



УДК 577.112.088.052:578.811

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ КАПСИДА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ БАКТЕРИОФАГА SN *Pseudomonas aeruginosa* ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

© 2009 г. М. В. Фильчиков\*, Д. И. Осмаков\*, Л. В. Логовская\*, Н. Н. Сыкилинда\*,  
В. А. Кадыков\*, Л. П. Курочкина\*, В. В. Месянжинов\*, Р. А. Бернал\*\*, К. А. Мирошников\*\*

\*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\*\*Университет Техас-Эль Пасо, Эль Пасо, США

Поступила в редакцию 15.05.2009 г. Принята к печати 02.06.2009 г.

Вирулентный бактериофаг SN *Pseudomonas aeruginosa* относится к виду РВ1-подобных фагов семейства Myoviridae. Сравнительно небольшой (66391 п. о.) ДНК-геном этого фага содержит 89 предсказанных открытых рамок считывания, а протеом включает не менее 20 структурных белков. Представлена пространственная модель капсида, построенная на основе реконструкции криоэлектронно-микроскопических изображений с разрешением около 18 Å, которая выявила ряд особенностей строения капсомеров, присущих только этому виду бактериофагов. Получены и очищены рекомбинантные структурные белки gp22 и gp29 бактериофага SN и специфические поликлональные антитела против них. На препарате очищенного фага SN проведена иммуноэлектронная микроскопия с визуализацией вторичными антителами, конъюгированными с частицами золота. Установлено, что gp29 формирует чехол, а gp22 – декорирующий белок капсида фага SN. Точная идентификация местоположения многокопийных белков представляет интерес как потенциальная основа конструирования генно-инженерных моделей, несущих пептиды на поверхности вирусной частицы (фаговый дисплей).

*Ключевые слова:* *Pseudomonas aeruginosa*, бактериофаг SN, структурные белки, пространственная реконструкция; протеомика; криоэлектронная микроскопия; иммуноэлектронная микроскопия.

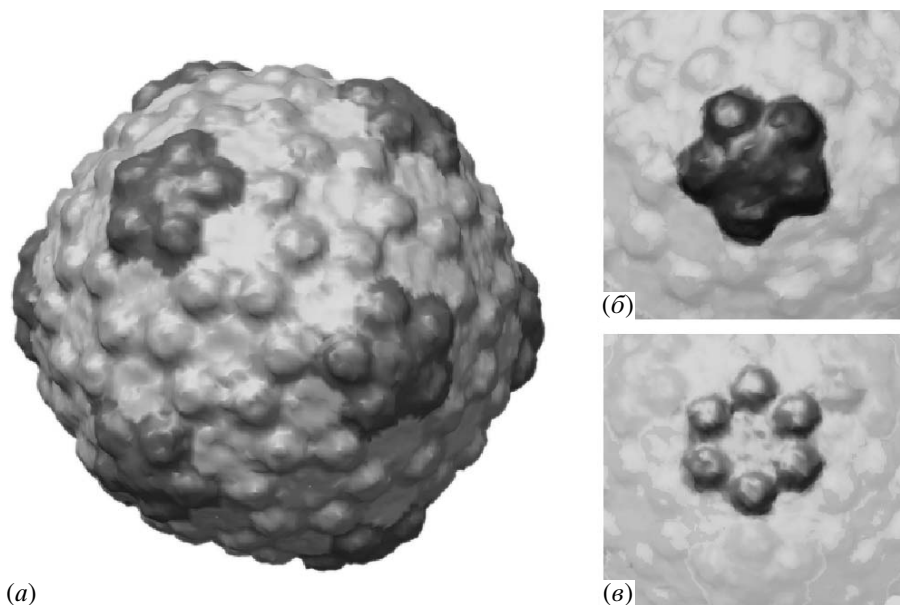
### ВВЕДЕНИЕ

Грамотрицательная бактерия *Pseudomonas aeruginosa*, широко распространенная в почве и воде, относится к условным патогенам. Этот микроорганизм способен вызывать серьезные вторичные инфекции у оперированных и ожоговых пациентов, а также больных кистозным фиброзом и иммунодефицитом [1]. Специфические бактериофаги *Pseudomonas* изучаются несколько десятилетий и применяются в качестве типизирующих и терапевтических агентов [2, 3]. Выделенный нами в нашей лаборатории вирулентный бактериофаг SN *P. aeruginosa* относится к таксономическому виду РВ1-подобных бактериофагов семейства Myoviridae. К настоящему времени около 40 бактериофагов отнесены к этому виду на основе ДНК-гибридизации и морфологических особенностей вирусной частицы [4–6], однако лишь недавно было проведено детальное генетическое изучение некоторых

представителей РВ1-подобных фагов, в частности бактериофага SN *P. aeruginosa* [7].

Выраженной особенностью морфологии РВ1-подобных бактериофагов, наблюдаемой при электронной микроскопии негативного контрастирования, являются характерные капсомеры, выглядящие как 8-нм впадины на головке (капсиде) фага размером 74 нм, а также необычная перекрестная бороздчатость 140-нм хвоста [3]. Выявление деталей строения вирусной частицы с более высоким разрешением, а также установление белкового состава характерных элементов структуры исключительно важно как для фундаментальных целей (изучение структуры и молекулярной динамики сложных белковых комплексов), так и для потенциального прикладного использования вирусных частиц (фаговый дисплей, генная терапия). В представленной работе для решения этой задачи на примере бактериофага SN *P. aeruginosa* были применены современные методы геной инженерии, иммунохимии, электронной микроскопии и пространственной реконструкции изображений.

# Автор для связи (тел./факс: (495) 335-60-22; эл. почта: kmi@ibch.ru).



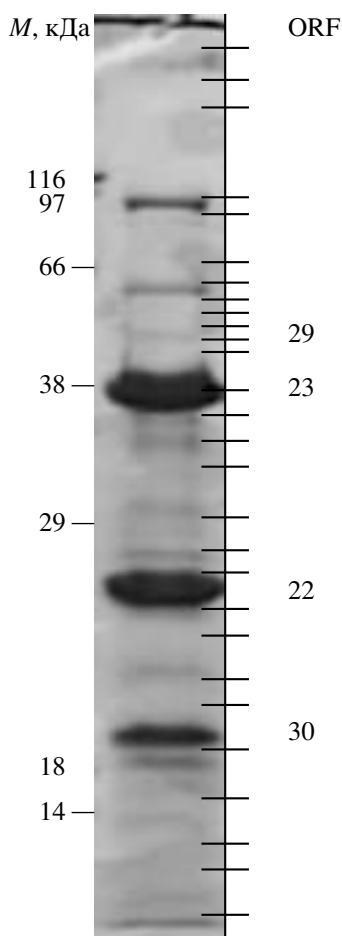
**Рис. 1.** (а) – Пространственная реконструкция капсида бактериофага SN. Цветом выделены различные капсомеры на поверхности; (б) – вершинный капсомер; (в) – основной капсомер.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериофаги (вирусы бактерий), имеющие геном в виде двухцепочечной ДНК, представляют собой наиболее многочисленную, широко распространенную в биосфере и, предположительно, наиболее эволюционно древнюю группу вирусов [8, 9]. Более чем полувековое использование бактериофагов в качестве удобных объектов исследований привело к многочисленным основополагающим открытиям в областях молекулярной и структурной биологии, физиологии и эволюции микроорганизмов и вирусов, развитию физико-химических методов исследования микрообъектов [10, 11]. Наиболее широко применяемый метод изучения структуры и морфологии вирусов – электронная микроскопия и, в частности, криоэлектронная микроскопия. В последнем случае образец быстро замораживается в аморфном (некристаллическом) льду, при этом кристаллы льда не повреждают образец и не создают слой, сильно поглощающий электроны, что позволяет наблюдать нативную структуру. Кроме того, в криоэлектронной микроскопии не используется контрастирующий агент, что позволяет избежать артефактов контрастирования. Значительное увеличение производительности компьютерной техники в последнее десятилетие привело к распространению метода трехмерной реконструкции изображений, получаемых при криоэлектронной микроскопии, который позволяет создать объемную модель объекта [12]. Этот подход способен достичь разрешения 6 Å в случае использования единичных частиц [13] и 4 Å для двумерных кристаллов [14].

На основе 900 исходных микрофотографий, полученных при криоэлектронной микроскопии бактериофага SN, была осуществлена трехмерная реконструкция его капсида с разрешением около 18 Å. Показано, что капсид бактериофага SN представляет собой правильный икосаэдр с диаметром 74 нм с числом триангуляции  $T = 9$ , на поверхности которого присутствуют несколько различающихся структурных белковых элементов (рис. 1а). Основные структурные элементы обладают симметрией вращения шестого порядка (рис. 1в). В 11 вершинах икосаэдра расположены структурные элементы, имеющие симметрию вращения пятого порядка (рис. 1б); последнюю, 12-ю вершину занимает капсомер, который формирует место присоединения сократимого хвоста вируса, также обладающей симметрией вращения 5-го порядка и, в целом, похожей на структуры, занимающие остальные вершины. Внутри капсида расположена геномная двухцепочечная ДНК вируса, протяженностью 66391 п.о., в которой, как показано ранее [7], идентифицируется 89 открытых рамок считывания.

Анализ протеома, основанный на идентификации пептидов, полученных расщеплением трипсином структурных белков, путем масс-спектрометрии, а также поиск белков, гомологичных по последовательности, показали, что в формирование частицы бактериофага SN вовлечена область генома, включающая открытые рамки считывания (ORF) от 17 до 45 [7]. Одномерный электрофорез структурных белков, входящих в состав частиц РВ1-подобных фагов, выявляет практически иден-



**Рис. 2.** 12% SDS-ПААГ-электрофорез структурных белков бактериофага SN. Слева – маркер молекулярных масс (Fermentas), справа обозначено соответствие полос белка продуктам генов SN [7].

тичный профиль белковых полос, с небольшими вариациями в области 14–20 кДа [7], для фага SN он показан на рис. 2. Такой консерватизм в белковом составе служит отражением более чем 95% идентичности нуклеотидной последовательности этой области генома у среди PB1-подобных фагов.

Электроспрей-масс-спектрометрический анализ частиц бактериофага SN привел к экспериментальной идентификации 22 предсказанных биоинформационными методами белков при покрытии последовательности каждого до 56%. В качестве основных строительных блоков фаговой частицы идентифицированы продукты генов 22, 23, 29 и 30 [7]. Известно, что наибольшее число идентичных молекул в частице фага имеет основной белок головки (например, для бактериофага N4 с тем же  $T = 9 - 520 \pm 30$  копий [15]). Можно предположить, что таковым для фага SN является gr23, так как электрофоретическая полоса с максимальной интенсивностью соответствует этому белку (рис. 2).

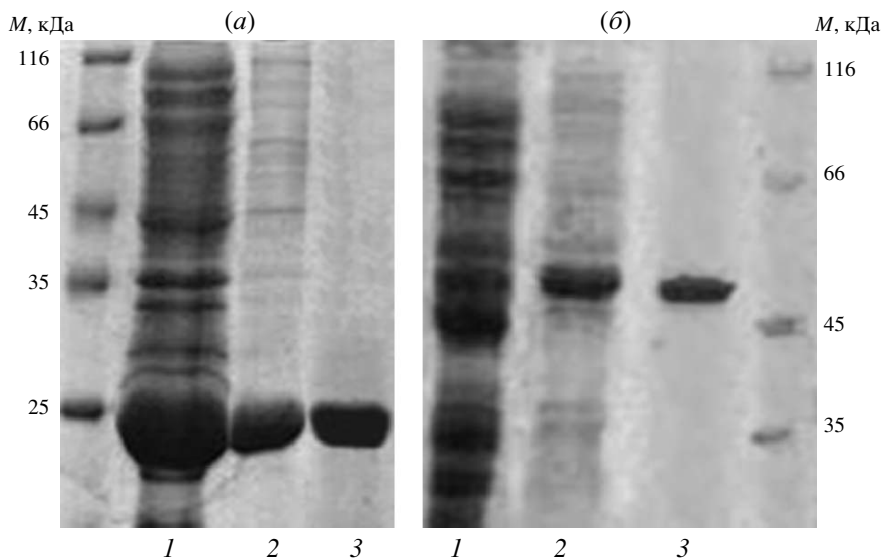
Также известно, что во многих фагах основной капсидный белок претерпевает протеолитическую модификацию в ходе созревания частицы. Эта тенденция соблюдается и для gr23 фага SN: при масс-спектрометрическом анализе не было обнаружено *N*-концевых пептидов этого белка [7].

По аналогии с другими фагами с известной структурой, можно предположить, что в силу своего размера и разнообразия структурных элементов, капсид бактериофага SN не может состоять из одинаковых белков. Кроме того, неизвестно, какие из белков, представленных в протеоме (рис. 2), входят в состав головки, а какие – хвоста. Структурные особенности бактериофагов T4 [16, 17],  $\lambda$  [18],  $\phi$ KZ [19, 20] были изучены с помощью криоэлектронной микроскопии с использованием мутантов фагов, представляющих собой отдельно капсид или хвост. У недавно выделенного фага SN такие мутанты пока неизвестны. Из анализа первичной структуры многокопийных белков частицы фага SN, их функцию и топологию, кроме как для белка gr23, предположить нельзя.

Гомология последовательностей рамок считывания, кодирующих gr22, 29 и 30 у PB1-подобных фагов, наблюдается только для представителей этого вида и, в некоторой степени, для группы Всер781-подобных фагов *Burkholderia cepacia* [21], у которых роль большинства генов и их продуктов также неизвестна. Таким образом, стратегией локализации структурных белков бактериофага SN было выбрано получение рекомбинантных белков и антител к ним, с последующей визуализацией места прикрепления антитела к частице фага.

Нами были получены плазмидные векторы, несущие гены 22 и 29 фага SN под контролем промотора T7, и отработана система синтеза их растворимых продуктов в клетках *E. coli*. Разработанные методы выделения и очистки рекомбинантных белков позволяют получать электрофоретически чистые продукты, пригодные для иммунизации и исследования физико-химическими методами (рис. 3). Для обоих белков были получены поликлональные мышинные сыворотки, которые специфически взаимодействуют с соответствующими белками в составе фага.

Иммуноэлектронная микроскопия (иммуно-ЭМ) непосредственно отображает локализацию связывания вторичных антител, меченных коллоидным золотом, с первичными антителами, которые специфически присоединились к белкам в составе частицы фага. Анализ полученных изображений показывает, что при использовании в качестве первичных антител сыворотки против gr22 частицы золота связывались с головкой фага, а в случае сыворотки против gr29 – с хвостовым чехлом, причем связывание наблюдалось как с интактными, так и с сокра-

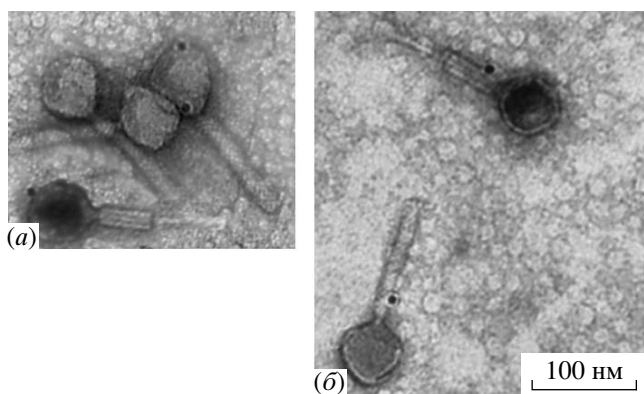


**Рис. 3.** Электрофоретический анализ рекомбинантных gr22 (а) и gr29 (б) в исходном лизате клеток (1), после фракционирования сульфатом аммония (2) и хроматографической очистки (3) в 12% (а) и в 10% SDS-ПААГ (б). М – Маркер молекулярных масс (Fermentas).

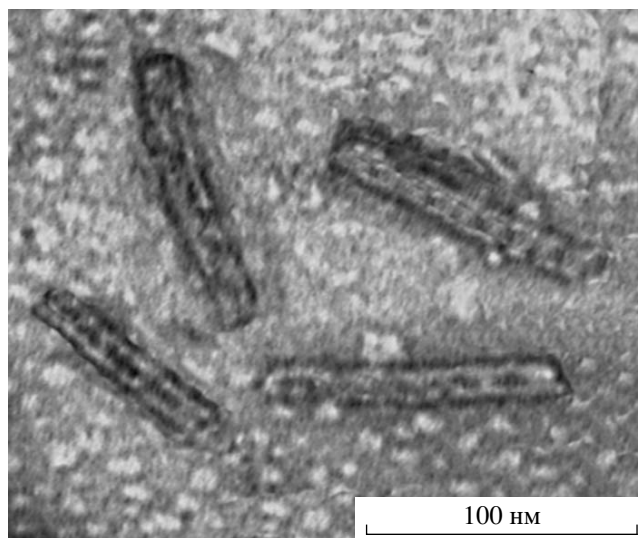
ценными чехлами (рис. 4). На основании этого можно сделать вывод, что gr22 является белком, декорирующим поверхность капсида, а gr29 формирует хвостовой чехол. В пользу последнего утверждения свидетельствуют также данные электронной микроскопии, согласно которым рекомбинантный gr29 формирует полимерные структуры нерегулярной длины (полчихлы) подобно чехольным белкам других фагов (gr18 фага T4 [22] и gr29 фага phiKZ [20]) (рис. 5).

Белковые оболочки вирусных капсидов представляют собой исключительно стабильные и вместе с тем динамичные структуры. Они должны

предохранять геном во время его переноса между клетками-хозяевами, противостоять давлению свернутой нуклеиновой кислоты и быть способными высвободить геном в процессе инфекции [23]. С помощью электронно-микроскопических методов можно детально исследовать конформационные перестройки белковых оболочек, сопровождающие созревание капсида и процесс инфекции [18, 23]. В последнее время в медицинских приложениях нанотехнологий активно разрабатывается концепция виросом – использования природных или генно-инже-



**Рис. 4.** Иммуноэлектронная микроскопия. Суспензию фага SN инкубировали с сывороткой против gr22 (а) и gr29 (б), а затем с вторичными антителами, конъюгированными с частицами золота (10 нм). Образцы контрастировали 1%-ным уранилацетатом. Масштабная линейка 100 нм.



**Рис. 5.** Электронные микрофотографии полчихлов, формируемых рекомбинантным gr29. Масштабная линейка 100 нм.

нерных оболочек вирусов, в том числе и бактериофагов, для вакцинации и целевой доставки нуклеиновых кислот в определенное место организма [24, 25]. Исчерпывающее понимание строения и молекулярной динамики замкнутых биологических наночастиц, типичными представителями которых можно считать капсиды бактериофагов, необходимо для успешной реализации стратегии.

В диагностических и исследовательских целях широко распространен фаговый дисплей (система синтеза или специфического присоединения пептидов на поверхности частицы бактериофага [26]), который активно развивается в направлении использования в роли фагов-носителей не только общепринятых нитчатых, но и хвостатых фагов. Аксесуарные белки капсида (gpD фага  $\lambda$  [27], gpSoc и gpHoc фага T4 [28]) в качестве платформы дисплея позволяют преодолеть ограничения, накладываемые на размер дисплейного пептида и проблемы дестабилизации модифицированного фага. Пока эксперименты с дисплеями на хвостатых фагах проводятся на хорошо изученных бактериофагах *E. coli*. Однако использование новых фагов и других культивируемых бактериальных хозяев существенно расширяет потенциал метода.

В дальнейшем мы планируем провести реконструкцию хвоста фага SN, изучить свойства gp29 и решить его пространственную структуру. Это позволит сравнить SN gp29 с чехольными белками других миовирусов для установления общих закономерностей и выявления характерных отличительных особенностей процесса сокращения чехла при инфицировании [29]. Решение этой проблемы носит фундаментальный характер, поскольку чехлы представляют собой простейшие однокомпонентные системы, которые служат удобной моделью для понимания функционирования других более сложно организованных двигательных систем.

Таким образом, полученные данные позволяют дополнить существующие на сегодняшний день представления об архитектуре и механизме инфицирования бактериофагов семейства Myoviridae, что необходимо и значимо для их практического применения.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Процедуры ПЦР и молекулярного клонирования проводили стандартными методами [30] с учетом рекомендаций фирм-производителей. Использовали штаммы *E. coli* NovaBlue и BL21(DE3) (Novagen, США), эндонуклеазы рестрикции, T4-ДНК-лигазу и соответствующие буферы для реакций (Fermentas, Литва).

**Выделение и очистка бактериофага SN.** Бактериофаг SN был выделен из пробы воды озера Чёрное Владимирской области методом обогащения образцов [6]. Штамм *P. aeruginosa* PAO1 выращивали при 37°C и интенсивной аэрации в среде 2xTY до плотности  $2 \times 10^8$  клеток/мл, далее инфицировали суспензией фага SN с множественностью 1 и инкубировали до полного лизиса клеток. Клетки дополнительно лизировали добавлением хлороформа до конечной концентрации 0.5% (по объему) в течение 4 ч при 4°C. Фаговую суспензию инкубировали с ДНКазой I (Sigma, США, 20 мкг/мл) в течение 1 ч при комнатной температуре. Клеточные фрагменты удаляли центрифугированием при 3500 об/мин (Megafuge 2.0 R, Heraeus, Германия) в течение 20 мин. Титр фага составлял  $10^{10}$ – $10^{11}$  бляшкообразующих единиц/мл. Препарат фага концентрировали центрифугированием при 15500 об/мин (Sorvall RS 5, ротор SA600, США) в течение 1 ч при 4°C. Осадок ресуспендировали в 2 мл среды, наносили на ступенчатый градиент концентраций CsCl и фракционировали при 22000 об/мин (Beckman ротор SW40) в течение 2.5 ч [31]. Опалесцирующую полосу фага отбирали и диализовали в течение ночи против 10 mM Трис-HCl pH 7.5, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl.

**Создание векторов и синтез белков.** Гены 22 и 29 фага SN, содержащие 636 и 1515 п.о. соответственно, амплифицировали посредством ПЦР с использованием ДНК фага в качестве матрицы и олигонуклеотидных праймеров (5'-3'):

22F GAGTAACATATGTTCCAGAAACAAGTT-TAC,

29F GGAGATCATATGGTGATCAGTCAGAGC-CGT,

22R GACGCAAGCTTACTGCGTGCGCTGGAC,

29R CGCCGGGATCCATTAGATCATCACATCCG, содержащих сайты эндонуклеаз FauNDI, HindIII и BamHI (подчеркнуты), соответственно. Продукты ПЦР-амплификации очищали с помощью набора Qiagen PCR и обрабатывали соответствующими ферментами. Ген 22 лигировали под контроль промотора фага T4 в вектор pET26b(+) (Novagen), обработанный ферментами FauNDI и HindIII, а ген 29 – в вектор pET23b(+) (Novagen), обработанный ферментами FauNDI и BamHI, под контроль промотора фага T7, и трансформировали клетки *E. coli* NovaBlue. Наличие вставки в плазмиде проверяли ПЦР с использованием вышеуказанных праймеров, обработкой эндонуклеазами и ДНК-секвенированием. Полученные плазмидные векторы, обозначенные pSN22 и pSN29, продуцирующие gp22 и gp29 соответственно, трансформировали для экспрессии в клетки *E. coli* BL21(DE3). Клетки наращивали в среде 2xTY при 37°C до  $A_{600} \sim 0.6$ , синтез белка индуцировали добавлением изопропил-1-тио- $\beta$ -D-га-

лактозида (Хеликон, Россия) до концентрации 1 мМ, и клетки инкубировали в течение 3 ч при 25°C при умеренной аэрации.

**Выделение и очистка белков.** Клетки *E. coli* из 0.5 л среды осаждали центрифугированием при 3500 об/мин (Megafuge 2.0 R, Heraeus) в течение 15 мин, и осадок ресуспендировали в 5 мл буфера А (20 мМ Трис-НСl рН 8.0, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид). Клетки разрушали ультразвуком в течение 2–3 мин (Techran MD20, импульсы по 15 с с перерывами 20 с), нерастворимые фрагменты клеток отделяли центрифугированием при 12000 об/мин (Sorvall RS 5, ротор SA600) в течение 10 мин при 4°C. ДНК фага удаляли преципитацией сульфатом стрептомицина с последующим центрифугированием при 12000 об/мин в течение 20 мин. Белок фракционировали добавлением насыщенного раствора сульфата аммония (30–35% (по объему) для gr22 и 25–30% – для gr29). Далее белки очищали хроматографически. Осажденный сульфатом аммония gr22 ресуспендировали в буфере А и наносили на анионообменную колонку Q-Sepharose Fast Flow (GE Amersham, США) 1 × 8 см. Элюцию белка производили в линейном градиенте концентрации NaCl (0–0.5 М) в буфере А. Осажденный сульфатом аммония gr29 ресуспендировали в 10 мМ Трис-НСl-буфере, рН 7.9 и наносили на гидроксилапатитную адсорбционную колонку (1 × 3 см Bio-Gel HT, Bio Rad, США) с последующей элюцией линейным градиентом Na-фосфата (10–300 мМ) при рН 7.8. Фракции анализировали с помощью электрофореза на SDS-ПААГ. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд с помощью набора реактивов Bio Rad.

**Иммунизация.** Самок мышей линии BALB/cJ иммунизировали внутрибрюшинно трехкратно с двухнедельными интервалами. Животным вводили суспензию, содержащую 50–100 мкг рекомбинантных gr22 или gr29 в 0.2 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) и 0.2 мл полного адъюванта Фрейнда при первой иммунизации или 0.2 мл неполного адъюванта при последующих иммунизациях. На 7-й день после второй или последующих иммунизаций отбирали кровь.

**Иммуноблоттинг.** Специфичность сывороток оценивали в иммуноблоттинге на белках очищенного фага SN после их разделения на SDS-ПААГ [32]. Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Novex), используя 0.1 М Трис-боратный буфер, 0.05 М EDTA, рН 8.3 [33]. Мембрану инкубировали 1 ч в растворе 1% BSA в фосфатно-солевом буфере, 0.05% Твин-20 (PBS-T) при 20°C для исключения неспецифической сорбции, инкубировали в течение 1 ч при 20°C с сывороткой, а затем в тех же условиях – с антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. На каж-

дой стадии мембрану промывали не менее 5 раз PBS-T. Комплексы белок–антитело–фермент окрашивали 0.02% 3',3'-диаминобензидином (Sigma). Титр сывороток против gr22 и gr29 определяли с помощью иммуноферментного анализа.

**Криоэлектронная микроскопия.** Изображения фаговых частиц были получены с помощью электронного криомикроскопа FEI/Philips F20 (Нидерланды) при напряжении 200000 В с увеличением 29000, криодержателя Gatan при температуре кипения жидкого азота (77 К), на пленке Kodak S0163 с выдержкой 1 с, с расстоянием расфокусировки 2–4 мкм. Пленка была выдержана в проявителе в течение 12 мин и 6 мин в фиксаже. Цифровые изображения были получены с помощью сканера MRC-KZA (Великобритания) с разрешением 12 мкм/пиксель, что дало окончательное разрешение изображений 3.44 Å/пиксель.

**Реконструкция изображений.** Отбор частиц осуществлялся полуавтоматическим корреляционным методом программы boxer из пакета EMAN. Предварительная модель построена с помощью программного комплекса EMAN [13] на основе метода общих линий, с использованием симметрии C5. Дальнейшее итеративное улучшение модели осуществлялось в программе SPIDER с использованием симметрии C5 и шагом в 3 градуса. Определение расстояния расфокусировки осуществлялось программой CTFFIND [34]. Разрешение реконструкции определялось по падению вдвое корреляции амплитуд Фурье-компонент двух независимых реконструкций, выполненных по четным и нечетным изображениям фаговых частиц. Визуализация трехмерных объектов выполнена в программе CHIMERA [35].

**Иммуноэлектронная микроскопия.** Иммуно-ЭМ проводили на препарате фага SN, очищенного в градиенте CsCl, который содержал как интактные частицы, так и частицы с сокращенным чехлом. Образец фага инкубировали с сывороткой против рекомбинантного белка (или преиммунной сывороткой в качестве контроля) в буфере PBS, 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре. Несвязавшиеся антитела удаляли центрифугированием фаговых частиц на ультрацентрифуге TL-100 (Beckman) при 30000 об/мин в течение 30 мин. Перед нанесением на сеточку осадок фаговых частиц еще дважды подвергали ресуспендированию/центрифугированию (один раз в PBS-T, один раз в PBS). Сеточку с нанесенным образцом инкубировали на капле вторичных антител, конъюгированных с золотом (10 нм) (goat anti-mouse gold, Sigma), в PBS с 0.1% BSA в течение 15 мин и промывали водой. Образцы контрастировали 1% уранилацетатом и анализировали на электронном микроскопе Jeol 100 CXII (Япония).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-01260 (Курочкина Л.П.), 07-04-12224-офи и 09-04-00335-а (Мирошников К.А.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lyczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B. // *Microbes Infect.* 2000. V. 2. P. 1051–1060.
- Hertveldt K., Lavigne R. // *Pseudomonas, Model Organism, Pathogen, Cell Factory*/Ed. Rehm B.A. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2008. P. 255–292.
- Ackermann H.-W., Cartier C., Slopek S., Vieu J.-F. // *Ann. Inst. Pasteur Virol.* 1988. V. 139. P. 389–404.
- Ackermann H.-W., Dubow M.S. // *Viruses of Prokaryotes: Natural groups of Bacteriophages.* Florida: CRC Press, 1987. P. 116–121.
- Krylov V.N., Tolmachova T.O., Akhverdian V.Z. // *Arch. Virol.* 1993. V. 131. P. 141–151.
- Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Сыкилинда Н.Н., Мирошников К.А., Кадыков В.Н., Крылов С.В., Месянжинов В.В., Крылов В.Н. // *Генетика.* 2008. Т. 44. С. 185–194.
- Ceysens P.-J., Miroshnikov K., Mattheus W., Sykilinda N., Krylov V., Robben J., Noben J.-P., Kropinski A., Volckaert G., Mesyanzhinov V., Lavigne R. // *Env. Microbiol.* 2009. in press.
- Hendrix R.W. // *Theor. Popul. Biol.* 2002. V. 61. P. 471–480.
- Ackermann H.-W. // *Res. Microbiol.* 2003. V. 154. P. 245–251.
- Месянжинов В.В., Лейман П.Г., Костюченко В.А., Курочкина Л.П., Мирошников К.А., Сыкилинда Н.Н., Шнейдер М.М. // *Биохимия.* 2004. Т. 69. С. 1463–1476.
- Rossmann M.G., Arisaka F., Battisti A.J., Bowman V.D., Chipman P.R., Fokine A., Hafenstein S., Kanamaru S., Kostyuchenko V.A., Mesyanzhinov V.V., Shneider M.M., Morais M.C., Leiman P.G., Palermo L.M., Parrish C.R., Xiao C. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2007. V. 63. P. 9–16.
- Thuman-Commike P.A., Chiu W. // *Micron.* 2000. V. 31. P. 687–711.
- Ludtke S.J., Chen D.H., Song J.L., Chuang D.T., Chiu W. // *Structure.* 2004. V. 12. P. 1129–1136.
- Unwin N. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 346. P. 967–989.
- Choi K.H., McPartland J., Kaganman I., Bowman V.D., Rothman-Denes L.B., Rossmann M.G. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 378. P. 726–736.
- Fokine A., Chipman P.R., Leiman P.G., Mesyanzhinov V.V., Rao V.B., Rossmann M.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 6003–6008.
- Kostyuchenko V.A., Chipman P.R., Leiman P.G., Arisaka F., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. V. 12. P. 810–813.
- Lander G.C., Evilevitch A., Jeembaeva M., Potter C.S., Carragher B., Johnson J.E. // *Structure.* 2008. V. 16. P. 1399–1406.
- Fokine A., Kostyuchenko V.A., Efimov A.V., Kurochkina L.P., Sykilinda N.N., Robben J., Volckaert G., Hoenger A., Chipman P.R., Battisti A.J., Rossmann M.G., Mesyanzhinov V.V. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 352. P. 117–124.
- Fokine A., Battisti A.J., Bowman V.D., Efimov A.V., Kurochkina L.P., Chipman P.R., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. // *Structure.* 2007. V. 15. P. 1099–1104.
- Summer E.J., Gonzalez C.F., Bomer M., Carlile T., Embry A., Kucherka A.M., Lee J., Mebane L., Morrison W.C., Mark L., King M.D., LiPuma J.J., Vidaver A.K., Young R. // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. P. 255–268.
- Poglavov B.F., Efimov A.V., Marco S., Carrascosa J., Kuznetsova T.A., Aijrich L.G., Kurochkina L.P., Mesyanzhinov V.V. // *J. Struct. Biol.* 1999. V. 127. P. 224–230.
- Conway J.F., Wikoff W.R., Cheng N., Duda R.L., Hendrix R.W., Johnson J.E., Steven A.C. // *Science.* 2001. V. 292. P. 744–748.
- Spohn G., Guler R., Johansen P., Keller I., Jacobs M., Beck M., Rohner F., Bauer M., Dietmeier K., Kundig T.M., Jennings G.T., Brombacher F., Bachmann M.F. // *J. Immunol.* 2007. V. 178. P. 7450–7457.
- Wei Y., Yang C., Wei B., Huang J., Wang L., Meng S., Zhang R., Li J. // *J. Clin. Microbiol.* 2008. V. 46. P. 1734–1740.
- Newton J., Deutscher S.L. // *Molecular Imaging. Handbook of Experimental Pharmacology*/Eds Semmlerand W., Schwaiger M. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. P. 145–163.
- Alvarez L.J., Thomen P., Makushok T., Chatenay D. // *Biotechnol. Bioeng.* 2007. V. 96. P. 615–621.
- Ren Z., Black L.W. // *Gene.* 1998. V. 215. P. 439–444.
- Aksyuk A.A., Leiman P.G., Kurochkina L.P., Shneider M.M., Kostyuchenko V.A., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. // *EMBO J.* 2009. V. 28. P. 821–829.
- Sambrook J., Fritsch D.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor; New York; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
- Dickson R.C. // *Virology.* 1974. V. 59. P. 123–138.
- Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
- Towbin J., Staehelen T., Gordon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. P. 4350–4354.
- Mindell J.A., Grigorieff N. // *Struct. Biol.* 2003. V. 142. P. 334–347.
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25. P. 1605–1612.

## ***Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage SN: 3D-Reconstruction of the Capsid and Identification of Surface Proteins by Electron Microscopy**

**M. V. Filchikov<sup>a</sup>, D. I. Osmakov<sup>a</sup>, L. V. Logovskaya<sup>a</sup>, N. N. Sykilinda<sup>a</sup>, V. A. Kadykov<sup>a</sup>,  
L. P. Kurochkina<sup>a</sup>, V. V. Mesyanzhinov<sup>a</sup>, R. A. Bernal<sup>b</sup>, K. A. Miroshnikov<sup>a,#</sup>**

<sup>#</sup>Phone/fax: +7(495) 335-60-22; e-mail: kmi@ibch.ru

<sup>a</sup>Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia

<sup>b</sup> Department of Chemistry, The University of Texas at El Paso, El Paso, TX, 79968 USA

The virulent *P. aeruginosa* bacteriophage SN belongs to the PB1-like species of the Myoviridae family. The comparatively small (66391 bp) DNA genome of this phage encodes 89 predicted open reading frames and the proteome involves more than 20 structural proteins. A 3D model of the phage capsid to approximately 18 Å resolution reveals certain peculiarities of capsomer structure typical of only this bacteriophage species. In the present work recombinant structural proteins SN gp22 and gp29 were expressed and purified; and specific polyclonal antibodies were obtained. Immuno-electron microscopy of purified phage SN using secondary gold-conjugated antibodies has revealed that gp29 forms a phage sheath, and gp22 decorates the capsid. Precise identification of multicopy major capsid proteins is essential for subsequent construction of gene-engineered phages bearing non-native peptides on their surfaces (phage display).

*Key words:* *Pseudomonas aeruginosa*, bacteriophage SN, proteomics, structural proteins, cryo-electron microscopy, 3D-reconstruction, immuno-electron microscopy