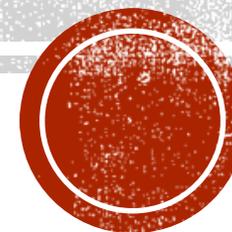
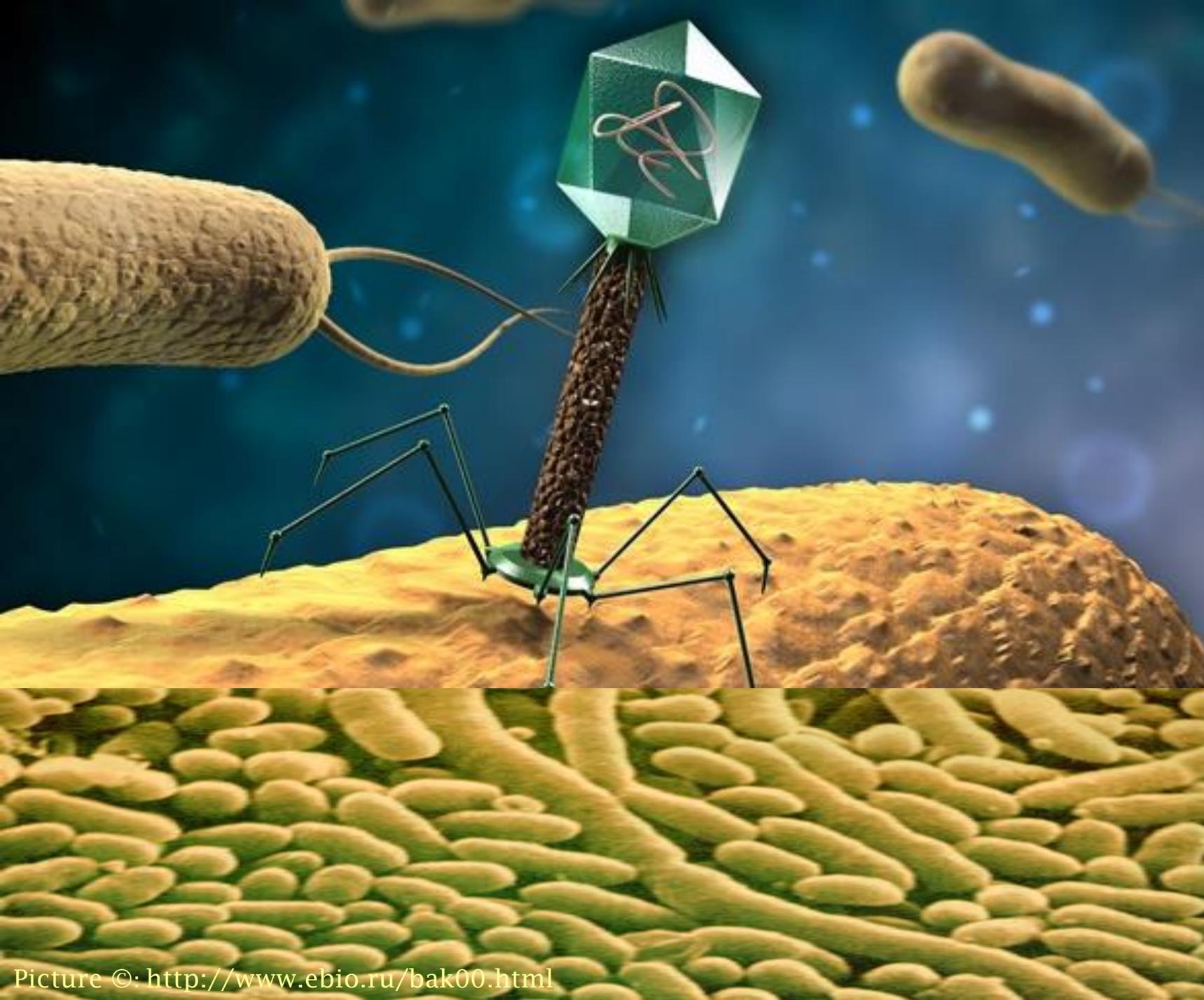


БАКТЕРИИ И БАКТЕРИОФАГИ: СВОДКИ С ФРОНТА И ТЫЛА



**Александра Клименко,
аспирантка ИЦиГ СО РАН**



БАКТЕРИИ И БАКТЕРИОФАГИ

Бактериофаги (или просто – фаги) – вирусы, являющиеся облигатными внутриклеточными паразитами бактерий.

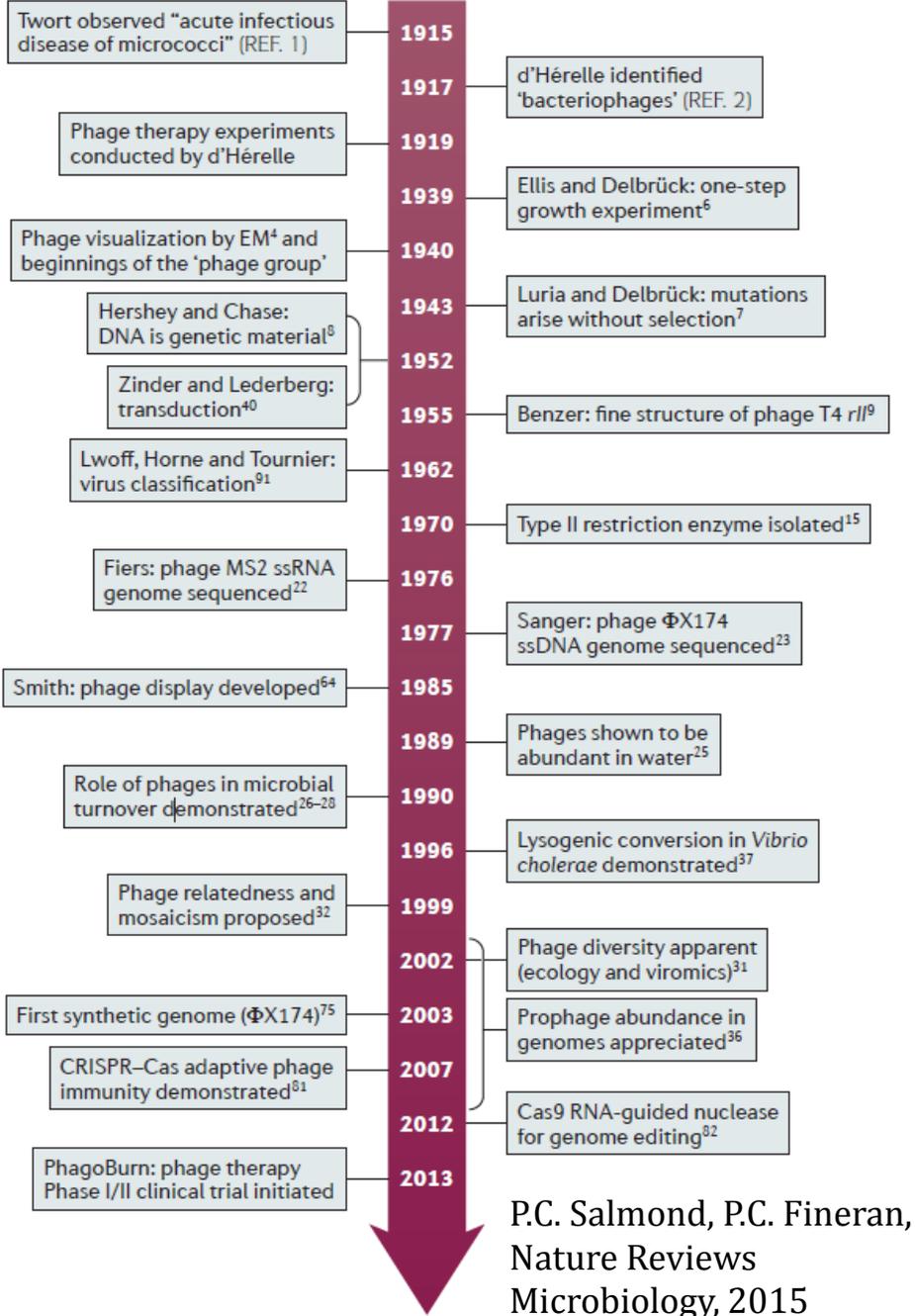
Бактерии – домен безъядерных одноклеточных организмов



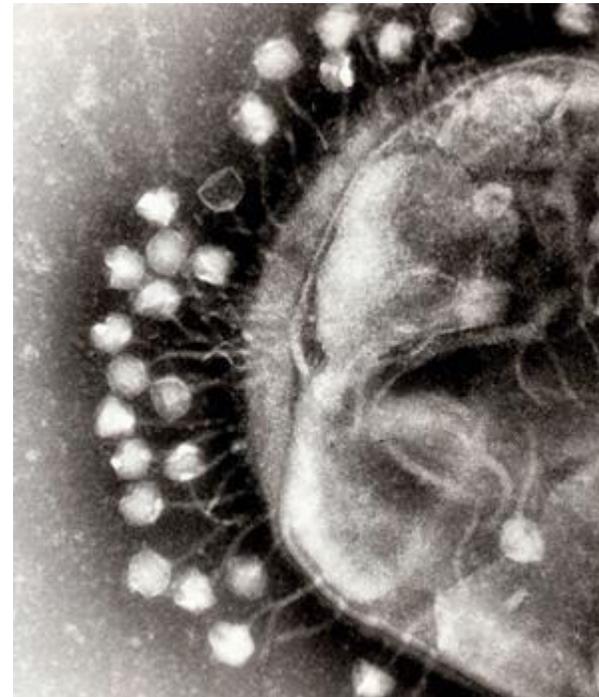
БАКТЕРИИ И БАКТЕРИОФАГИ: ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ДРЕВНЕЙШЕГО ПРОТИВОСТОЯНИЯ

1. Краткая история вопроса
2. Специфика фаговой инфекции
3. Защитные стратегии и механизмы бактерий
4. Круг вопросов, которые заботят исследователей в данной теме
5. Фронт: коэволюция бактерий и фагов в контексте вирулентности и резистентности
6. Тыл: какова цена непрерывной гонки вооружений?
7. Не только война: светлая сторона взаимодействия бактерий и фагов.





КРАТКАЯ ИСТОРИЯ ВОПРОСА



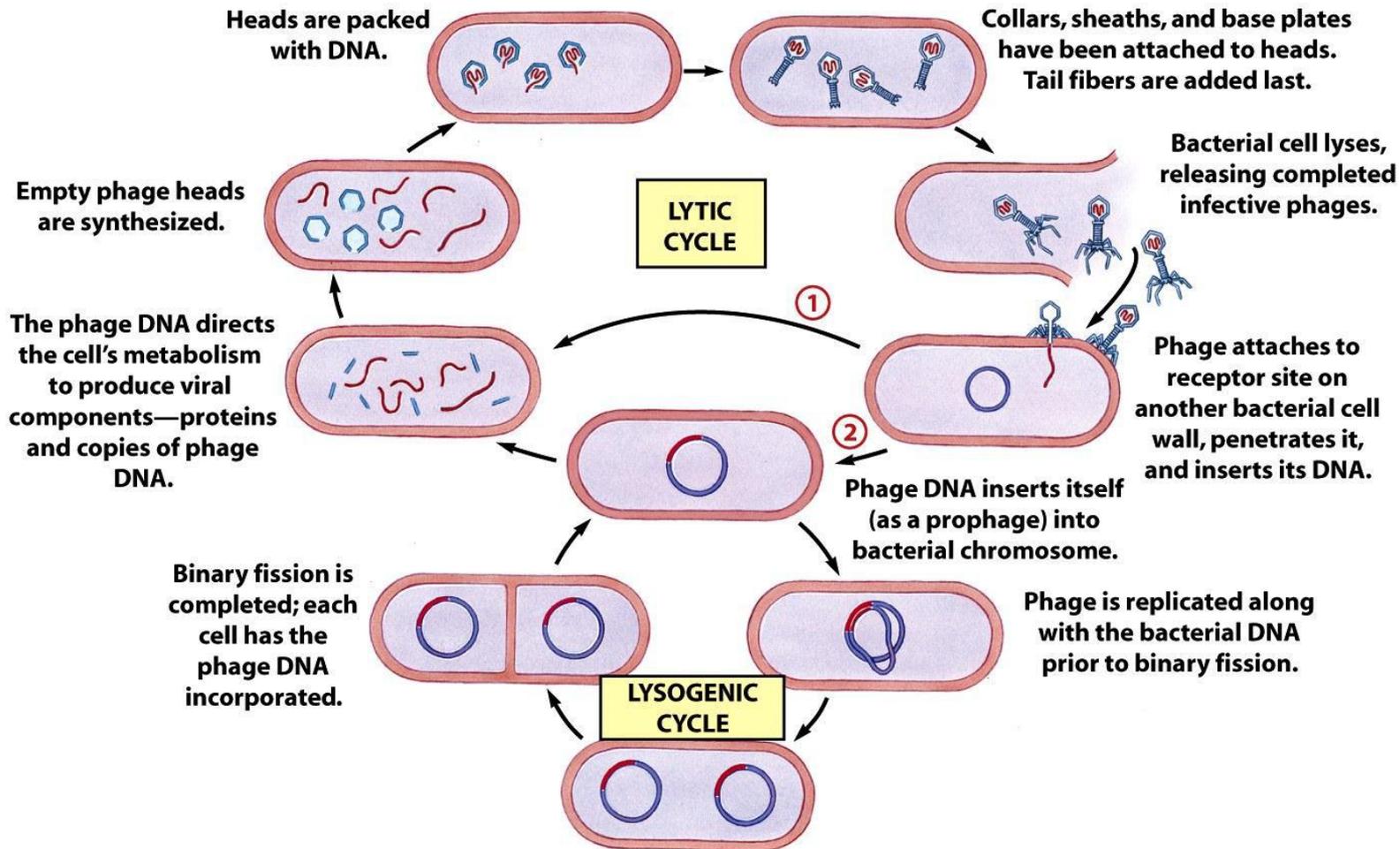
- Фотография, сделанная с помощью электронного микроскопа, показывает процесс закрепления бактериофагов (колифагов T₁) на поверхности бактерии *E. coli*

Вехи

- Открыты независимо английским вирусологом Ф. Туортом (1915) и канадским бактериологом Ф. Д'Эррелем (1917)
- 1920ые – 1930ые – первые попытки фаготерапии.
- 1940 – получение визуализации фага с помощью электронной микроскопии
- 1940ые – 1980ые – развитие молекулярной генетики
- 1989 г. – O. Bergh et al., Nature, "High abundance of viruses found in aquatic environments"
- 1996 г. – открытие роли фагов в бактериальной патогенности
- 2004 г. – К. Венгер. Заря метагеномики
- 2007 г. – открытие CRISPR-Cas системы

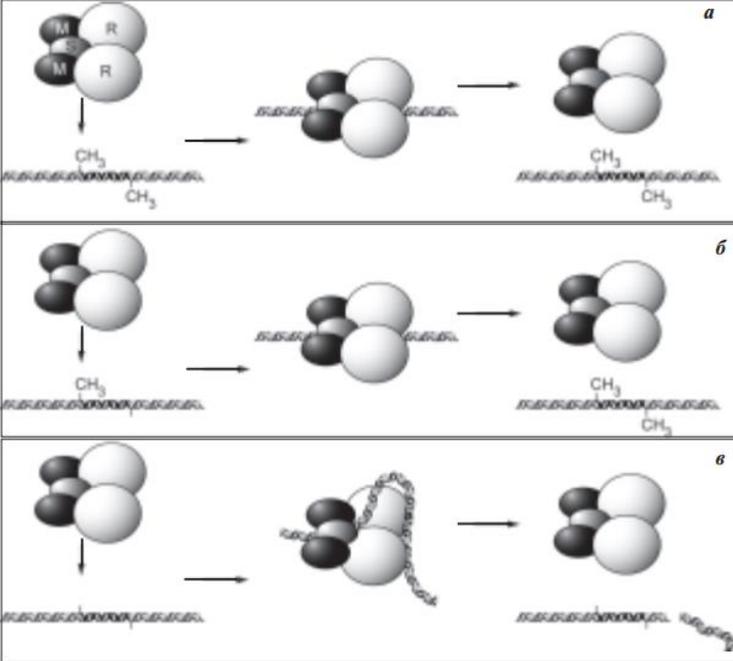


ФАГОВАЯ ИНФЕКЦИЯ. ЛИЗОГЕННЫЙ И ЛИТИЧЕСКИЙ ЦИКЛЫ.



- Литические инфекции более распространены в условиях высокой доступности питательных веществ, в то время как лизогения чаще встречается в олиготрофных условиях [Paul, 2008]
- Однако, недавно было показано, что лизогения также может оказаться успешной стратегией и в том случае, если бактерии растут быстро и плотность их популяции высока [Knowles et al., 2016].

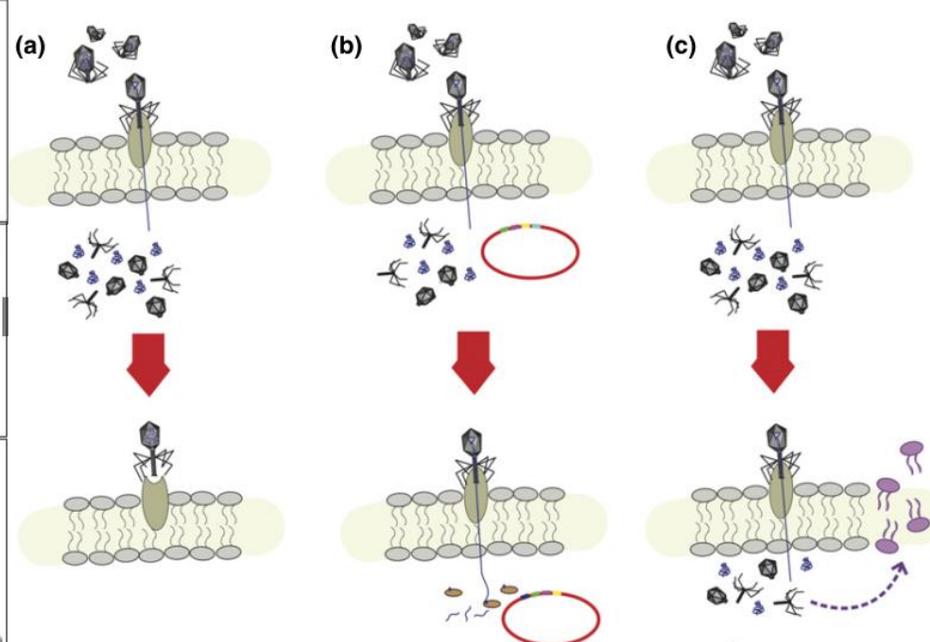




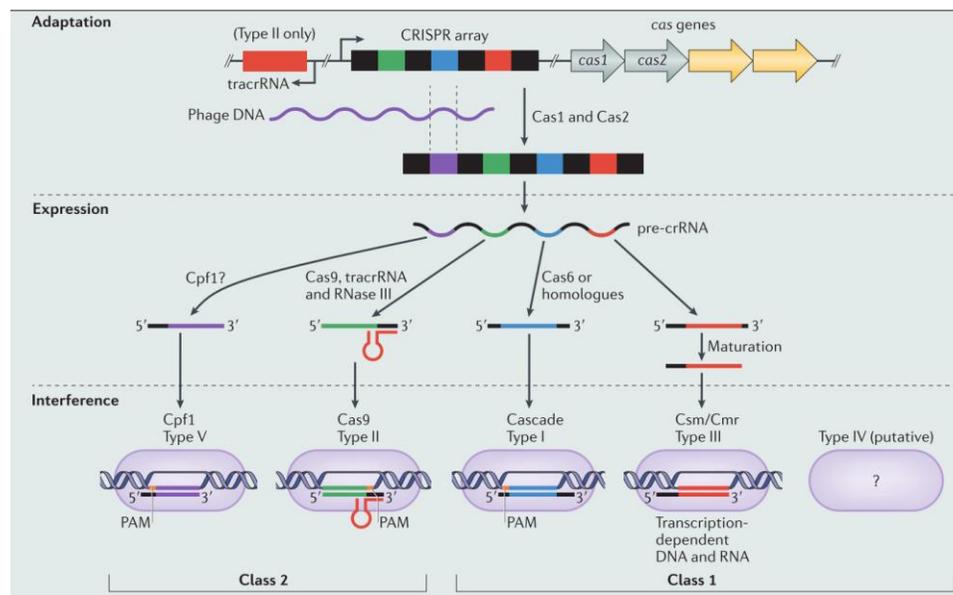
Завильгельский Г.Б., Расторгуев С.М. Химия и жизнь. 2006

Схема работы системы Рестрикции-Модификации:

- а – обе нити ДНК в сайте SK метилированы; комплекс распадается;
- б – одна из нитей ДНК в сайте SK метилирована; метилаза (M) присоединяет CH₃ к адениловому остатку во второй нити;
- в – обе нити в сайте SK не метилированы, значит ДНК чужая; фермент протаскивает её через R-субъединицы и затем разрывает



V. Koskella & M.A. Brockhurst, 2014



P.C. Salmond, P.C. Fineran,, 2015

ЗАЩИТНЫЕ СТРАТЕГИИ И МЕХАНИЗМЫ БАКТЕРИЙ

а – предотвращение адсорбции фага

б – деградация фаговой ДНК внутри клетки и/или блокирование процесса репликации (R-M systems, CRISPR-Cas)

в – лизис заражённой клетки («альтруистический суицид»)

Коэволюция – это процесс взаимной адаптации и контрадаптации между экологически взаимодействующими видами (Janzen, 1980)



PERSPECTIVES

TIMELINE

A century of the phage: past, present and future

George P. C. Salmond and Peter C. Fineran

Abstract | Viruses that infect bacteria (bacteriophages; also known as phages) were discovered 100 years ago. Since then, phage research has transformed fundamental and translational biosciences. For example, phages were crucial in establishing the central dogma of molecular biology — information is sequentially passed from DNA to RNA to proteins — and they have been shown to have major roles in ecosystems, and help drive bacterial evolution and virulence. Furthermore, phage research has provided many techniques and reagents that underpin modern biology — from sequencing and genome engineering to the recent discovery and exploitation of CRISPR–Cas phage resistance systems. In this Timeline, we discuss a century of phage research and its impact on basic and applied biology.

Bacteriophages were discovered independently in 1915 by Frederick Twort, a British pathologist¹, and in 1917 by Félix d'Hérelle, a French–Canadian microbiologist² (FIG. 1). Twort described the “glassy transformation” of micrococci colonies, whereas d'Hérelle isolated an “anti-microbe” of *Shigella* and devised the term ‘bacteriophage’ — literally meaning bacteria-eater.

Phages are obligate intracellular parasites of bacteria and have diverse life cycles (BOX 1). The ability of phages to infect bacteria led d'Hérelle to examine their therapeutic potential against bacterial infection. Even in his first paper, he noted that the presence of phages correlated with disease clearance in patients with dysentery, and he carried out a rabbit study, in which phages provided protection from infection with *Shigella*. Most early phage research conducted in the 1920s and 1930s focused on the development of phage therapy for the treatment of bacterial infections, and companies began to market phage preparations³. However, in the late 1930s, the Council on Pharmacy and Chemistry of the American Medical Association concluded that the efficacy of phage therapy was ambiguous and that further research was required⁴. These concerns, and the success of emerging antibacterials,

led to a decline in interest in phage therapy, although research continued in the former Soviet Union and other Eastern European countries. During this period, insights into fundamental phage biology were limited, and up until the 1940s the viral nature of phages was still disputed. Visualization of phages by electron microscopy in the early 1940s proved their particulate nature⁵.

Since their discovery, phages have had an immense and unforeseen impact on our understanding of the wider biological world. Their ‘simplicity’ enabled our understanding of core biological processes that are relevant to all biology. Phages provided tractable model systems that gave rise to molecular biology and provided many biotechnologically useful reagents, including restriction enzymes, *en route*. In addition, their influence on nutrient cycles, pathogenicity and bacterial evolution further underlines their central role in global ecology and evolution. Furthermore, the inexorable rise of antibiotic resistance has provided added impetus for ‘back to the future’ phage-based solutions to bacterial infection. We are also currently witnessing incredible advances in the biotechnological exploitation of CRISPR–Cas phage defence systems, which are revolutionizing both prokaryotic and eukaryotic

molecular biology research. In this Timeline, we highlight the impact of phages in the first 100 years since their discovery in terms of the origins of molecular biology, our knowledge of ecology and evolution, and their biotechnological exploitation. We encourage readers to try to imagine what the modern world would look like if phages did not exist; we are clearly indebted to the most abundant biological entities on Earth.

The origins of molecular biology

Key questions in biology addressed. In the early twentieth century, the nature of the gene was a central biological question. Physicists, including Leo Szilard, Salvador Luria and Max Delbrück as well as other researchers (the ‘phage group’), began tackling this and other fundamental biological questions by working with phages as biological models⁶. Delbrück urged researchers to use select ‘authorized phages’, the T-phages, in their studies to facilitate comparability of results between laboratories. The T-phages were able to infect *Escherichia coli*, which was rapidly becoming the model Gram-negative bacterium. In 1939, Emory Ellis and Delbrück characterized phage growth in the ‘one-step growth experiment’, which revealed key phage-related concepts, such as adsorption, the latent period and viral burst⁴. A few years later, Luria and Delbrück demonstrated that mutations pre-existed in the absence of selection — a prediction of Darwinian theory⁷. This ‘fluctuation test’ involved growing independent *E. coli* cultures without selection and then plating the bacteria to determine both the total and phage T1-resistant cell numbers. Consistent with a model of pre-existing mutations, the number of mutants varied markedly — a factor influenced by when the mutant arose in each culture. Retrospectively, we now interpret these experiments in terms of mutations in DNA, but the nature of the gene was not known at that time.

By using phages, evidence that genes were composed of DNA was provided by Alfred Hershey and Martha Chase in their ‘Waring blender experiment’ (REF. 8). Phages provided an ideal model system, as they are composed of a protein coat and internal DNA — the two leading genetic contenders at that

КРУГ ВОПРОСОВ, КОТОРЫЕ ЗАБОТЯТ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ В ОБЛАСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ

- Какие режимы коэволюции встречаются в системах фаг-бактерия?
- Как различные экологические факторы влияют на переключение между коэволюционными режимами?
- Как коэволюция бактерий и фагов в заданных условиях могут влиять на:
 - сеть взаимодействий между видами в сообществе
 - генетическое и фенотипическое разнообразие
- Каковы пространственные и временные масштабы наблюдаемой коэволюции?
- Что стоит для микроорганизмов участие в этой эволюционной гонке?
- Насколько результаты, полученные *in vitro* переносимы на живую природу?



FRONT: INFECTIVITY VS. RESISTANCE COEVOLUTION

- Коэволюция бактерий и литических фагов [Gomez et al., 2014], [B.Koskella & M.A. Brockhurst, 2014]:
 - Гонка вооружений (Arms race dynamics, ARD) [Hall et al., 2011]
 - Флюктуирующий отбор (Fluctuating selection dynamics, FSD):
 - По специфичности [Gandon et al., 2008]
 - По диапазону [Ashby et al., 2014]
- ARD:** движение к генерализму
FSD: специализм



МУЛЬТИЛОКУСНАЯ “GENE-FOR-GENE”(GFG) МОДЕЛЬ

$$Q_{ij} = \sigma^{d_{ij}},$$

$$d_{ij} = \sum_{k=1}^n h_k^i (1 - p_k^j)$$

Хозяин

h = 00011000100110111101

p = 11000100111001001100

Паразит

▪ [Sasaki, 2000]

$$fitness_cost_factor_i = \exp(-\eta \sum_{k=1}^n h_k^i)$$

- Клеточно-автоматная модель коэволюции в ходе фаговой инфекции с учётом генетического полиморфизма и цены за резистентность/генерализм
- Заражение происходит с определённой вероятностью
- Заражённые клетки не размножаются и гибнут через фиксированный период времени, выпуская в месте своей гибели новые фаговые частицы в среду, которые, возможно, мутируют
- Коинфекция не учитывается. Заданы показатели вероятности смерти паразита без хозяина. Паразиты диффундируют

[ASHBY ET AL., 2014]

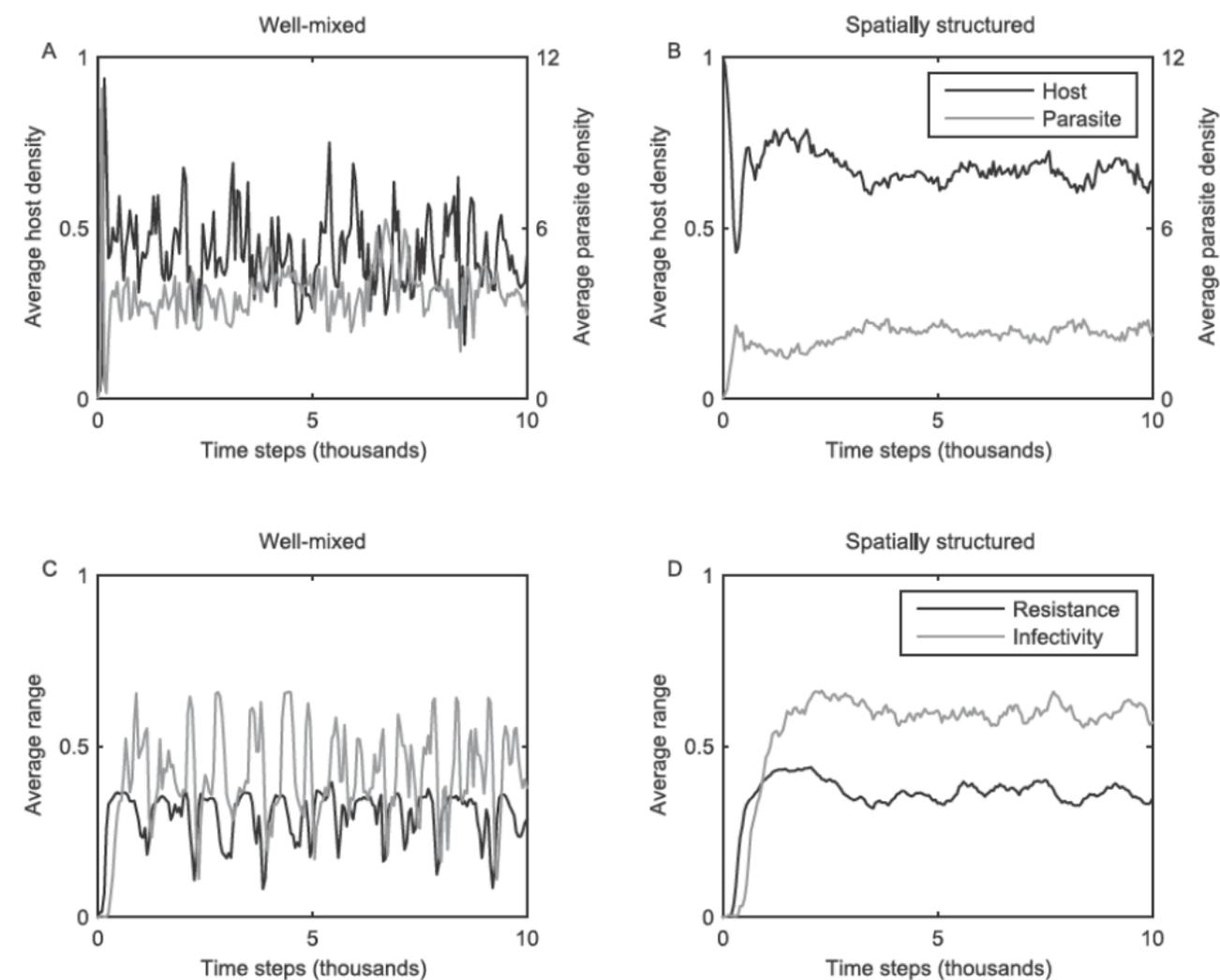
Применили GFG подход к описанию генетической специфичности к взаимодействию бактерий и фагов.

Исследовали влияние степени перемешивания на интенсивность гонки вооружений



ВЛИЯНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СРЕДЫ НА ЭВОЛЮЦИОННУЮ ДИНАМИКУ

Пространственно-структурированные среды способствуют более стабильной эволюционной динамике, чем равномерно перемешанные среды.



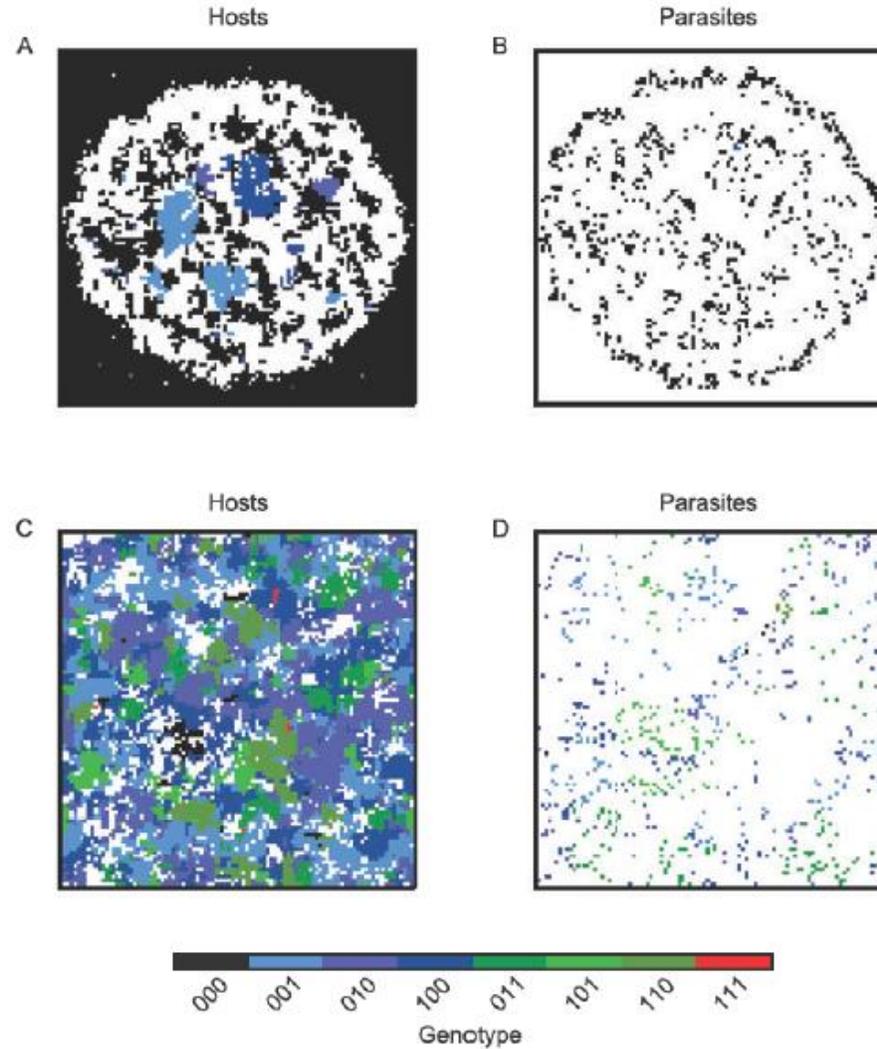
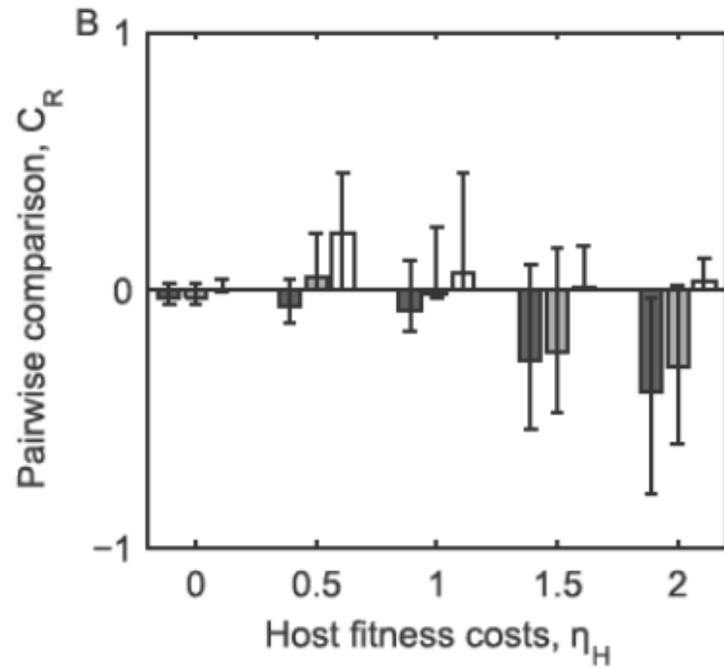
$$R = \sum_{i=1}^n ix(i)/n$$

▪ $x(i)$ – доля бактерий, имеющих i аллелей резистентности

$$I = \sum_{i=1}^n iy(i)/n$$

▪ $y(i)$ – доля фагов, имеющих i аллелей вирулентности





$$C_R = \frac{R_{mixed} - R_{spatial}}{R_{mixed} + R_{spatial}}$$

ВЛИЯНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СРЕДЫ НА ДИАПАЗОНЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Пространственно-структурированные среды могут смягчать ограничения, накладываемые высокой ценой за резистентность, на эволюцию в сторону генерализма



СИММЕТРИЧНАЯ “GENE-FOR-GENE”(SGFG) МОДЕЛЬ + АЛЛЕЛЬНОЕ СООТВЕТСТВИЕ (МА)

Infectivity, Q		Parasite genotype							
		00/A	00/B	01/A	01/B	10/A	10/B	11/A	11/B
Host genotype	00/A	σ^2	$\sigma^2\rho$	σ	$\sigma\rho$	σ	$\sigma\rho$	1	ρ
	00/B	$\sigma^2\rho$	σ^2	$\sigma\rho$	σ	$\sigma\rho$	σ	ρ	1
	01/A	σ^3	$\sigma^3\rho$	σ^2	$\sigma^2\rho$	σ^2	$\sigma^2\rho$	σ	$\sigma\rho$
	01/B	$\sigma^3\rho$	σ^3	$\sigma^2\rho$	σ^2	$\sigma^2\rho$	σ^2	$\sigma\rho$	σ
	10/A	σ^3	$\sigma^3\rho$	σ^2	$\sigma^2\rho$	σ^2	$\sigma^2\rho$	σ	$\sigma\rho$
	10/B	$\sigma^3\rho$	σ^3	$\sigma^2\rho$	σ^2	$\sigma^2\rho$	σ^2	$\sigma\rho$	σ
	11/A	σ^4	$\sigma^4\rho$	σ^3	$\sigma^3\rho$	σ^3	$\sigma^3\rho$	σ^2	$\sigma^2\rho$
	11/B	$\sigma^4\rho$	σ^4	$\sigma^3\rho$	σ^3	$\sigma^3\rho$	σ^3	$\sigma^2\rho$	σ^2

- SGFG и МА (matching-alleles) локусы позволяют описывать не только ARD, но и FSD

РАСШИРЕНИЕ МОДЕЛИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА [GOMEZ ET AL., 2014]

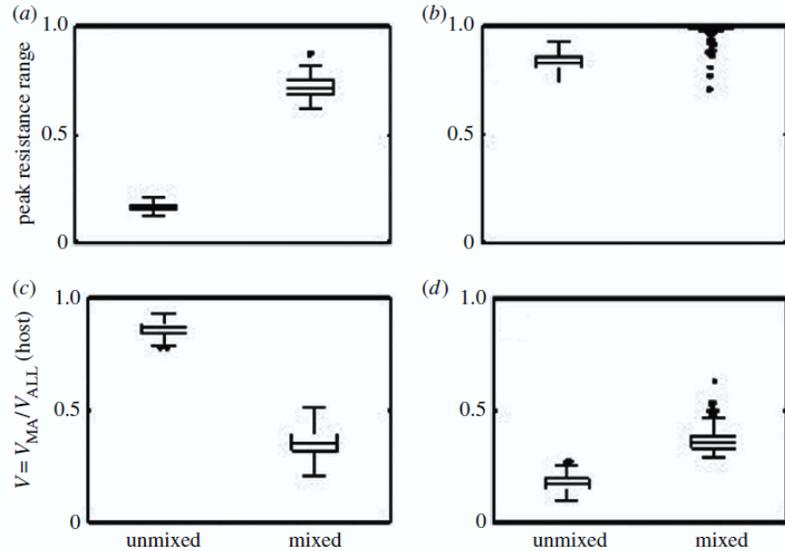
Исследовали влияние степени перемешивания на переключения между ARM и FSD режимами коэволюции: в модели и в компосте

$$\frac{V_{MA}}{V_{ALL}} > 0.5 \Rightarrow FSD \text{ преобладает над } ARD$$



■ $\alpha = 0.05$

■ $\alpha = 0.1$



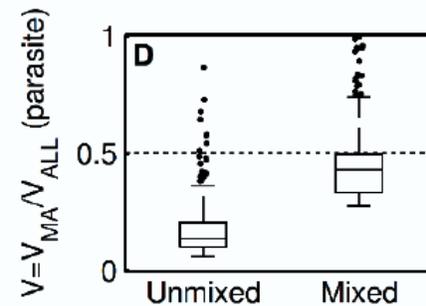
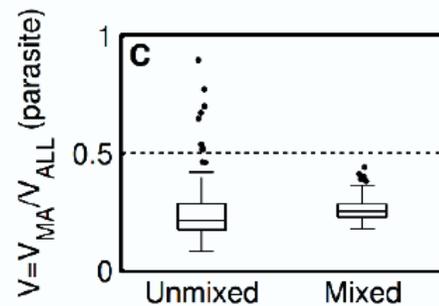
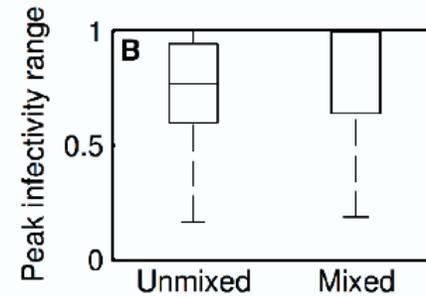
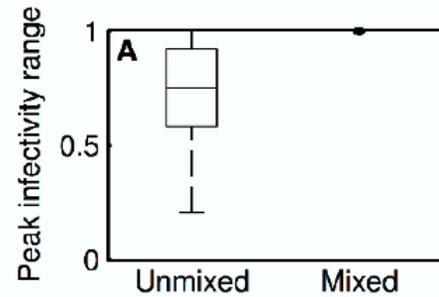
Хозяин

МОДЕЛЬ ПЕРЕКЛЮЧЕНИЙ МЕЖДУ FSD И ARD [GOMEZ ET AL., 2014]

Паразит

■ $\alpha = 0.05$

■ $\alpha = 0.1$



У бактерий: FSD
меняется на ARD с
перемешиванием
среды

У фагов: тенденция к
ARD наблюдается
вне зависимости от
степени
перемешивания



Без перемешивания

Перемешано
раз в день

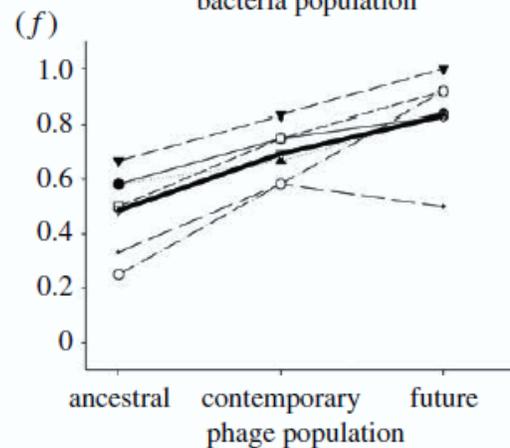
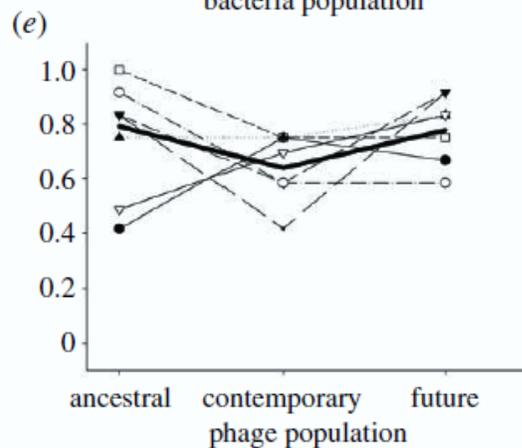
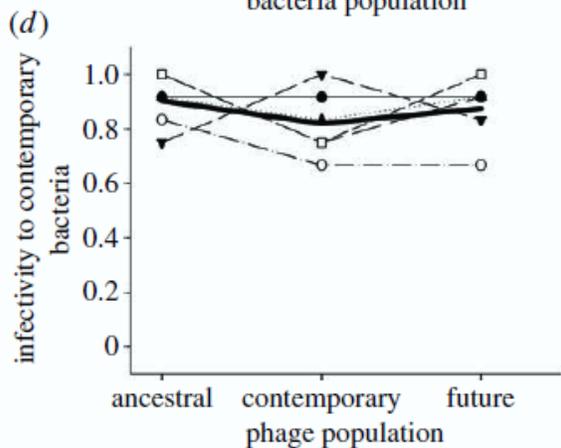
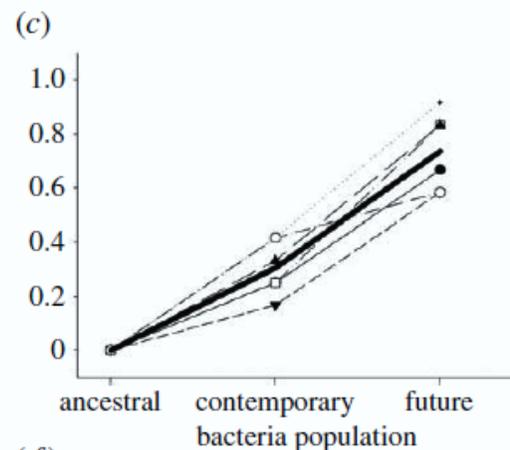
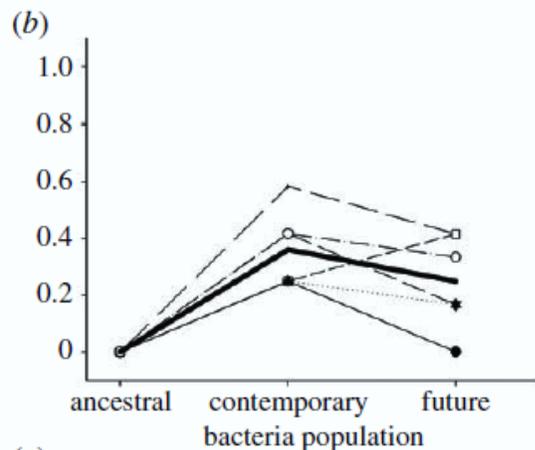
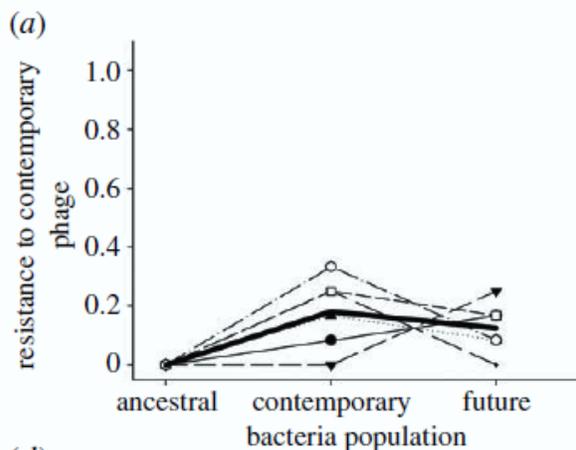
Постоянное
перемешивание

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА [GOMEZ ET AL., 2014]

P. fluorescens vs. Ф2 в почвенном микрокосме

Постоянное перемешивание приводит к переходу от флуктуирующего отбора к гонке вооружений

Также в этой работе было показано, что степень перемешивания играет большую роль, чем доступность питательных веществ. Последнее не приводило к сдвигу от FSD к ARD вопреки ранее полученным результатам (Lopez, 2014).



- Хорошее перемешивание ведёт к ARD
- Пространственная неоднородность способствует FSD





«— У нас, — сказала Алиса, с трудом переводя дух, — когда долго бежишь со всех ног, непременно попадёшь в другое место.
— Какая медлительная страна! — вскричала Королева.
— Ну а здесь, знаешь ли, приходится бежать со всех ног, чтобы только остаться на том же месте.»

Льюис Кэрролл «Алиса в Зазеркалье»

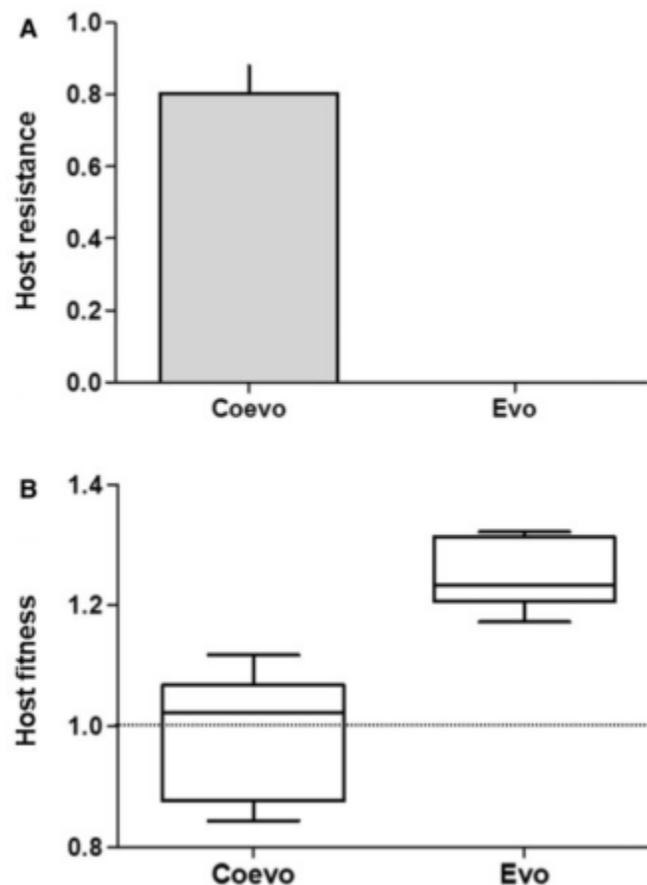
ПРИНЦИП КРАСНОЙ КОРОЛЕВЫ

“For an evolutionary continuing development is needed just in order to maintain its relative to the systems it is co-evolving with.” – L. van Valen (1973)

ТЫЛ: КАКОВА ЦЕНА БЕСПРЕРЫВНОЙ ГОНКИ ВООРУЖЕНИЙ?

- Цена приспособленности на резистентность [Bohannan and Lenski, 2000]. В почвенных системах снижение приспособленности до 36% [Gomez & Buckling, 2011]
- Козволюция бактерий и литических фагов ограничивает приобретение мутаций, благоприятных для роста в абиотической среде [Scanlan et al., 2015]

[Scanlan et al., 2015]

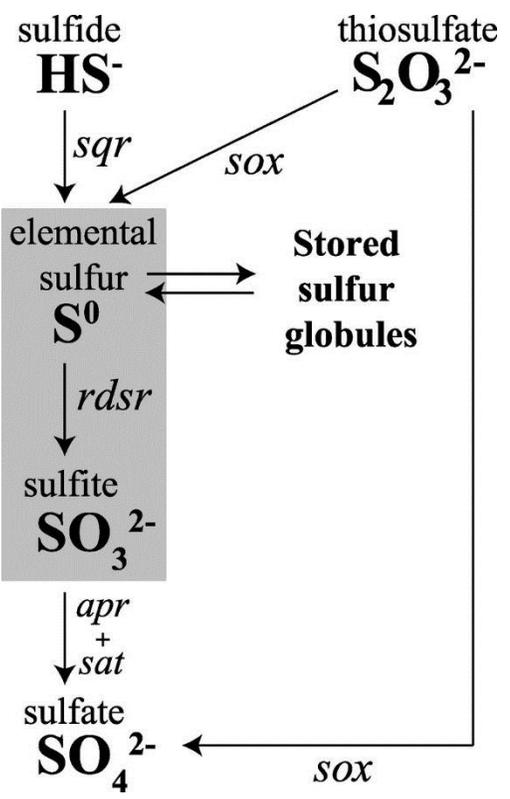


ARD => FSD (s)

[Hall et al., 2011, *Host-parasite coevolutionary arms races give way to fluctuating selection*, *Ecol Lett*]

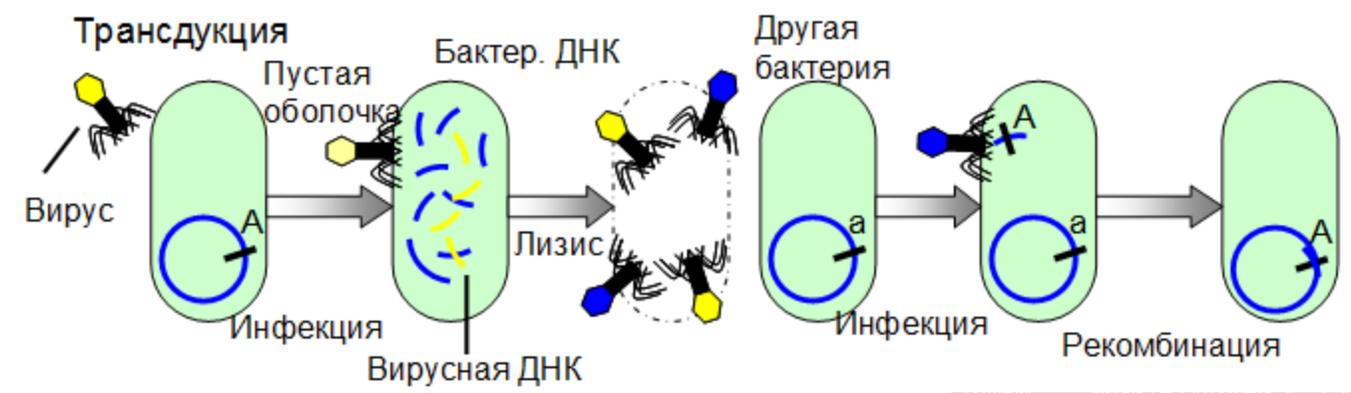


Karthik Anantharaman et al.
Science 2014;344:757-760



- Лизогенная конверсия: патогенность
- Лизогенная конверсия: фотосинтез
- Трансдукция полезных генов, PICIs

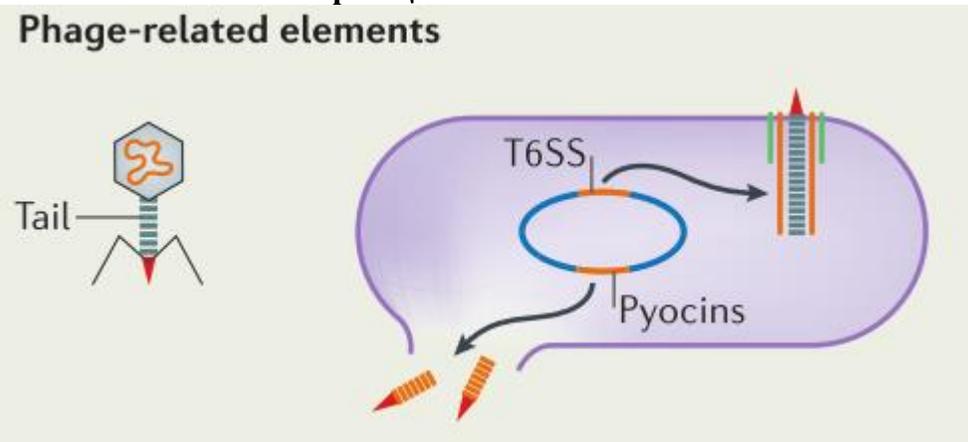
НЕ ТОЛЬКО ВОЙНА ДРУГ С ДРУГОМ: СВЕТЛАЯ СТОРОНА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИЙ И ФАГОВ



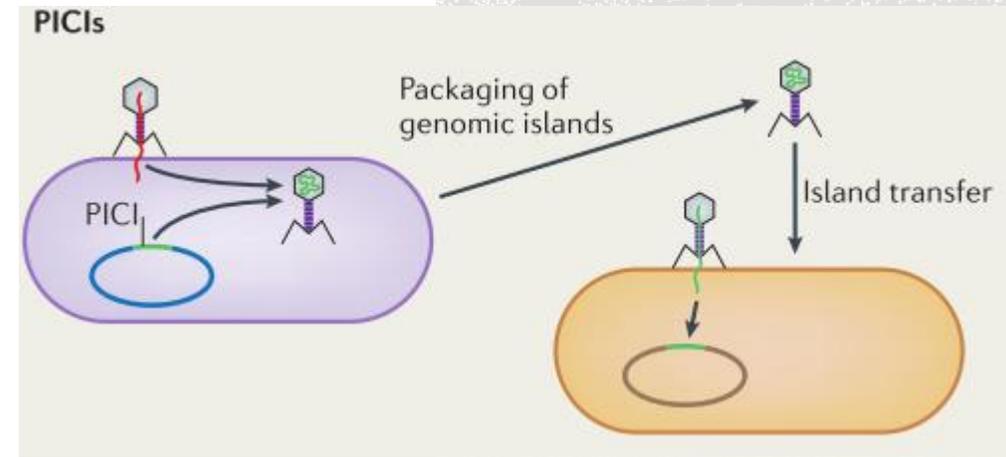
Лизогенная конверсия и патогенность бактерий

Роль в фагов в горизонтальном переносе генов (ГПГ), в т.ч. кодирующих признаки, дающие метаболические преимущества.

- Фагоподобные структуры в бактериях: пиоцины R- и F- типов и система секреции VI типа



P.C. Salmond, P.C. Fineran, 2015





Антагонизм

Мутуализм

Симбиоз

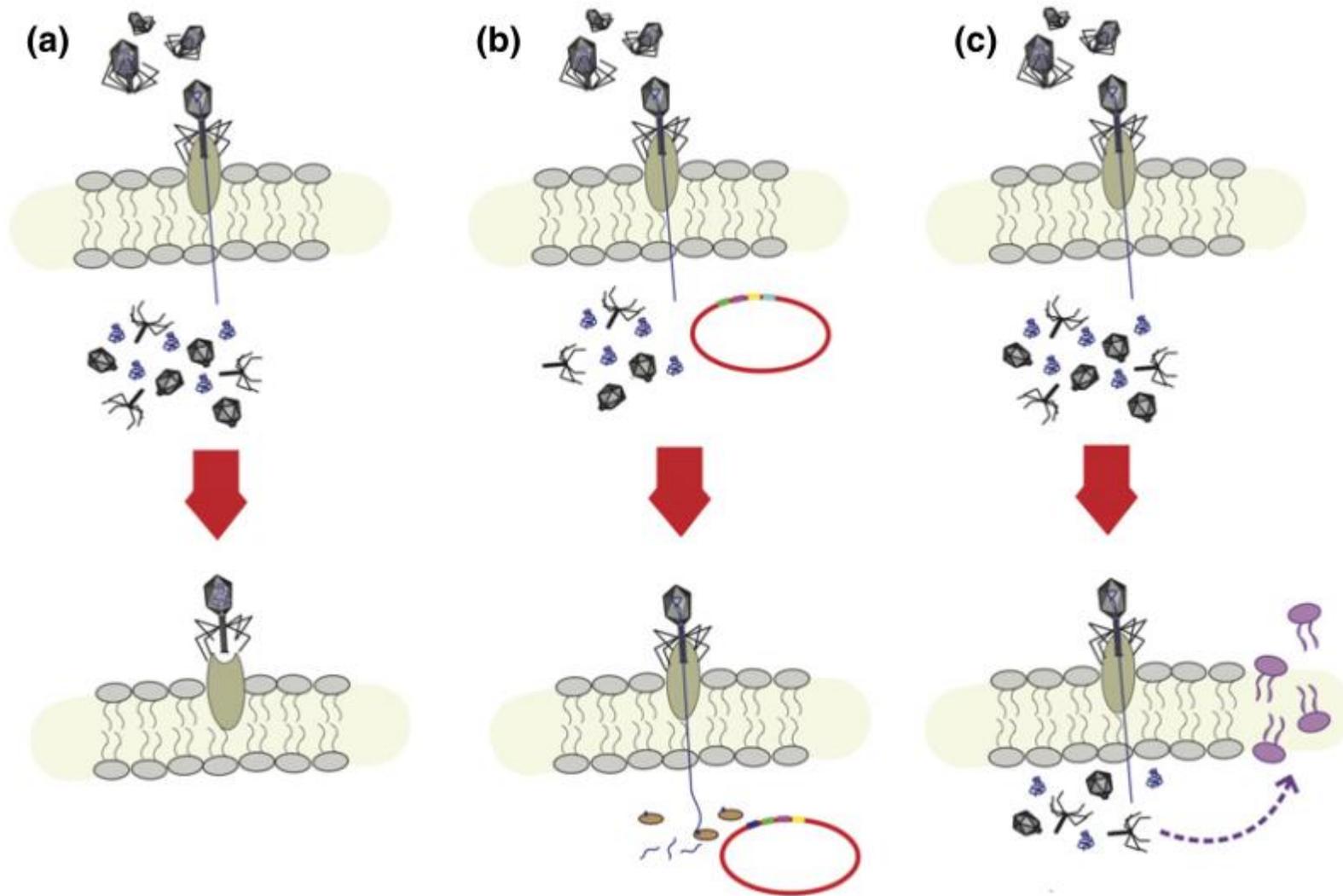
РАВНОВЕСИЕ?

Антагонизм лежит на поверхности, но кто знает какие ещё тайны природного равновесия остаются сокрыты в сосуществовании бактерий и их вирусов?



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!





▪ B. Koskella & M.A. Brockhurst, 2014

ЗАЩИТНЫЕ СТРАТЕГИИ И МЕХАНИЗМЫ БАКТЕРИЙ

а - предотвращение адсорбции фага

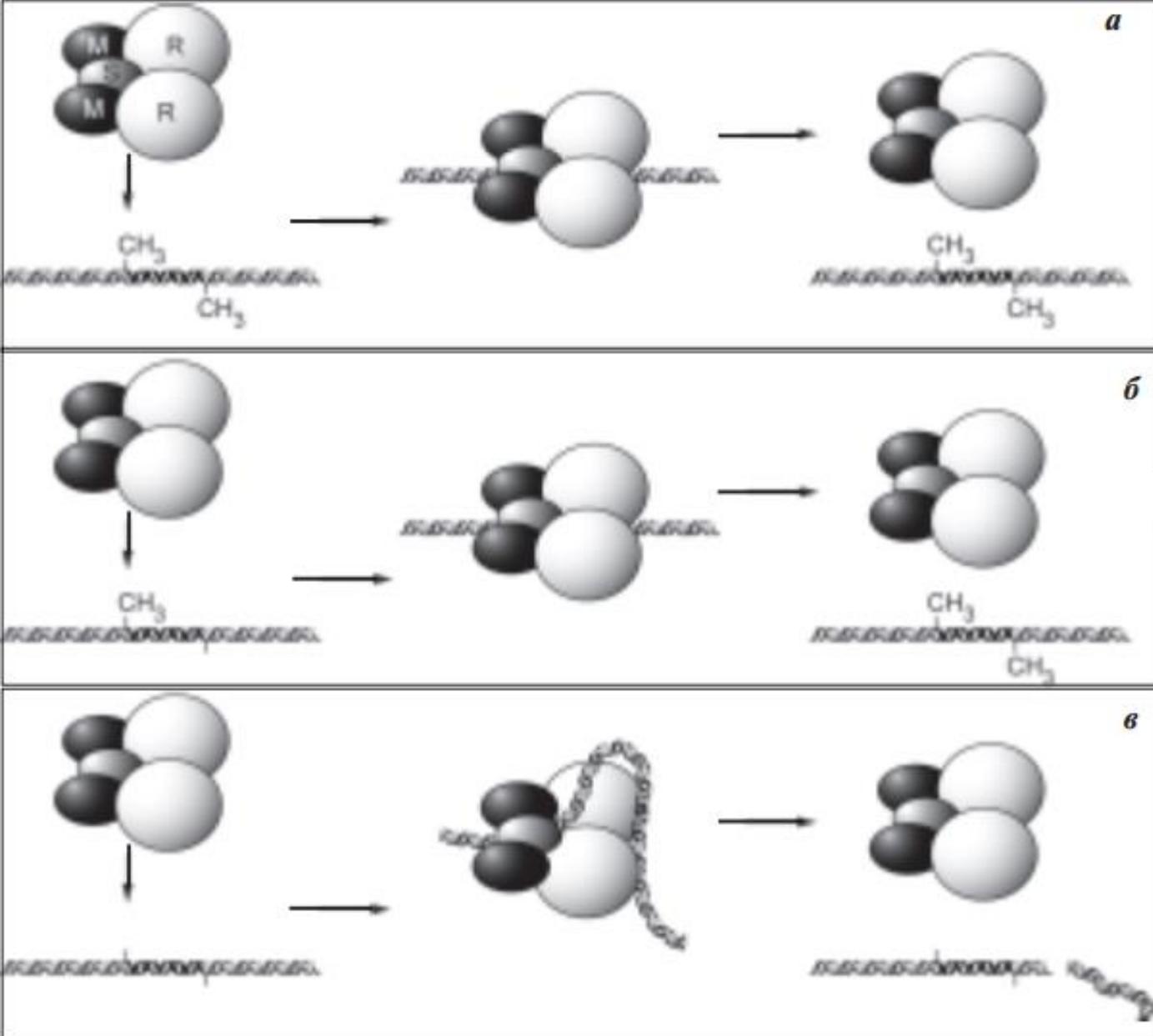
б - деградация фаговой ДНК внутри клетки и/или блокирование процесса репликации (R-M systems, CRISPR-Cas)

с - лизис заражённой клетки («альтруистический суицид»)

Коэволюция – это процесс взаимной адаптации и контрадаптации между экологически взаимодействующими видами (Janzen, 1980)



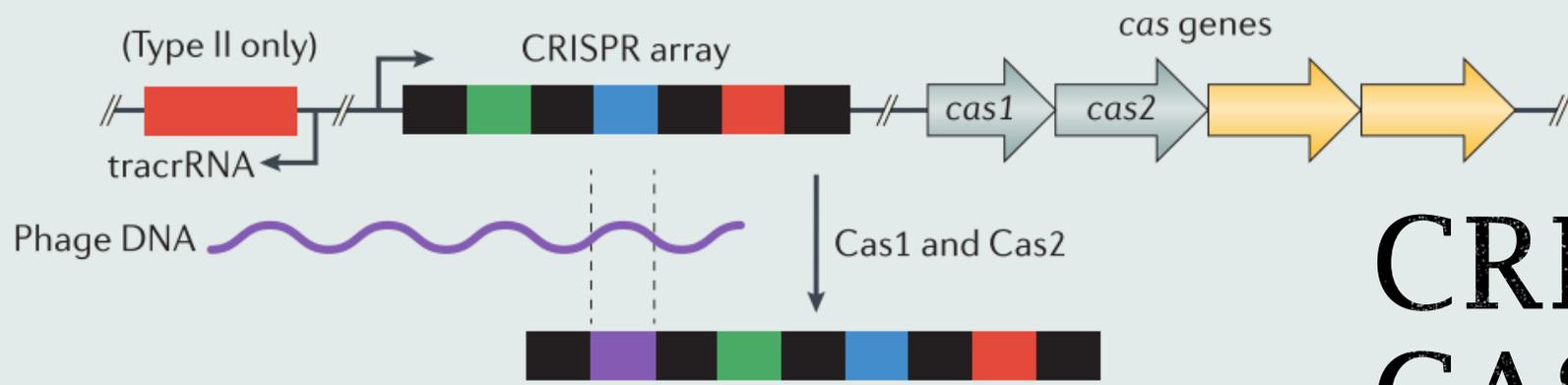
СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ- МОДИФИКАЦИИ



- Схема работы системы Рестрикции-Модификации:
 - а – обе нити ДНК в сайте SK метилированы; комплекс распадается;
 - б – одна из нитей ДНК в сайте SK метилирована; метилаза (M) присоединяет CH₃ к адениловому остатку во второй нити;
 - в – обе нити в сайте SK не метилированы, значит ДНК чужая; фермент протаскивает её через R-субъединицы и затем разрывает

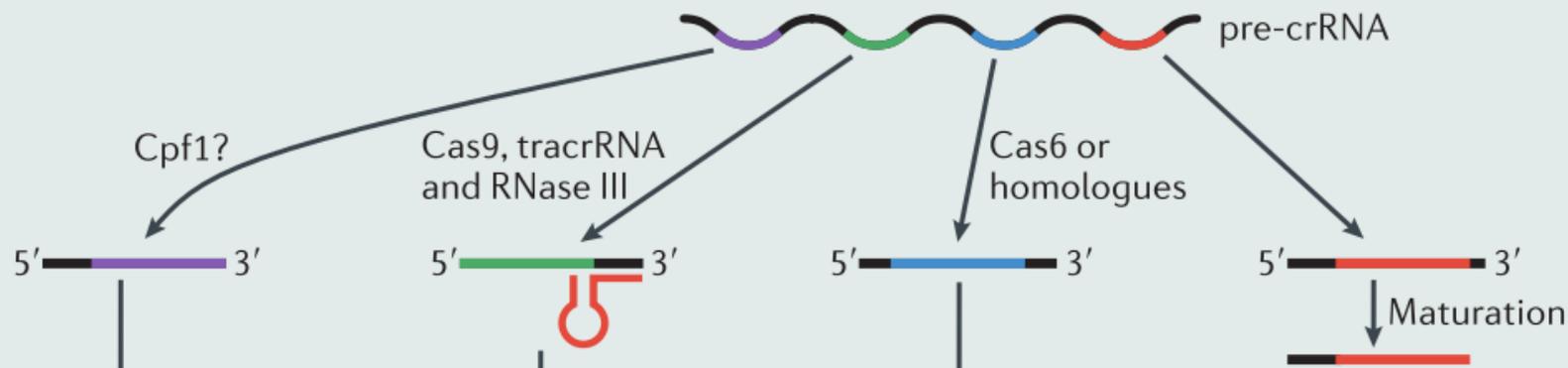


Adaptation



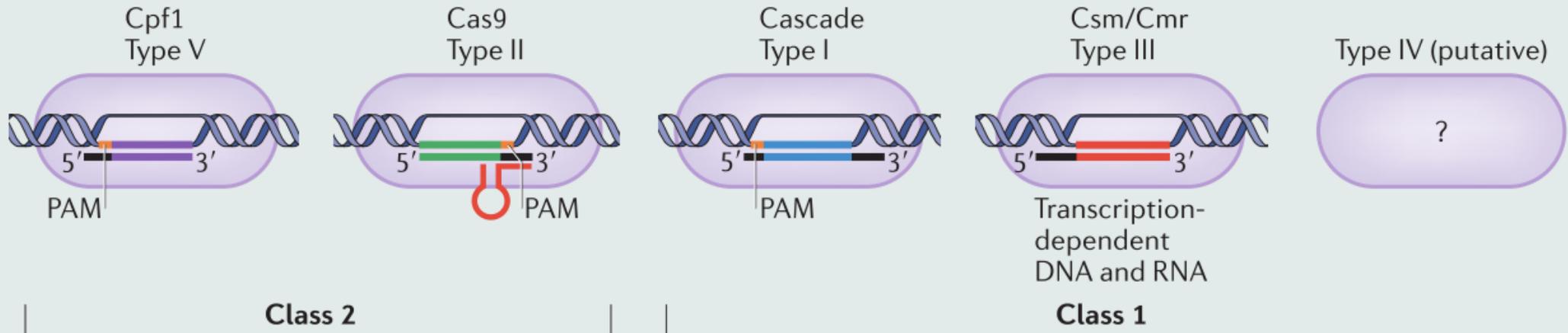
CRISPR-CAS

Expression

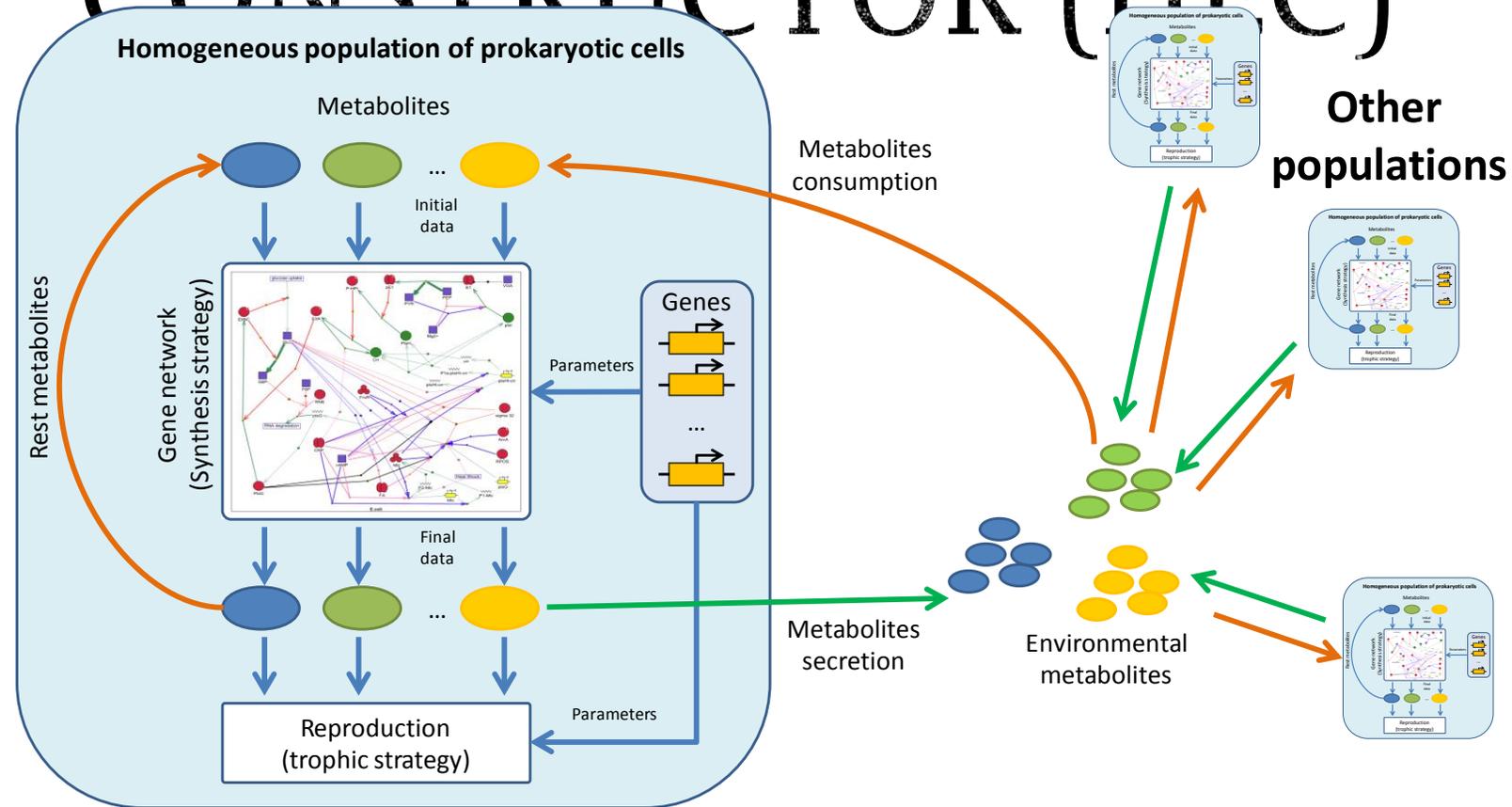


P.C. Salmond, P.C. Finan, 2015

Interference



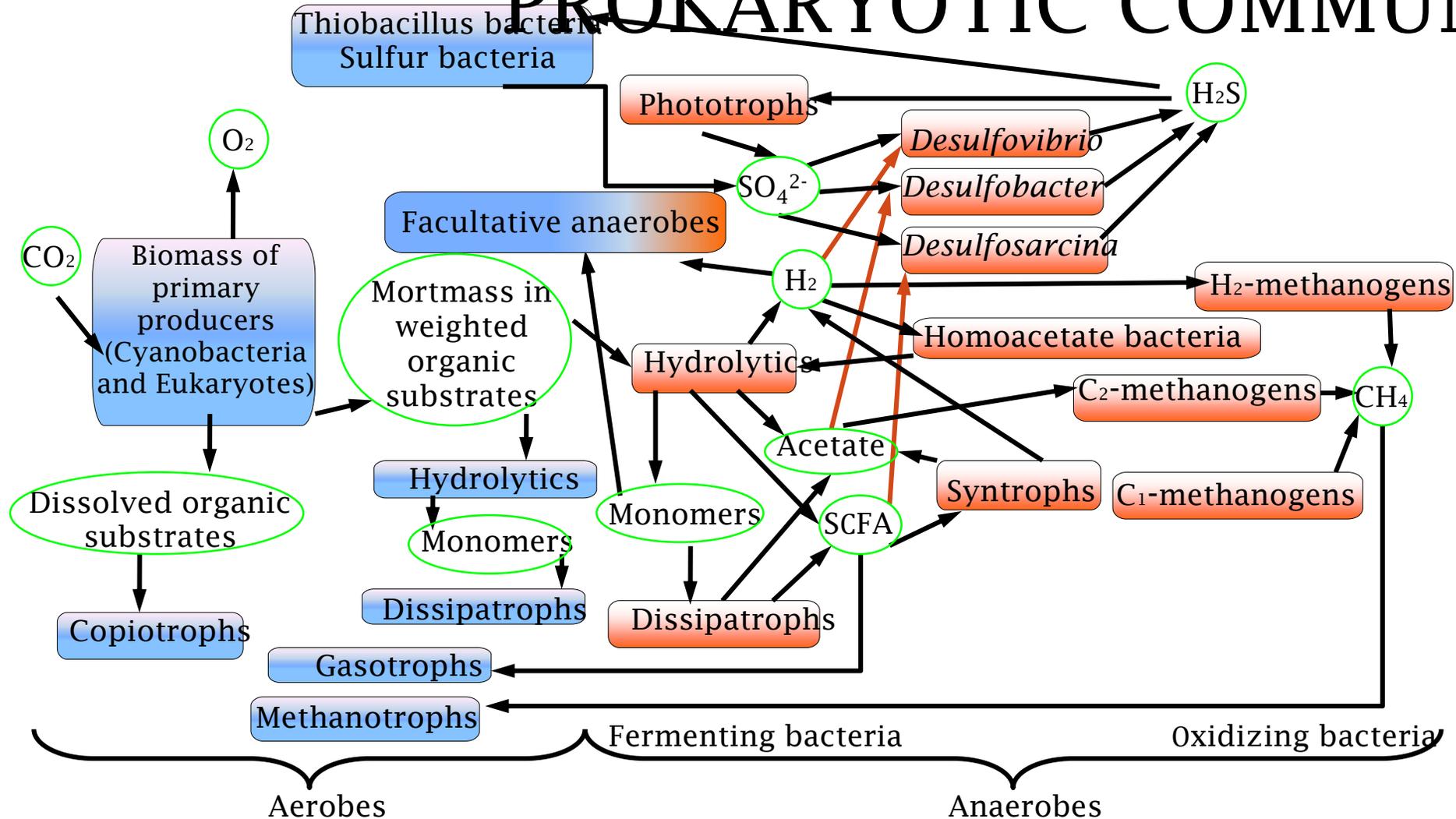
DIPLOID EVOLUTIONARY CONSTRUCTOR (HEC)



HEC simulation approach considers both population genetic and ecological factors



GRAPH OF TROPHIC INTERACTIONS IN PROKARYOTIC COMMUNITY

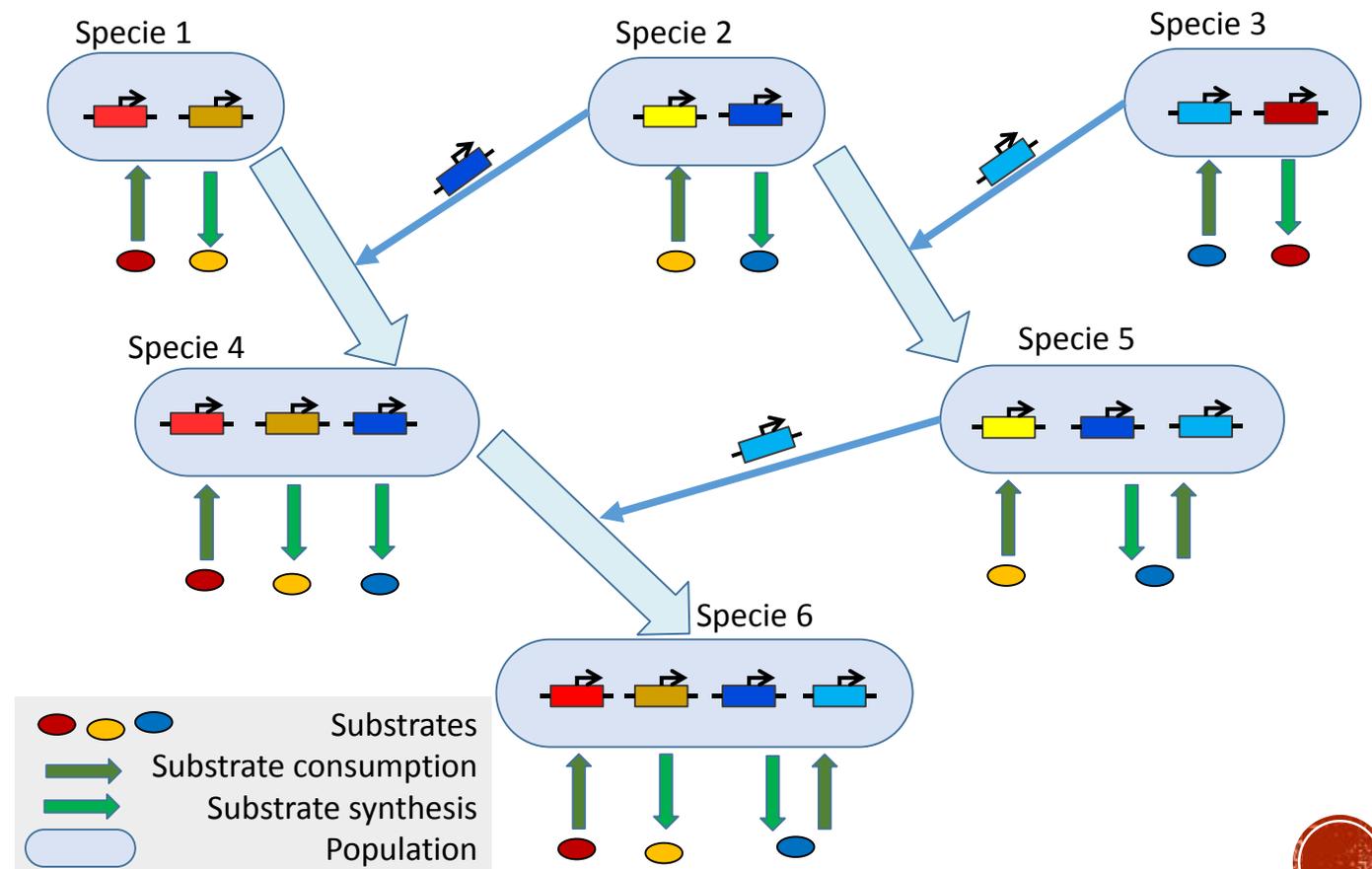


(Zavarzin G.A., 2001, Biosphere origin)



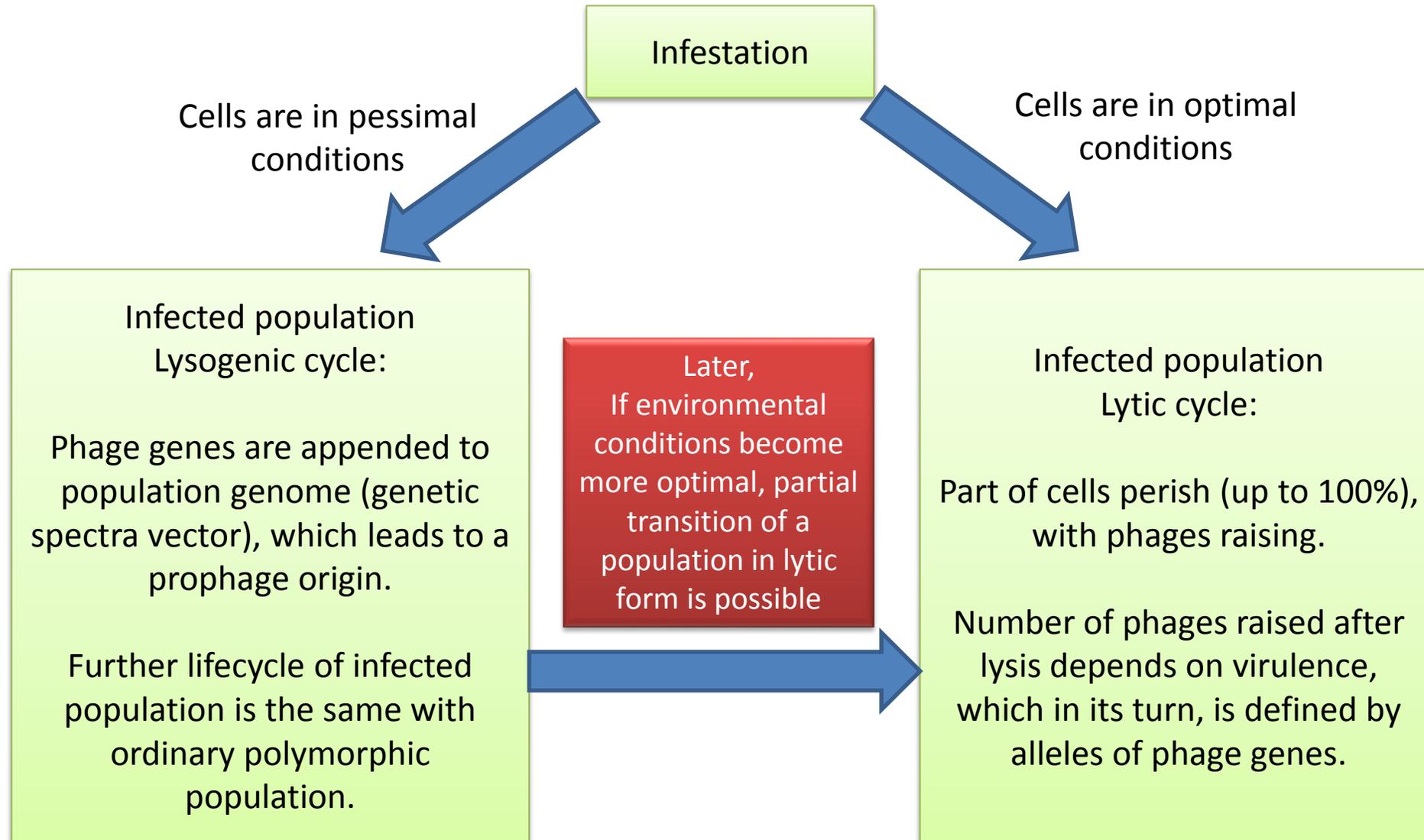
EXCHANGE OF METABOLIC FEATURES VIA HORIZONTAL GENE TRANSFER

- Simulation of horizontal gene transfer (HGT) and emergence of novel species in the HEC [Lashin et al., 2012].
- We regard any substantial change in metabolic activities as *speciation* in our



MODELING PHAGE INFECTION

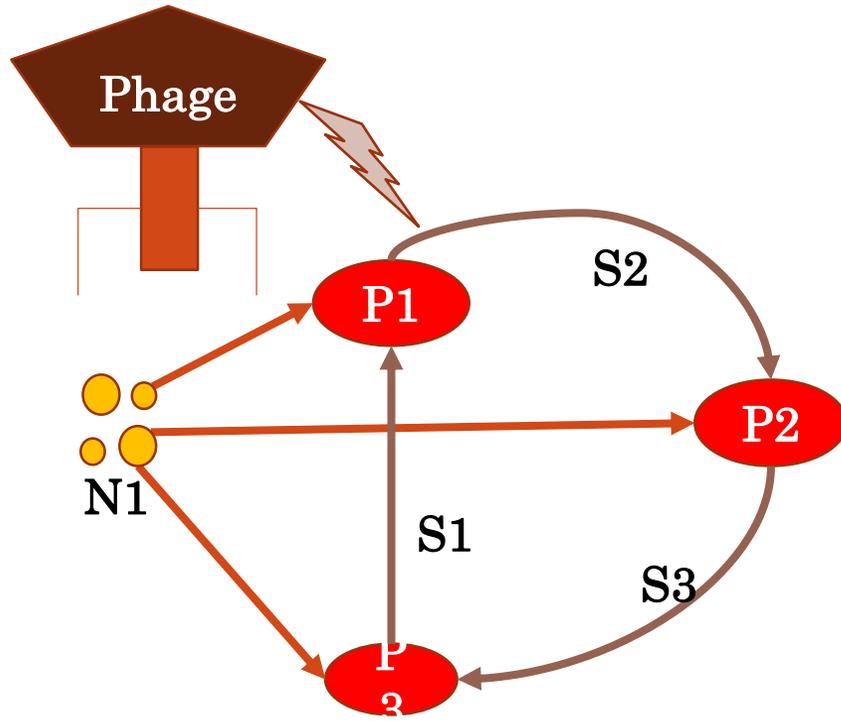
Lysogenic and lytic cycles



PROKARYOTIC COMMUNITIES INHABITING 2D ENVIRONMENT UNDER PHAGE INFECTION

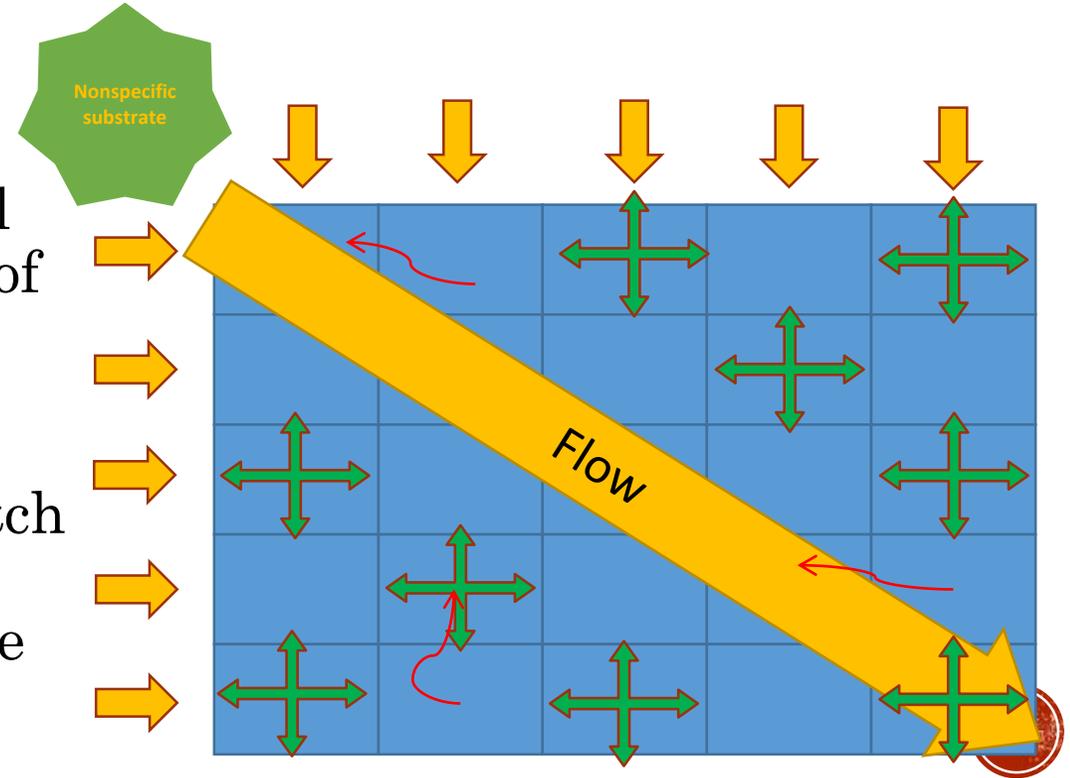
We examined a model of evolving prokaryotic community under phage infection in 2D environment varying the time of initial phage invasion as well as its localization.

The following question was addressed: how does a moderate bacteriophage affects the evolution of metabolism in the microbial community?



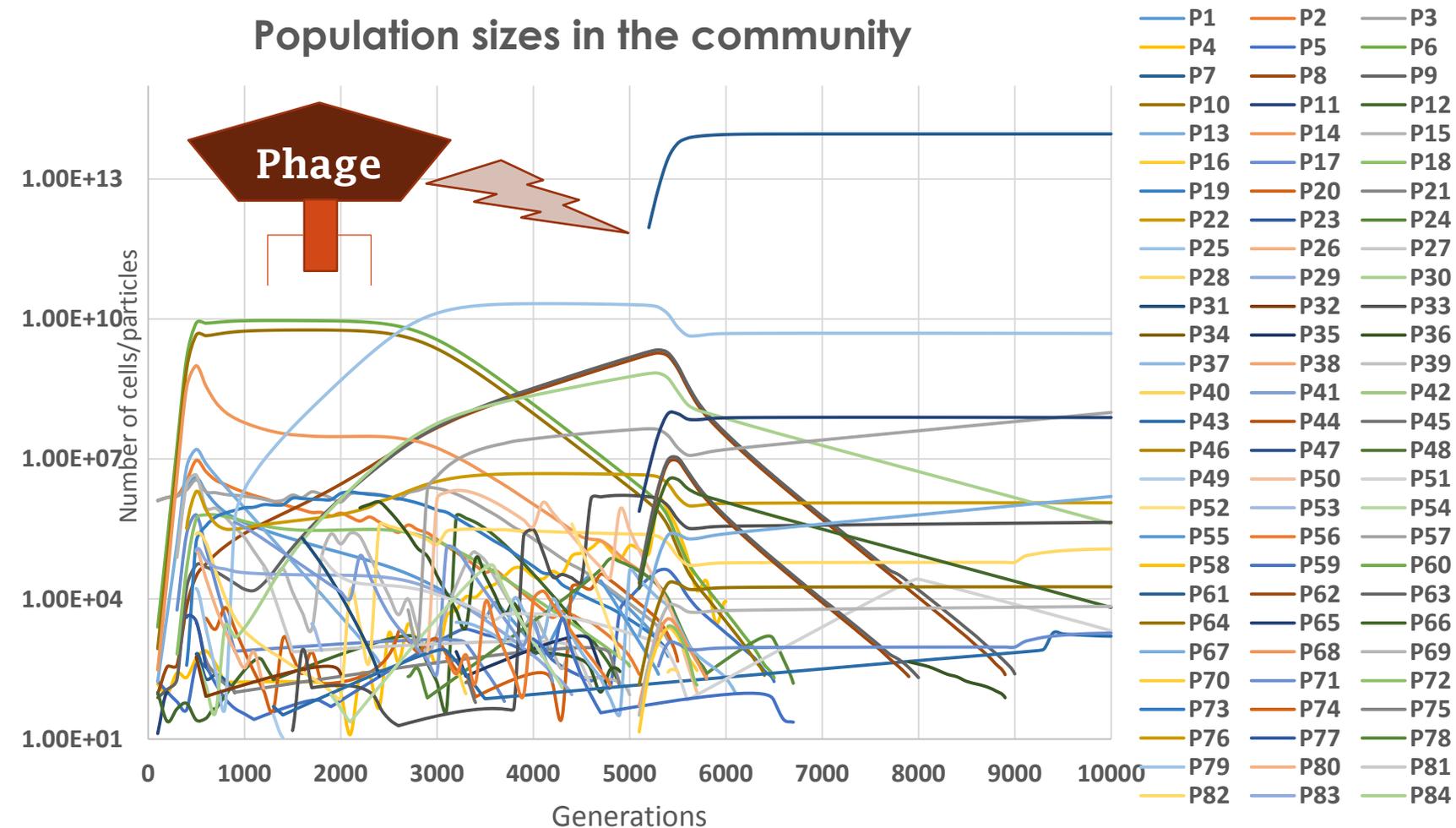
At the left - initial trophic structure of the community

At the right - sketch of spatial organization of the system



«SPECIATION» RATE DECREASE

Population sizes in the community



- Typical population dynamics

- Is there any way to measure it?

- We regard a process of new populations **emergence** characterized by a **unique** set of metabolic traits among species of **non-zero** size as **«speciation»**

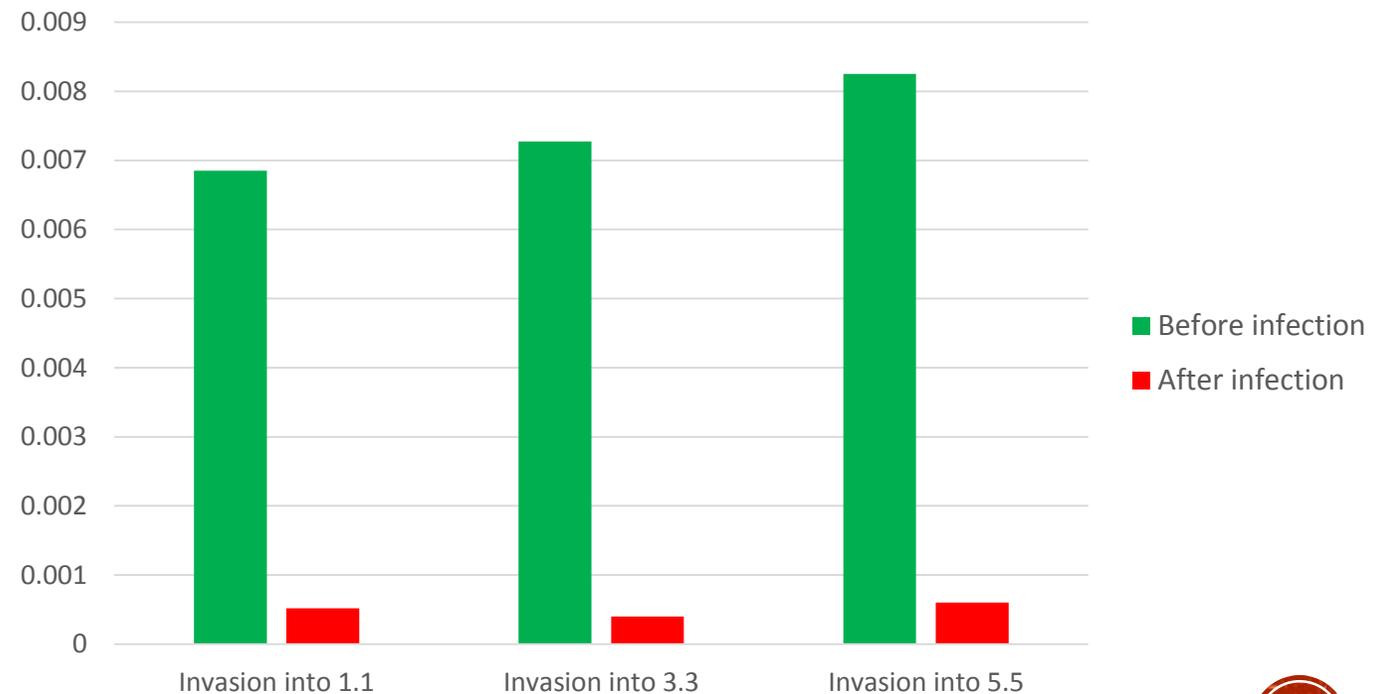
«SPECIATION» RATE DECREASE

$$SRI = \frac{\|\{p|p - \text{newly emerged viable population}\}\|}{time_span}$$

time_span – the period speciation rate is estimated about; a population is assumed to be *viable* if it has survived over a period of 500 generations.
SRI – Speciation Rate Index

- After moderate phage invades the system, SRI decreases **more than one order of magnitude.**

SRI for the middle-time (5000th generation) phage invasion models

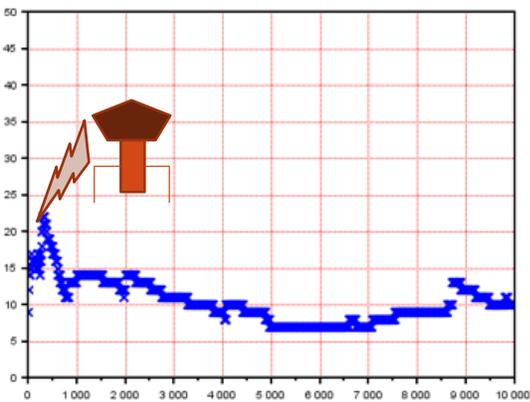


Early-time phage invasion (at 1 generation)

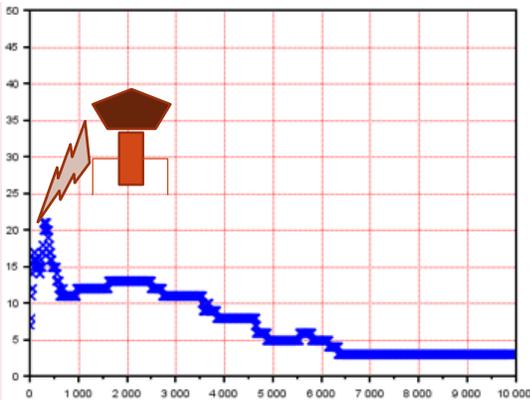
Middle-time phage invasion (at 5000 generation)

Late-time phage invasion (at 6600 generation)

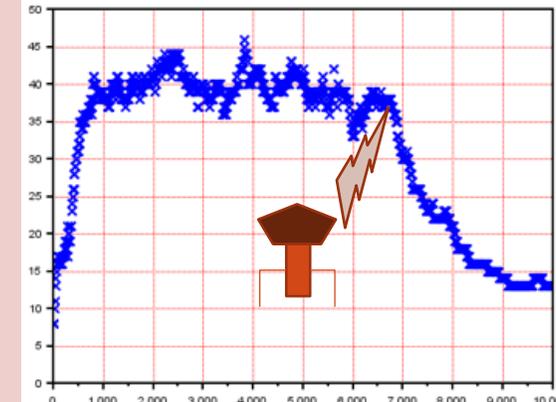
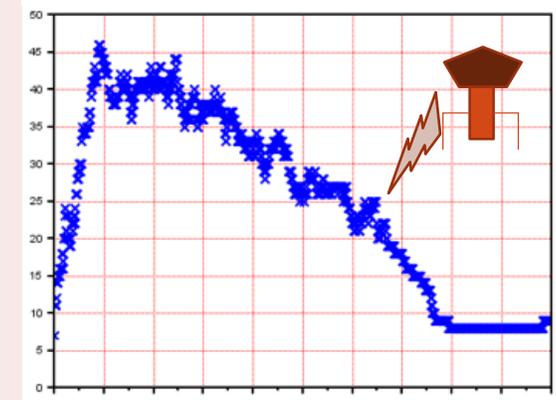
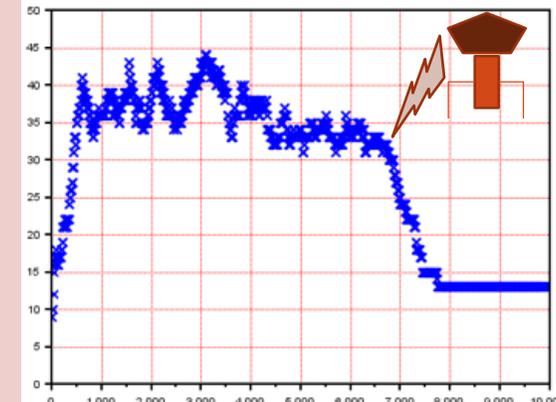
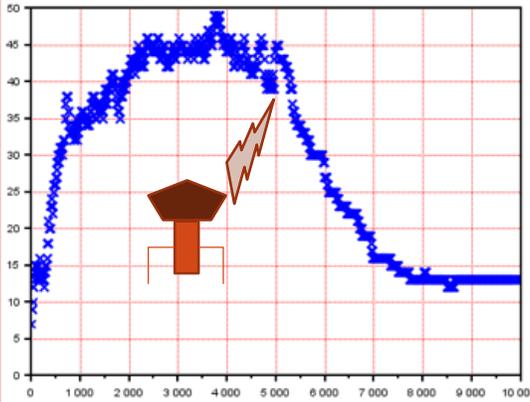
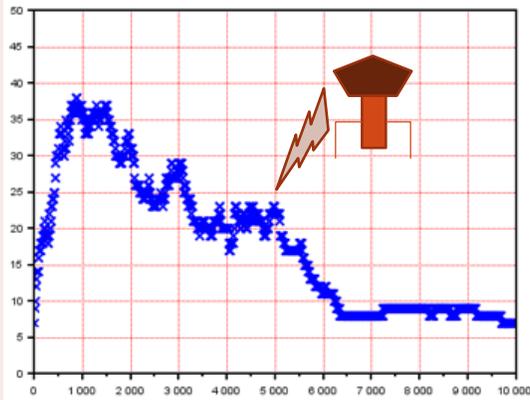
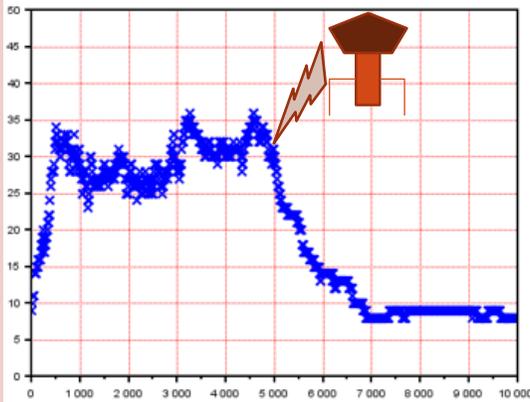
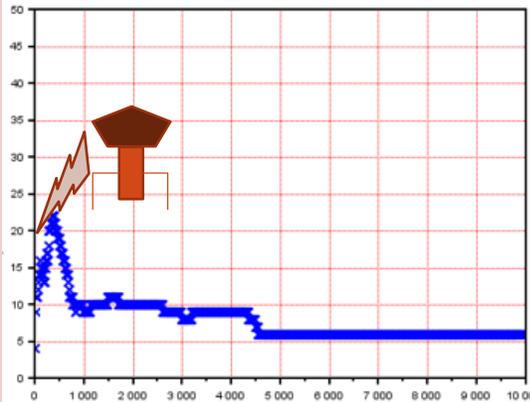
Into the node
(1,1)



Into the node
(3,3)



Into the node
(5,5)

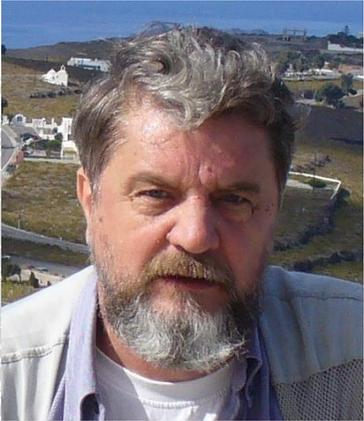


CONCLUSION

- Moderate phage infection **dramatically decreases the speciation rate** caused by gene loss and horizontal gene transfer of metabolic genes by more than one order of magnitude as far as intensified selection blocks the origin of novel viable populations/species, which could carve out potential ecological niches.
- At the same time, phages act as a **stabilizing factor** suspending superfluous speciation and encouraging stationary state of the system (in terms of species number).



HAPLOID EVOLUTIONARY CONSTRUCTOR TEAM



Yury Matushkin
Head of the project



Valentin Suslov
Biological interpretations



Sergey Lashin
Project management,
mathematical modeling,
simulations



Anton Chekantsev
Programming, GUI



Alexandra Klimenko
Programming, modeling,
modeling, simulations



Zakhar Mustafin
Programming, High performance
computing



Roman Zudin
Programming, High
performance
computing



MICROBIAL COMMUNITIES

Population size (cells)	10^8 - 10^{25} (~ 1 - 10^{18} g.)
Species diversity (species/strains)	1-10000
Number of genes in one cell	600-6000
Genome length (bp)	10^6 - 10^8
Metabolic path (overall)	no less than 1400*



Picture ©: <http://www.ebio.ru/bak00.html>

* MetaCyc

Nucl. Acids Res. (2014) doi: 10.1093/nar/gku138

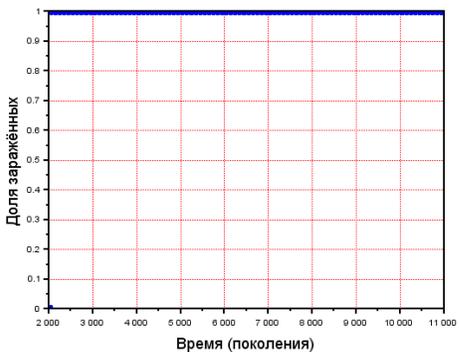


ИНФЕКЦИОННАЯ ДИНАМИКА

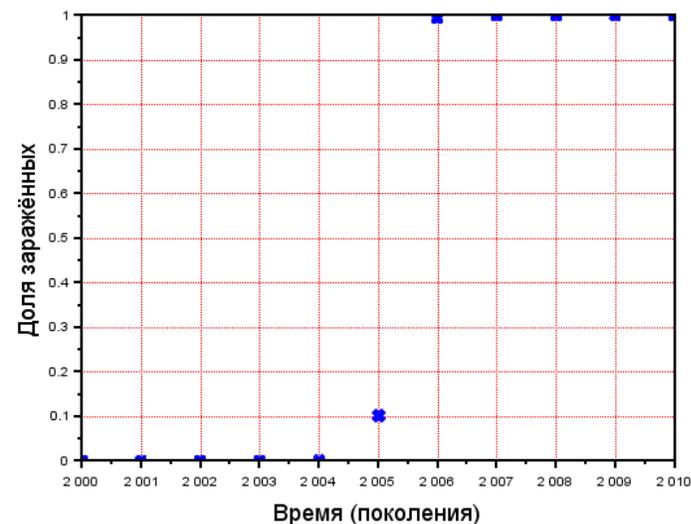
(изменение долей заражённых клеток)

2D

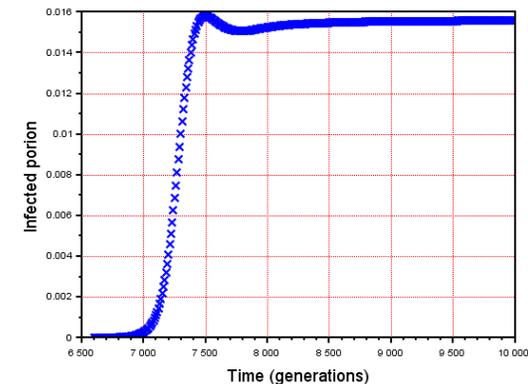
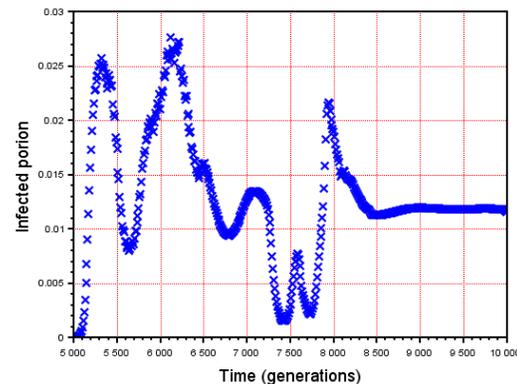
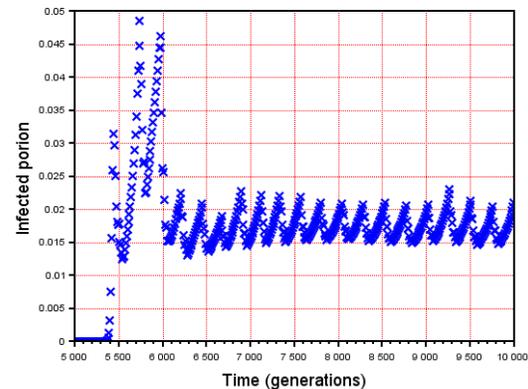
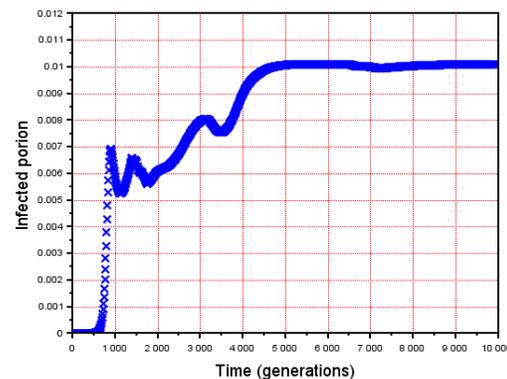
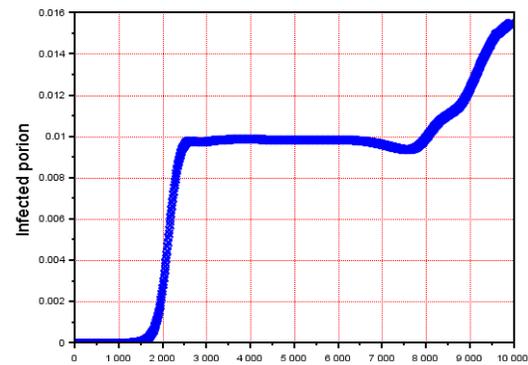
0D



При равномерном перемешивании – резкая ступенчатая динамика



При пространственно-неоднородной среде – самые разнообразные динамики, включая случаи с неполным заражением



РОСТЪ ДОБРАЗОВАНИЯ

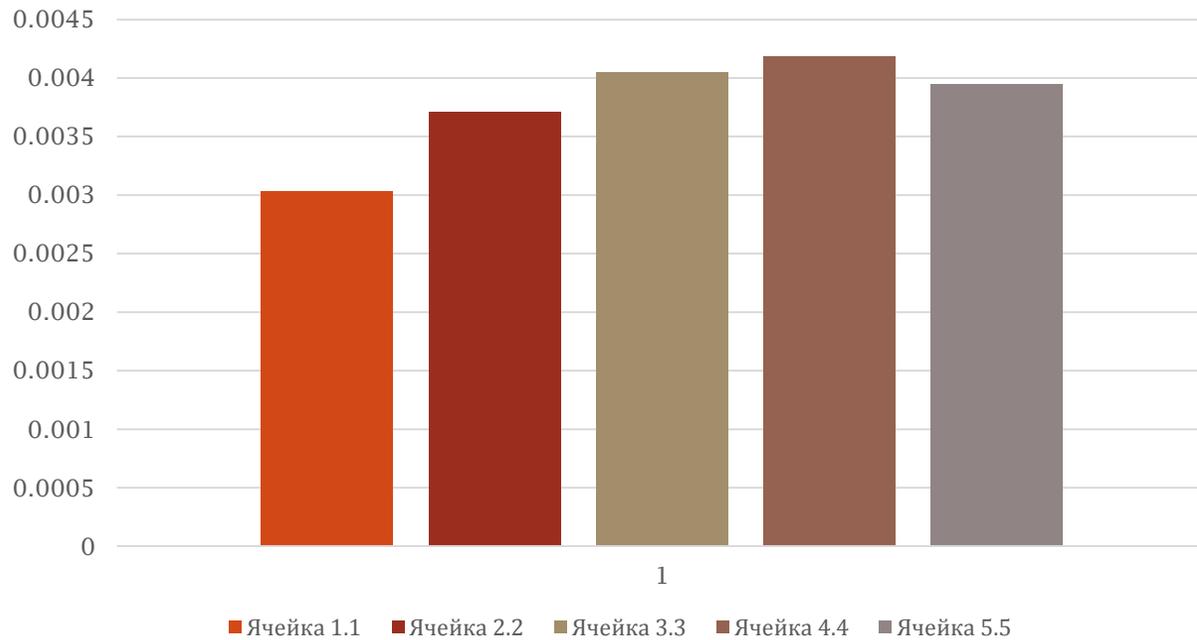
$$SRI = \frac{\| \{p|p - \text{newly emerged viable population}\} \|}{time_span}$$

	Early-time (1 st generation)		Middle-time (5000 th generation)		Late-time (6600 th generation)	
	SRI before	SRI after	SRI before	SRI after	SRI before	SRI after
Into node (1,1)	-	0.000856	0.00685	0.00052	0.007143	0.000529
	SRI before	SRI after	SRI before	SRI after	SRI before	SRI after
Into node (3,3)	-	0.000744	0.007275	0.0004	0.007946	0.000206
	SRI before	SRI after	SRI before	SRI after	SRI before	SRI after
Into node (5,5)	-	0.000578	0.00825	0.0006	0.006964	0.000412
	SRI before	SRI after	SRI before	SRI after	SRI before	SRI after

SRI В СИСТЕМАХ БЕЗ ФАГА

■ Без хемотаксиса

SRI за первые 5000 итераций



• С хемотаксисом

SRI за первые 5000 итераций

