранее известными бактериофагами рода *Friunavirus*, инфицирующими *A. baumannii*. Бактериофаг Aristophanes также является близкородственным (Рисунок 5).

Таким образом, анализ сходства нуклеотидных последовательностей геномов бактериофагов, филогенетический анализ консервативных белков, а также микробиологические эксперименты показали, что выделенные в процессе работы бактериофаги АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 принадлежат к роду *Friunavirus* подсемейства *Beijerinckvirinae* семейства *Autographiviridae*.

Полученные данные свидетельствуют о том, что бактериофаг *Aristophanes* является первым представителем ранее неопisanного рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae* семейства *Autographiviridae*.

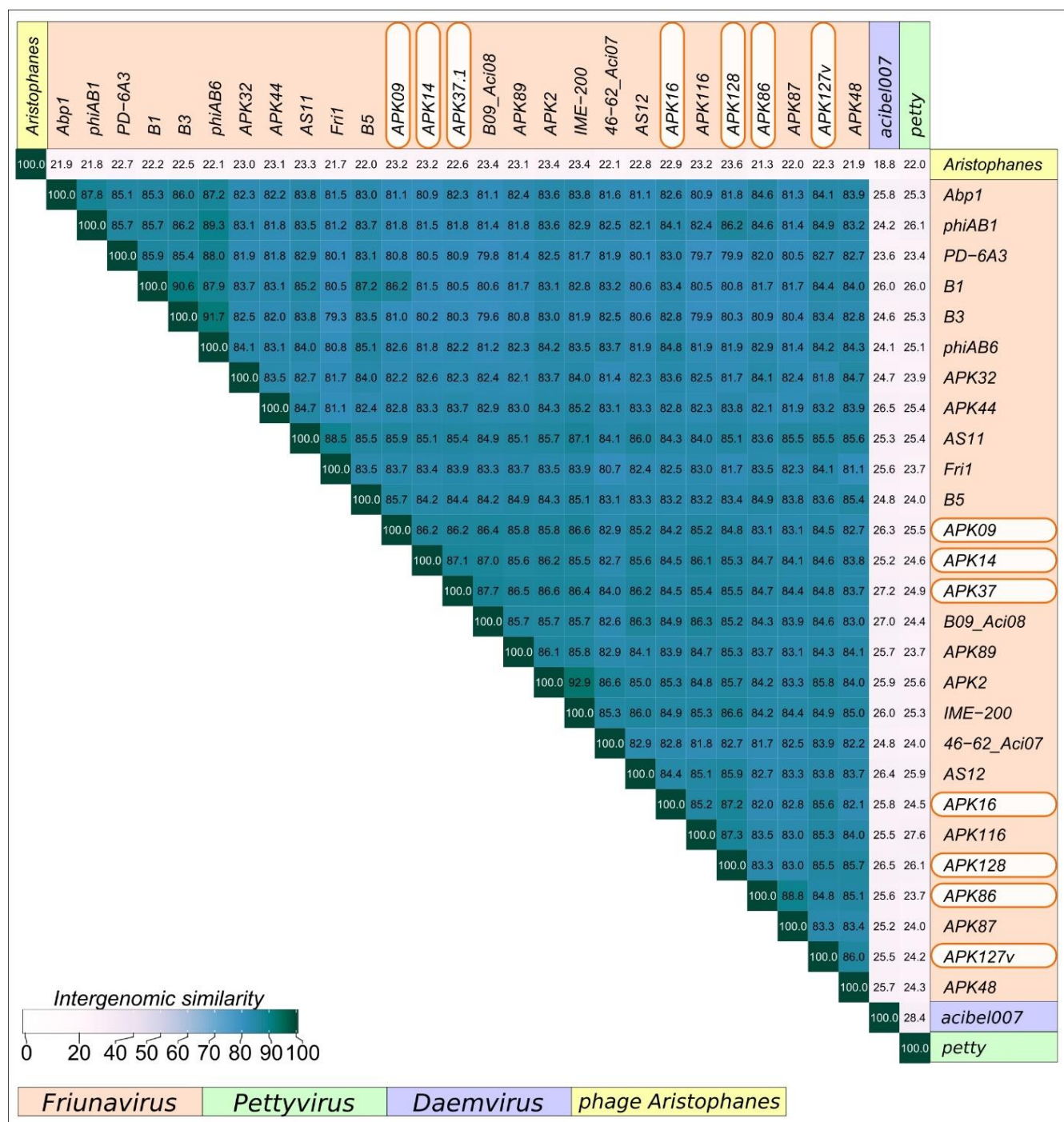


Рисунок 4. Карта сходства нуклеотидных последовательностей геномов 30 бактериофагов подсемейства *Beijerinckvirinae*, инфицирующих *A. baumannii*, сгенерированная с помощью VIRIDIC.

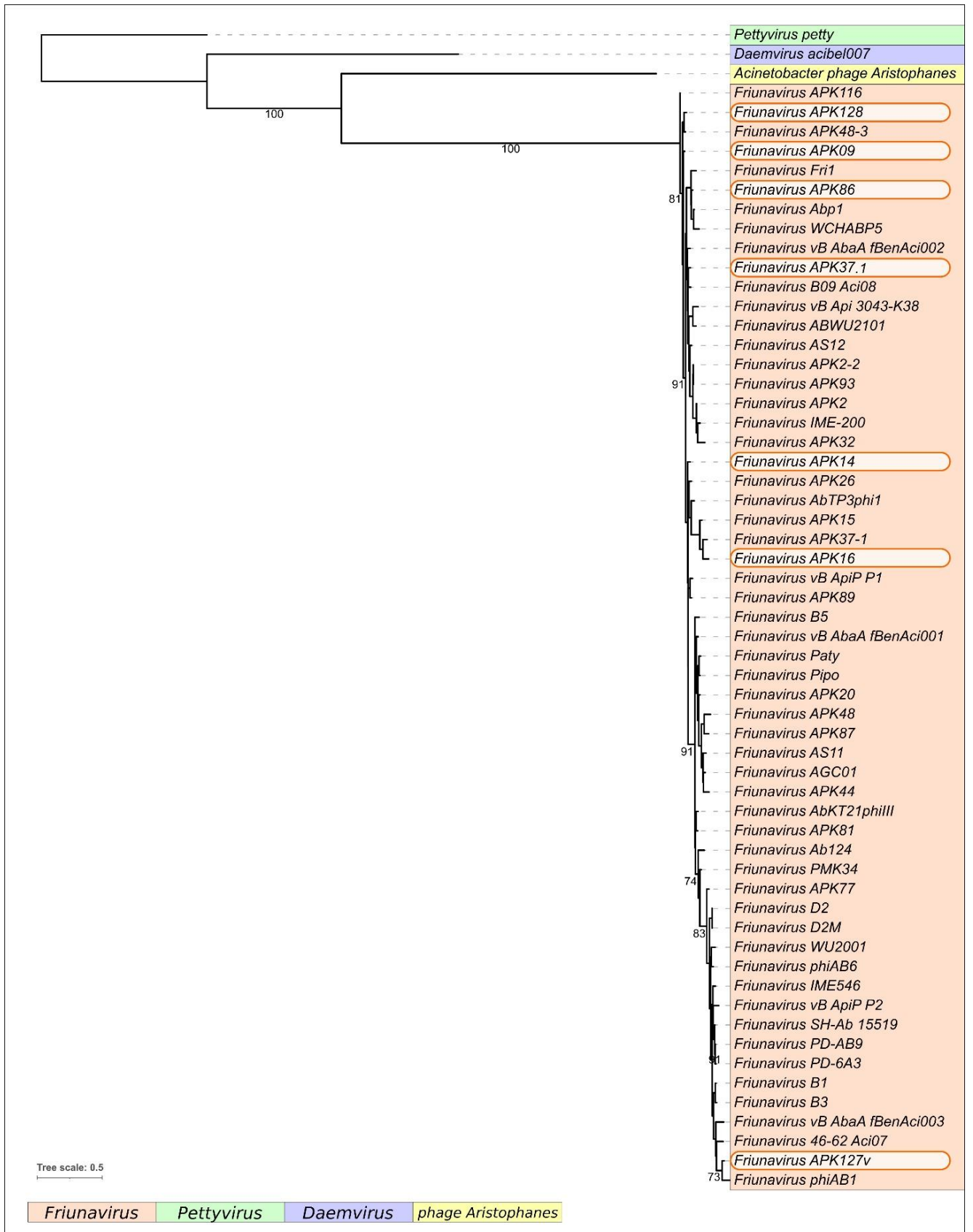


Рисунок 5. Филогенетический анализ геномов 60 бактериофагов подсемейства *Beijerinckvirinae*, сгенерированный с помощью RAxML-NG. Аминокислотные последовательности белков *Pettyvirus petty* были использованы в качестве референса.

3. Ферментативное взаимодействие рекомбинантных белков хвостовых шипов исследуемых бактериофагов с капсульными полисахаридами

Помимо использования коктейлей фагов в персонализированной медицине перспективным направлением является использование фаговых ферментов как противомикробных препаратов. Препараты на основе рекомбинантных полисахарид-деградирующих ферментов бактериофагов будут обладать лишь бактериостатическим эффектом, однако, их можно рассматривать в качестве агентов, снижающих потенциал вирулентности штаммов патогенных бактерий. Потеря или нарушение поверхностных полисахаридов, в том числе капсульного полисахарида, может сказаться на спектре чувствительности к антибиотикам, а также может предотвратить биоопленкообразование и снизить сопротивляемость компонентам иммунитета человека (фагоцитоз и действие системы комплемента). Терапевтический потенциал фаговых полисахарид-деградирующих ферментов был подтвержден в ряде исследований на лабораторных моделях *in vivo* (Pan Y.-J. et al., 2015; Majkowska-Skrobek G. et al., 2016). Таким образом, изучение принципов ферментативного взаимодействия между белком хвостового шипа бактериофага и капсульного полисахарида на поверхности бактериальной клетки позволит лучше понять основы применения фаготерапии в рамках персонализированного подхода в медицине.

Согласно данным, полученным при анализе фаговых геномов, адсорбционный аппарат бактериофагов Aristophanes, APK09, APK14, APK16, APK37.1, APK26, APK86, APK127v и APK128 был представлен белками хвостового шипа Aristophanes_gp41, APK09_gp48, AVPK14_gp49, APK16_gp47, APK26_gp48, APK37.1_gp49, APK86_gp49, APK127v_gp47 и APK128_gp45, соответственно. Биоинформатический анализ с помощью BLAST и HHM установил модульную структуру данных белков: N-концевая часть белка представляет собой консервативный участок связывания с частицей фага, в то время как C-концевая часть белка выполняет ферментативную функцию и отвечает за взаимодействие со структурами оболочки бактериальной клетки, в данном случае – полисахаридами капсулы. C-концевые участки всех исследуемых белков хвостового шипа, за исключением C-концевого участка белка Aristophanes_gp41, были гомологичны фаговым деполимеразам. C-концевой участок белка хвостового шипа бактериофага Aristophanes по данным поиска HHpred структурно соответствовал белкам семейства GDSL-подобных липаз/ацилгидролаз *Neisseria meningitidis* с E-value=1.3e⁻⁷.

Рекомбинантные белки, представляющие собой белки хвостовых шипов с делецией консервативного N-концевого участка, были экспрессированы в *E. coli* и очищены с помощью металло-хелатной и ионообменной хроматографии. Препараты очищенных капсульных

полисахаридов штаммов-хозяев исследуемых бактериофагов были обработаны рекомбинантными фаговыми ферментами, после чего структура полученных олигосахаридов была установлена с помощью метода ядерного магнитного резонанса.

По результатам экспериментов был установлен перечень связей в составе капсульного полисахарида штамма *A. baumannii*, гидролизуемых в результате ферментативного воздействия белков хвостового шипа исследуемых бактериофагов (Таблица 2).

Таблица 2. Спектр связей, гидролизуемых белками хвостового шипа исследуемых бактериофагов

Фаг	Белок хвостового шипа	Штамм-хозяин	К-тип	Гидролизуемая связь
Aristophanes	Aristophanes_gp41	KZ-1098	K26	6dTal-OAc
АРК09	АРК09_gp48	B05	K9	β -D-GlcpNAc-(1→3)- α -D-GalpNAcA
АРК14	АВРК482_gp49	АВ5256	K14	β -D-Galp-(1→3)- α -D-GalpNAc α -D-GalpNAc-(1→4)- β -D-GalpNAc
АРК16	АРК16_gp47	D4	K16	β -D-Galp-(1→3)- β -D-GalpNAc
АРК26	АРК26_gp48	KZ-1098	K26	β -D-GlcpNAc-(1→2)- α -Manp
АРК37.1	АРК37.1_gp49	KZ-1101	K37	β -D-GalpNAc-(1→3)- α -D-Galp
		АВ5001	K3-v1	β -D-GalpNAc-(1→3)- α -D-Galp
АРК86	АРК86_gp49	MAR55-66	K86	β -D-GalpNAc-(1→3)- α -L-Rhap
АРК127	АРК127v_gp47	36-1454	K127	β -D-GalpNAc-(1→3)- α -D-Galp
АРК128	АРК128_gp45	KZ-1093	K128	β -D-GalpNAc-(1→4)- α -D-Galp

1. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* B05 была идентична структуре капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* MDR_TJ, капсульный тип K9 (Kenyon J.J., 2013). Повторяющееся звено (K-unit) капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* B05 состоит из 4 моносахаридов: α -D-GalpNAcA, β -D-GlcpNAc, и два остатка 2-ацетиламино-3,6-дидезокси-D-галактозы (FucNAc). Под воздействием деполимеразы бактериофага АРК09 полисахарид разрушается с образованием димеров и тримеров повторяющегося звена.
2. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* АВ5256 была идентична капсульному типу K14, описанному для штамма *A. baumannii* D46 (Kenyon J.J. et al, 2015).

Повторяющееся звено представлено пентасахаридом, состоящим из остатков α -D-GalpNAc, β -D-Galp, α -D-Galp, β -D-GalpNAc и β -D-Glcp. Расщепление капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* AB5256 под воздействием деполимеразы фага APK14 приводит к образованию мономеров и димеров повторяющегося звена.

3. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* D4 была установлена ранее (Kenyon J.J. et al, 2019) и подтверждена ходе описываемой работы. Повторяющееся звено представлено трисахаридом, включающим остатки β -D-Galp, псевдоаминовой кислоты и β -D-GalpNAc. Расщепление капсульного полисахарида под воздействием деполимеразы фага APK16 приводит к образованию мономера повторяющегося звена.
4. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* KZ-1098 капсульного типа K26 была впервые установлена в ходе данной работы. Повторяющееся звено представлено разветвленным гексаолигосахаридом. Расщепление капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* KZ-1098 деполимеразой бактериофага APK26 приводит к образованию трёх типов продуктов, соответствующих мономеру, димеру и тримеру повторяющегося звена.
5. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* KZ-1101 была идентична структуре капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* NIPH146, принадлежащего к капсульному типу K37 (Arbatsky N.P. et al., 2015). Повторяющееся звено представлено пентасахаридом, включающим остатки β -D-GalpNAc, β -D-Glcp, α -D-Galp, β -D-GalpNAc и β -D-Glcp. Расщепление капсульного полисахарида деполимеразой фага APK37.1 приводит к образованию мономера, димера и тримера повторяющегося звена.
6. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* AB5001 была охарактеризована как соответствующая дефектному капсульному типу K3. Повторяющееся звено представлено тетрасахаридом, включающим остатки β -D-GalpNAc, β -D-Glcp, α -D-Galp и β -D-GlcpNAc3Ac. Расщепление капсульного полисахарида деполимеразой фага APK37.1 приводит к образованию мономера и димера повторяющегося звена.
7. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* MAR-55-66 была установлена ранее (Kenyon J.J. et al, 2021) и подтверждена в ходе данной работы. Повторяющееся звено представлено гептасахаридом, включающим остатки β -D-GlcpA, β -D-GalpNAc и пять остатков L-рамнозы (L-Rha). Расщепление капсульного полисахарида деполимеразой фага APK86 приводит к образованию мономера, димера и тримера повторяющегося звена.
8. Повторяющееся звено капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* 36-1454 представлено пентасахаридом, включающим остатки β -D-Glcp, β -D-GalpNAc и α -D-Galp. Расщепление капсульного полисахарида деполимеразой фага APK127v приводит к образованию мономера повторяющегося звена.

9. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* KZ-1093 была установлена ранее (Arbatsky N.P. et al., 2019) и подтверждена в ходе данной работы. Повторяющееся звено представлено разветвленным гексахаридом, включающим остатки β -D-Glcp, α -D-Galp и β -D-GlcpNAc. Расщепление капсульного полисахарида деполимеразой фага APK128 приводит к образованию димера повторяющегося звена.
10. Обработка капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* KZ-1098 рекомбинантным белком хвостового шипа бактериофага Aristophanes не вызвала значительных изменений в спектре ЯМР. Наблюдаемые изменения спектра соответствуют O-деацетилированию остатка 6-дезокситалозы 6dTal.

Полученные данные, таким образом, свидетельствуют о том, что полисахарид-деградирующие ферменты бактериофагов APK09, APK14, APK16, APK37.1, APK26, APK86, APK127v и APK128 разрушают O-гликозидные связи между повторяющимися звеньями капсульных полисахаридов по гидролитическому пути, то есть являются специфическими гликозидазами класса гидролаз. Для бактериофага Aristophanes показана деацетилазная активность белка хвостового шипа.

Заключение

Разработка новых стратегий терапии инфекций, вызванных мультирезистентными бактериальными патогенами, является одной из приоритетных задач здравоохранения. Одним из возможных решений этой задачи может быть использование литических бактериофагов против проблемных возбудителей. Важной характеристикой фагов-кандидатов для включения в препараты для фаготерапии является диапазон штаммов-хозяев - способность фага проявлять литическую активность в отношении различных, клинически значимых штаммов патогена. Данная работа посвящена бактериофагам, инфицирующим *A. baumannii*. Принимая во внимание тот факт, что в большинстве известных случаев первичными рецепторами для фагов *A. baumannii* являются капсульные полисахариды, логично предположить, что рациональный подбор литических бактериофагов для включения в препараты для фаготерапии должен быть основан на понимании механизмов взаимодействия фаговых ферментов с экзополисахаридами, продуцируемыми штаммами *A. baumannii*. Высокое разнообразие и изменчивость структур капсульных полисахаридов штаммов *A. baumannii* подразумевают существование такого же разнообразия фаговых ферментов, способных специфически распознавать и расщеплять различные связи в структуре капсульных полисахаридов.

По результатам данной работы было выделено из объектов окружающей среды (сточная и речная вода) 9 бактериофагов, инфицирующих штаммы *A. baumannii* девяти различных

капсульных типов. По результатам биоинформатического анализа геномов все выделенные фаги принадлежали к семейству *Autographiviridae*, при этом восемь из них – к роду *Friunavirus*, и один - являлся первым представителем ранее неопisanного рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae*. Геномы бактериофагов АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 демонстрировали высокую степень сходства с геномами ранее выделенных фриунавирусов, инфицирующих *A. baumannii*. Областью наибольшей вариабельности геномов был участок, кодирующий распознающие капсульные полисахариды домены белка хвостового шипа. Геном бактериофага *Aristophanes* несколько отличался по длине, количеству генов, длине концевых повторов, G+C – составу. Однако, принципиальная организация генома совпадала с таковой для остальных выделенных в ходе исследования фагов. Также существенным отличием бактериофага *Aristophanes* было наличие деацетилазной активности белка хвостового шипа, в то время как для остальных выделенных фагов наблюдалась классическая деполимеразная активность. Стратегия деацетилирования экзополисахаридов ранее была известна только для ряда бактериофагов, инфицирующих энтеробактерии. Для фагов, инфицирующих *A. baumannii*, такой механизм взаимодействия с первичными рецепторами на поверхности бактериальной клетки был описан впервые.

Учитывая высокую специфичность выделенных бактериофагов рода *Friunavirus* по отношению к штаммам *A. baumannii* различных капсульных типов, а также их высокую литическую активность, можно сделать вывод о том, что исследуемые фаги могут быть включены в коллекцию вирусов для возможной фаготерапии.

Выводы

1. В ходе представленной работы была сформирована коллекция из девяти ранее не известных литических бактериофагов, специфически инфицирующих штаммы *A. baumannii* капсульных типов К09, К14, К16, К37/К3-v1, К26, К86, К127 и К128. Выделенные фаги, за исключением бактериофага *Aristophanes*, получили названия в соответствии с номером капсульного типа штамма-хозяина.
2. Изучены биологические и молекулярно-генетические характеристики выделенных бактериофагов. На основе биоинформатического анализа показано, что бактериофаги АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 являются представителями рода *Friunavirus*, а фаг *Aristophanes* - первым представителем ранее неопisanного рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae*.
3. Установлен механизм работы взаимодействующих с капсульными полисахаридами ферментов выделенных бактериофагов. Деполимеразы бактериофагов АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 расщепляют O-гликозидные связи

капсульных полисахаридов по гидролитическому пути, то есть являются специфическими гликозидазами класса гидролаз.

4. Показано, что бактериофаг *Aristophanes* – первый и, на сегодняшний день, единственный представитель среди описанных фагов *A. baumannii*, в геноме которого закодирована структурная деацетилаза, ответственная за O-деацетилирование одного из остатков сахара капсульного полисахарида K26.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Ландышев Н.Н., Воронько Я.Г., **Тимошина О.Ю.**, Суслина С.Н., Акимкин В.Г., Мирошников К.А. Обзор законодательства в области обращения персонализированных препаратов бактериофагов. // Вопросы вирусологии. 2020 –т.65, №5, с. 259–266.
2. Popova A. V., Shneider M. M., Arbatsky N. P., Kasimova A. A., Senchenkova S. N., Shashkov A. S., Dmitrenok A. S., Chizhov A. O., Mikhaylova Y. V., Shagin D. A., Sokolova O. S., **Timoshina O. Y.**, Kozlov R.S., Miroshnikov K. A., Knirel, Y. A. Specific Interaction of Novel Friunavirus Phages Encoding Tailspike Depolymerases with Corresponding *Acinetobacter baumannii* Capsular Types. //Journal of Virology. 2021. – Т. 95. – №. 5. – С. e01714-20.
3. Arbatsky N. P., Shashkov A. S., Chizhov A. O., **Timoshina O. Y.**, Shneider M. M., Knirel Y. A. Structure of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* MAR 55–66 //Russian Chemical Bulletin. – 2021. – Т. 70. – №. 3. – С. 592–599.
4. **Timoshina O. Y.**, Shneider M. M., Evseev P. V., Shchurova A. S., Shelenkov A. A., Mikhaylova Y. V., Sokolova O. S., Kasimova A. A., Arbatsky N. P., Dmitrenok A. S., Knirel Y. A., Miroshnikov K. A., Popova, A. V. Novel *Acinetobacter baumannii* bacteriophage aristophanes encoding structural polysaccharide deacetylase //Viruses. – 2021. – Т. 13. – №. 9. – С. 1688.
5. Kasimova A. A., Arbatsky N. P., **Timoshina O. Y.**, Shneider M. M., Shashkov A. S., Chizhov A. O., Popova A. V., Hall R. M., Kenyon J. J., Knirel Y. A. The K26 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* KZ-1098: Structure and cleavage by a specific phage depolymerase //International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Т. 191. – С. 182-191.
6. **Timoshina O. Y.**, Kasimova A. A., Shneider M. M., Arbatsky N. P., Shashkov A. S., Shelenkov A. A., Mikhaylova Y. V., Popova A. V., Hall R. M., Knirel Y. A., Kenyon J. J. Loss of a Branch Sugar in the *Acinetobacter baumannii* K3-Type Capsular Polysaccharide Due To Frameshifts in the *gtr6* Glycosyltransferase Gene Leads To Susceptibility To Phage APK37.1 //Microbiology Spectrum. – 2023. – С. e03631-22.

7. **Timoshina O. Y.**, Kasimova A. A., Shneider M. M., Matyuta I. O., Nikolaeva A. Y., Evseev P. V., Arbatsky N. P., Shashkov A. S., Chizhov A. O., Shelenkov A. A., Mikhaylova Y. V., Slukin P. V., Volozhantsev N. V., Boyko K. M., Knirel Y. A., Miroshnikov K. A., Popova, A. V. Friunavirus Phage-Encoded Depolymerases Specific to Different Capsular Types of *Acinetobacter baumannii*. // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т.24.-С. 9100.

Тезисы докладов на конференциях:

1. The Future Applications of Bacteriophages: First Annual Phage International Conference in Egypt, 2021. Characterization of the New Lytic *Acinetobacter baumannii* Phage Aristophanes. **O. Yu. Timoshina**, M. M. Shneider, A. V. Popova, P. V. Evseev, K. A. Miroshnikov.
2. XXXIV Международная зимняя молодёжная научная школа ИБХ РАН, 2022. Новые бактериофаги семейства *Autographiviridae*, инфицирующие *Acinetobacter baumannii*. **Тимошина О.Ю.**, Шнейдер М.М., Евсеев П.В., Михайлова Ю.В., Касимова А.А., Книрель Ю.А., Попова А.В., Мирошников К.А.