

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.758>

<https://orcid.org/0009-0003-7531-3415>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Algirdas Noreika

Klebsiella infekuojančio bakteriofago
RaK2 adsorbcijos komplekso
struktūriniai ir funkciniai tyrimai

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2025

Disertacija rengta 2017–2025 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos institute, Molekulinės Mikrobiologijos ir Biotechnologijos skyriuje.

Disertacija ginama eksternu ir lietuvių kalba.

Mokslinis konsultantas – dr. *Eugenijus Šimoliūnas* (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. **Saulius Serva** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Nariai:

- dr. *Julija Armalytė* (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004);
- dr. *Aleksandras Konovalovas* (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004);
- prof. dr. *Rimantas Daugelavičius* (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004);
- dr. *Saulius Kulakauskas* (Prancūzijos Nacionalinis žemės ūkio, maisto ir aplinkos tyrimų institutas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. birželio mėn. 9 d. 13 val., VU Gamtos mokslų centro R401 auditorijoje (Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius). El. paštas: **algirdas.noreika@gmc.vu.lt**, tel. nr. +37062612047.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.758>

<https://orcid.org/0009-0003-7531-3415>

VILNIUS UNIVERSITY

Algirdas Noreika

Structural and Functional Studies of Adsorption Complex of the *Klebsiella* Infecting Bacteriophage RaK2

DOCTORIAL DISSERTATION

Natural Sciences

Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2025

The dissertation was prepared between 2017 and 2025 at the Molecular Microbiology and Biotechnology Department of the Institute of Biochemistry, Life Sciences Center, Vilnius University.

The dissertation is defended on an external basis in Lithuanian.

Academic Consultant – Dr. *Eugenijus Šimoliūnas* (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004).

This Doctoral Dissertation will be Defended in a Public Meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. **Saulius Serva** (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004).

Members:

- Dr. *Julija Armalytė* (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004);
- Dr. *Aleksandras Kononovas* (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004);
- Prof. Dr. *Rimantas Daugelavičius* (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004);
- Dr. *Saulius Kulakauskas* (National Research Institute for Agriculture, Food and Environment, France, Natural Sciences, Biochemistry, N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13:00 on the 9th of June, 2025, in Room R401 of the Life Sciences Center (Saulėtekis Ave. 7, LT-10257 Vilnius, Lithuania).

Phone: +37062612047; Email: algirdas.noreika@gmc.vu.lt

The text of this dissertation is available at the Vilnius University Library and on the Vilnius University website:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPOS	9
IVADAS	11
<i>Tyrimo naujumas ir praktinė reikšmė</i>	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1. Klebsiella bakterijos ir jų savybės	15
1.1.1. Virulentiškumo veiksniai	15
1.1.2. Kapsulės Wzx-Wzy biosintezės kelias	17
1.1.3. Kapsulės polisacharidų sintezės cps genų sandara	18
1.1.4. Kapsulės polisacharidų sudėtis	20
1.2. Bakteriofagai ir jų savybės	21
1.2.1. Adsorbcijos kompleksų įvairovė	22
1.2.1.1. Podovirusų adsorbcijos kompleksai	24
1.2.1.2. Sifovirusų adsorbcijos kompleksai	25
1.2.1.3. Miovirusų adsorbcijos kompleksai	26
1.2.2. Bakteriofagų prisijungimo ir atpažinimo baltymai	27
1.2.2.1. Ilgosios uodegos ataugėlės	27
1.2.2.2. Bakteriofagų uodegaspygliai	29
1.2.2.3. Trumposios uodegos ataugėlės	32
1.2.3. Adsorbcijos komplekso baltymų prisijungimo domenai	33
1.3. Bakteriofagų depolimerazės	36
1.3.1. Depolimerazių su nustatyta specifika įvairovė	36
1.3.2. Glikozilo hidrolazės	38
1.3.3. Glikozilo liazės	39
1.4. Didieji bakteriofagai	40
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	43
2.1. Medžiagos	43
2.1.1. Virusai ir mikroorganizmai	43
2.1.2. Plazmidiniai vektoriai ir DNR pradmenys	43
2.1.3. Cheminiai junginiai, makromolekulės	44
2.1.4. Mitybinės terpės, tirpalai, geliai, substratai	45
2.2. Metodai	48
2.2.1. Bioinformatiniai metodai	48
2.2.1.1. RaK2 struktūrinių baltymų bioinformatinė analizė	48
2.2.1.2. Klebsiella sp. KV-3 serotipo nustatymas	49
2.2.2. Mikrobiologiniai, genų inžinerijos ir biocheminiai metodai	49

2.2.2.1.	<i>Bakterijų auginimas ir imliųjų ląstelių paruošimas</i>	49
2.2.2.2.	<i>Imliųjų ląstelių transformacija</i>	50
2.2.2.3.	<i>RaK2 padauginimas ir titravimas</i>	50
2.2.2.4.	<i>RaK2 gryninimas CsCl gradiente</i>	50
2.2.2.5.	<i>RaK2 genų padauginimas PGR metodu</i>	51
2.2.2.6.	<i>Plazmidžių atranka PGR metodu – kolonijų PGR</i>	51
2.2.2.7.	<i>DNR elektroforezė agarozės gelyje</i>	51
2.2.2.8.	<i>Plazmidinės DNR padauginimas ir išskyrimas</i>	51
2.2.2.9.	<i>DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis</i>	52
2.2.2.10.	<i>DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio</i>	52
2.2.2.11.	<i>RaK2 rekombinantinių baltymų kūrimas</i>	52
2.2.2.12.	<i>Rekombinantinių baltymų biosintezės indukcija IPTG</i>	52
2.2.2.13.	<i>Biomasės ardymas ultragarsu</i>	53
2.2.2.14.	<i>Baltymų elektroforezė, SDS-PAGE</i>	53
2.2.2.15.	<i>Rekombinantinių baltymų gryninimas</i>	53
2.2.2.16.	<i>Baltymų koncentracijos nustatymas Lourio metodu</i>	54
2.2.3.	<i>Imunologiniai ir mikroskopinės analizės metodai</i>	54
2.2.3.1.	<i>Triušių imunizacija RaK2 rekombinantiniais baltymais</i>	54
2.2.3.2.	<i>RaK2 infekcijos slopinimas antiserumais</i>	54
2.2.3.3.	<i>RaK2 adsorbcijos slopinimas</i>	55
2.2.3.4.	<i>„Western blot“ analizė</i>	55
2.2.3.5.	<i>RaK2 žymėjimas aukso nanodalelėmis ir TEM analizė</i>	56
2.2.3.6.	<i>RaK2 analizė atominių jėgų mikroskopu (AFM)</i>	56
2.2.4.	<i>Depolimerazės charakterizavimo metodai</i>	57
2.2.4.1.	<i>Depolimerazinio aktyvumo skaidrių zonų testas</i>	57
2.2.4.2.	<i>Depolimerazės substratų pirminė atranka</i>	57
2.2.4.3.	<i>Plonasluoksnė chromatografija (TLC)</i>	57
2.2.4.4.	<i>Polisacharido išskyrimas iš Klebsiella sp. KV-3</i>	57
2.2.4.5.	<i>Polisacharido skaidymas rekombinantiniu gp531</i>	58
2.2.4.6.	<i>Sacharidų HPLC-MS analizė</i>	58
2.2.4.7.	<i>Sacharidų redukcija NaBH₄</i>	59
2.2.4.8.	<i>Sacharidų derivatizacija ANTS</i>	59
2.2.4.9.	<i>ANTS-tetrasacharido gryninimas</i>	59
2.2.4.10.	<i>Sacharidų hidrolizė TFA rūgštimi</i>	60
2.2.4.11.	<i>Santykinis gp531 aktyvumas skirtingomis sąlygomis</i>	60
3.	REZULTATAI	60
3.1.	<i>RaK2 baltymų bioinformatinė analizė</i>	60
3.2.	<i>Rekombinantinių RaK2 baltymų sintezė ir gryninimas</i>	64

3.3. RaK2 baltymų biosintezės „Western blot“ analizė	66
3.4. RaK2 infekcijos ir adsorbcijos slopinimas	67
3.5. RaK2 žymėjimas aukso nanodalelėmis ir mikroskopinės analizės	69
3.6. <i>Klebsiella</i> sp. KV-3 K-serotipas ir jo polisacharido sudėtis	72
3.7. RaK2 depolimerazių charakterizavimas	74
4. REZULTATŲ APTARIMAS	80
4.1. Bioinformatinė RaK2 baltymų analizė	80
4.2. Adsorbcijos komplekso tyrimai	81
4.3. RaK2 depolimerazės charakterizavimas	86
IŠVADOS	89
INFORMACIJOS ŠALTINIAI	90
PRIEDAI	102
Paveikslai	112
Lentelės	120
PUBLIKACIJOS IR KITA MOKSLINĖ VEIKLA	124
PADĖKA	126
SUMMARY OF DOCTORIAL DISSERTATION	127
INTRODUCTION	127
MATERIALS AND METHODS	132
<i>Plasmid vectors</i>	132
<i>DNA primers</i>	132
<i>Bacterial strains</i>	132
<i>Bacterial virus</i>	133
<i>Chemical compounds and solutions</i>	133
Methods	136
<i>Bioinformatic analysis of RaK2 protein structures</i>	136
<i>Klebsiella</i> sp. KV-3 K-typing using bioinformatics	137
<i>Cultivation, competent cell preparation, and transformation</i>	137
<i>RaK2 propagation and CsCl purification</i>	138
<i>PCR assay</i>	138
<i>Plasmid cloning</i>	138
<i>Recombinant protein induction and purification</i>	139
<i>Rabbit immunisation with recombinant proteins of RaK2</i>	139
<i>RaK2 infection inhibition with antisera</i>	140
<i>RaK2 adsorption inhibition</i>	140

<i>Western Blot</i>	141
<i>Immunogold labelling of RaK2 and TEM</i>	141
<i>AFM analysis of RaK2</i>	141
<i>Depolymerase activity identification using spot test</i>	142
<i>Depolymerase substrate screening</i>	142
<i>Thin-layer chromatography (TLC)</i>	142
<i>Polysaccharide isolation and digestion</i>	143
<i>Saccharide HPLC-MS analysis</i>	143
<i>Saccharide reducing end modification with NaBH₄ or ANTS</i>	143
<i>Saccharide hydrolysis with TFA</i>	144
<i>Relative activity of gp531 under different conditions</i>	144
RESULTS	145
<i>Bioinformatic analysis of RaK2 proteins</i>	145
<i>Induction and purification of the RaK2 proteins</i>	148
<i>Western blot analysis of RaK2 proteins</i>	150
<i>RaK2 infection and adsorption inhibition</i>	151
<i>RaK2 labelling with gold and microscopic analyses</i>	152
<i>Klebsiella sp. KV-3 K-serotype and its polysaccharide structure</i>	154
<i>RaK2 depolymerase characterisation</i>	156
DISCUSSION	161
<i>Bioinformatic analysis of RaK2 proteins</i>	161
<i>Adsorption complex study</i>	162
<i>RaK2 depolymerase specificity characterisation</i>	166
CONCLUSIONS	169
SCIENTIFIC ACHIEVEMENTS	170
CURRICULUM VITAE	171

SANTRUMPOS

aa	aminorūgščių liekanos;
ACN	acetonitrilas;
ANTS	8-aminonaftaleno 1,3,6-trisulfoninė rūgštis;
APS	amonio persulfatas;
BSA	jaučio serumo albuminas (<i>bovine serum albumin</i>);
CBM	angliavandenius prijungiantis modulis (<i>carbohydrate-binding module</i>);
cfu	(bakterijų) koloniją formuojantis vienetas (<i>colony-forming unit</i>);
cps	kapsulės polisacharidų sintezės genų sandauga (<i>capsular polysaccharide synthesis gene cluster</i>);
CV	kolonėlės tūris (<i>column volume</i>);
D-Cell	D-celobiozė;
D-Glc	D-gliukozė;
DAB	3,3'-diaminobenzidinas;
DMSO	dimetilsulfoksidas;
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> spp. patogenų grupė;
EtBr	etidžio bromidas;
FPLC	greita baltymų skysčių chromatografija (<i>fast protein liquid chromatography</i>);
g	standartinis gravitacijos pagreitis;
gp	geno produktas;
gr.	grupė;
HPLC	didelio našumo skysčių chromatografija (<i>high performance liquid chromatography</i>);
Ig	imunoglobulinas;
ImH	imidazolas;
IPTG	izopropilo β-D-1-tiogalaktopiranozidas;
L-Fuc	L-fukozė;
LPS	lipopolisacharidas;
LTF	ilgoji uodegos ataugėlė (<i>long tail fibre</i>);
M	molekulinė masė, Da;
MOI	infekcijos daugybiškumas (<i>multiplicity of infection</i>) – tai virionų ir bakterijų skaičiaus santykis (pfu/cfu);
MS	masių spektrometrija;
MWCO	molekulinio svorio sulaikymo riba (<i>molecular weight cut-off</i>), Da;
n/a	netaikoma, nenustatyta (<i>not applicable/ not acquired</i>);
NP	nitrofenilo gr. (<i>nitrophenyl</i>);
OD ₆₀₀	optinis tankis (<i>optical density</i>), matuojant šviesos, 600 nm bangos ilgio, srauto sumažėjimą;
OmpC	išorinės membranos baltymas C;
PAA	poliakrilamidas;
PAGE	poliakrilamido gelio elektroforezė;
pfu	skaidrią zoną formuojantis vienetas (<i>plaque-forming unit</i>);

PMSF	fenilmetilsulfonilo fluoridas (<i>phenylmethylsulphonyl fluoride</i>);
PS	polisacharidas;
PVDF	polivinilideno fluoridas („Western blot“ membranos medžiaga);
RB	rekombinantinis baltymas;
RBP	receptorių atpažįstantis baltymas (<i>receptor-binding protein</i>);
RE	restrikcijos endonukleazė;
SD	standartinis nuokrypis (<i>standard deviation</i>);
SDS	natrio dodecilo sulfatas (<i>sodium dodecyl sulphate</i>);
STF	trumpoji uodegos ataugėlė (<i>short tail fibre</i>);
TCA	trichloracto rūgštis;
TEM	transmisinė elektroninė mikroskopija;
TF	uodegos ataugėlė (<i>tail fibre</i>);
TFA	trifluoracto rūgštis;
Tris	2-amino-2-metilhidroksi-1,3-propandiolis;
TSP	uodegaspyglis arba uodegos spyglio baltymas (<i>tailspike/ tail spike protein</i>);
wt	laukinis tipas (<i>wild-type</i>);
X-Gal	5-Br-4-Cl-3-indolilo β-D-galaktopiranozidas;
X-Glc	5-Br-4-Cl-3-indolilo β-D-gliukopiranozidas;
X-GlcA	5-Br-4-Cl-3-indolilo β-D-gliukuronidas;
Δt	trukmė, h.

IVADAS

Žmogaus netiesiogiai sukurtos selekcijos pasekmės, dėl perteklinio antibiotikų naudojimo įvairiose gamybos šakose: medicinoje, maisto pramonėje, gyvulininkystėje, sodininkystėje – pasireiškia didesne atsparių antibiotikams ir jų deriniams bakterijų padermių įvairovė^{1–3}, kas apsunkina jų sukeltų infekcijų gydymą^{3–7}. Vienas iš šios, nuolat augančios, problemos sprendimo būdų yra alternatyvų antibiotikams paieška.

Natūralūs bakterijų žudikai, (bakterio)fagai⁸, įprastai sudaryti iš genomą talpinančios kapsidės, uodegos ir jos gale esančio adsorbcijos komplekso^{9,10}, yra puiki alternatyva, kuri neretai pasižyminti pranašesnėmis savybėmis nei antibiotikai^{11,12}. Dauginimosi metu fagai tikslingai naikina vienos rūšies ar padermės bakterijas, todėl jie nesukelia didelės žalos mikrobiotai ir gydymas jais nereikalauja didelės preparato dozės^{13–15}. Šios patrauklios jų savybės skatina įvairius mokslinius bakteriofagų tyrimus. Bendras virusų apibūdinimas leidžia pažinti jų morfologiją, evoliuciją, genetinę įvairovę ir atrasti platesnes gydymo galimybes^{8,16–18}. Bakteriofago ir bakterijos sąveikos¹⁹ tyrimai leidžia suprasti bakterijų atsparumo fagams išsivystymą ir kurti bakterijų augimo slopinimo strategijas. Tokiu būdu nustatyti viruso esminiai baltymai, dalyvaujantys infekcijos pradėjime, priklausomai nuo savybių (fermentinis^{20,21,30–39,22–29} ar bakterijų lizinis⁴⁰ aktyvumas), gali būti pritaikomi medicinoje⁴¹ ar biotechnologijoje⁴².

Taip pat bakteriofagai yra gana paprasti ir nebrangūs moduliniai organizmai, kurių tyrimai atskleidė daugelį fundamentalių molekulinės biologijos tiesų, tokių kaip: nukleorūgštis yra paveldima gyvybės medžiaga⁴³; nukleorūgščių hibridizacija vyksta baltymų sintezės metu ribosomose⁴⁴; bakterijos skaido fagų DNR savo restrikcijos-modifikacijos⁴⁵ arba CRISPR savaizgos sistemomis^{8,46}.

Vienas iš esminių fundamentaliųjų tyrimų objektų yra fago adsorbcijos kompleksas, būtinas infekcijai pradėti, kurio sudėtingumas priklauso nuo viruso uodegos morfologijos^{21,47,56,48–55}. Vienus sudėtingiausių ir mažai aprašytus adsorbcijos kompleksus^{57,58} turi vadinamieji *jumbo* (didieji) bakteriofagai^{59,60}, pasižymintys dideliu genomu (>200 kbp) ir savitomis kitiems virusams nebūdingomis savybėmis. Didžiųjų virusų adsorbcijos komplekse dažniausiai būna heterogeniškos, labilios, ilgos ir neretai šakotos nanostruktūros – ilgosios uodegos ataugėlės, matomos elektroninėse mikrofotografijose^{61,62}. Ataugėlės gali sudaryti iki 14 skirtingų struktūrinių baltymų, įprastai uodegaspyglių^{63,64}, aptinkamų ir mažesniuose faguose^{21,38,65}. Šie baltymai paprastai pasižymi skirtingu depolimeraziniu aktyvumu^{63,66–69}, skaidančiu bakterijos išorėje esančius polimerus^{33,38,70}. Ši jų savybė leidžia virusui specifiskai priartėti prie

išorinės membranos⁵¹ ir po antrinės, adhezino giminingumo, sąveikos negrįžtamai adsorbuotis ant bakterijos paviršiaus ir pradėti jos užkrėtimą^{50,71}.

Fagų depolimerazių taikiniai⁷² yra lipopolisacharidai (LPS)⁷³ ir kapsulės polisacharidai^{74,75}, gaubiantys bakterijos paviršių ir atitinkamai siejami su O ir K-serotipų antigenais^{76–79}. Šie antigenai yra vieni iš pagrindinių virulentiškumo veiksnių^{76,80}, skatinančių bakterijų patogeniškumą, kadangi apsaugo ląstelę nuo išorinių veiksnių, kaip: imuninis atsakas, virusai ar nepalankios aplinkos sąlygos^{81–83}. Šie veiksniai⁸⁰ ir atsparumas įv. antibiotikams¹ papildomai apsunkina bakterinių infekcijų gydymą ir lemia didesnę pacientų mirtingumą^{84,85}.

Skaiciuojama >300-ai skirtingų *Klebsiella* spp. serotipų, tačiau tik apie 80-iai K-tipų yra nustatyta tiksli polisacharidų struktūra^{78,86}. Serotipų įvairovė^{76,87,88} lemia didelį depolimerazių ir su jomis susijusių potencialių fermentinių specifiskumų skaičių^{31,35,39,89,90}, nes polisacharidai gali būti sudaryti iš dešimties skirtingų monosacharidų liekanų su įvairiomis modifikacijomis^{91,92} ir glikozidinių ryšių deriniais.

Taigi, fagų adsorbcijos kompleksų tyrimai padeda geriau suprasti šių virusų kompleksiškas oligomerines struktūras, dalyvaujančias bakterijų atpažinime, kas taip pat naudinga nanostruktūrų bioinžinerijoje⁹³. Taip pat tai leidžia geriau suprasti fago ir bakterijos-šeimininkės sąveikos mechanizmus⁹⁴. Nustatyti baltymai su depolimeraziniu arba afininio aktyvumu įgalina įvairių sistemų kūrimą, skirtų patogenų detekcijai ar jų tipavimui⁹⁵, arba skirtingų oligosacharidų⁹⁶ fiziologinėmis sąlygomis sintezę. Šie sacharidai gali būti naudojami glikovakcinų kūrime, o depolimerazės – kaip priedai bakterinių infekcijų gydymui^{97,98}. Fagų sąveikos baltymai, adhezina, gali būti pritaikomi, panašiu į virusų ekspozicijos sistemas principu⁹⁹, afininių molekulių generavimo platformose.

Siekiant geriau pažinti mažai ištirtus *jumbo* bakteriofagų adsorbcijos kompleksus, šio darbo objektas buvo vB_KleM-RaK2¹⁰⁰ – vienas pirmųjų atrastų didžiųjų *Klebsiella* virusų. Jo unikaliame adsorbcijos komplekse yra šešios šakotosios ilgosios ataugėlės, sudarytos iš bent dešimties skirtingų struktūrinių baltymų, galimai turinčių fermentinį aktyvumą.

Darbo tikslas: ištirti *jumbo* bakteriofago RaK2 adsorbcijos komplekso baltymų struktūrines ir funkcines savybes.

Uždaviniai:

- 1) atlikti bakteriofago RaK2 struktūrinių baltymų gp098 ir gp526–534 bioinformatinę analizę;
- 2) nustatyti RaK2 baltymus, atsakingus už bakteriofago adsorbciją ant *Klebsiella pneumoniae* KV-3 izoliato bakterijų;
- 3) nustatyti RaK2 šakotąją ilgąją uodegos ataugėlę formuojančius baltymus;

- 4) nustatyti *K. pneumoniae* KV-3 serotipą ir jo kapsulės polisacharido sandarą;
- 5) nustatyti ir charakterizuoti RaK2 baltymus, pasižyminčius depolimeraziniu aktyvumu.

Ginamieji teiginiai:

- ⊗ „AlphaFold2“ bioinformatinis įrankis leidžia sugeneruoti patikimus modelius bakteriofagų ilgosios uodegos ataugėlės baltymams, kurie pasižymi struktūrine homologija;
- ⊗ ataugėlės rekombinantinių baltymų tirpumas gali būti padidintas, sintetinant nepilnos sekos polipeptidus;
- ⊗ bakteriofago slopinimas atitinkamais antikūnais leidžia nustatyti jo adsorbcijai reikalingus baltymus;
- ⊗ imuno-žymėjimas Au nanodalelėmis suteikia informacijos apie baltymų išsidėstymą virione;
- ⊗ K-serotipas gali būti nustatytas genotipuojant bakterijų *cps* genų sritį;
- ⊗ depolimerazės fermentiniam aktyvumui charakterizuoti gali būti pritaikytas (produkto chemine modifikacija ir) HPLC-MS analize pagrįstas metodas, naudojant polisacharidą kaip substratą.

Tyrimo naujumas ir praktinė reikšmė

Mažai žinoma apie *Alcyoneusvirus* genties didžiųjų bakteriofagų adsorbcijos kompleksą, kuris pasižymi viena sudėtingiausių literatūroje aprašytų struktūrų. Jų adsorbcijos komplekso sudėtingumą lemia jame esančios ataugėlės – tai ganėtinai ilgos ir siauros nanoplauštinės struktūros, pasižyminčios šakotumu ir labilumu, todėl šie baltymų kompleksai yra mažai ištirti. Vienas pirmųjų atrastų *Alcyoneusvirus* bakteriofagų, RaK2¹⁰¹, turi adsorbcijos kompleksą, sudarytą iš bent dešimties struktūrinių baltymų (gp098 ir gp526–534), kuriems buvo tiriamos struktūrinės ir funkcinės savybės.

Aukštos kokybės, ypač β -klosčių srityse, struktūriniai trimerų modeliai buvo sugeneruoti visiems tirtiems baltymams „Alphafold2“ įrankiu. Pateiktas pirmasis *Alcyoneusvirus* fago ilgosios šakotosios ataugėlės galimos architektūros modelis, kurį sudaro visi tirti baltymai, išskyrus gp098. Kita vertus, infekcijos slopinimo ir adsorbcijos tyrimais parodyta, kad gp098 ir gp531 yra svarbūs RaK2 infekcijos procese, o gp531 taip pat veikia, kaip depolimerazė, formuojanti skaidrias zonas *Klebsiella pneumoniae* KV-3 izoliato bakterijų sluoksnyje. Tiriant šios *Klebsiella* padermės kapsulės serotipą, genotipuojant kapsulės polisacharidų sintezės *cps* sritį, numatyta K54 tipą atitinkanti polisacharido struktūra ir nustatyta viena iš sąlygų, lemianti jos deacetilinimą. Naudojant polisacharidą kaip substratą, buvo išaiškintas depolimerazės gp531 fermentinis specifiškumas. Iki dabar nėra publikuota jokia kita depolimerazė,

hidrolizuojanti K54 serotipo *Klebsiella* polisacharidą, nepriklausomai nuo jo acetilinimo, ir veikianti kaip rūgštinė β -(1→4)-endogliukozidazė.

Tyrimo rezultatai leis geriau suprasti *Alcyoneusvirus* didžiuosiuos fagus ir jų adsorbcijos komplekse esančių baltymų funkcijas. Nustatytas RaK2 gp531 pakankamai stabilus (<55°C) fermentinis specifiskumas gali būti panaudotas gaminant savitus prebiotikus (sudėtyje turinčius L-fukozės) ar glikovakcinas prieš atitinkamus patogenus¹⁰², ar vykdant naujų sacharidų sintezę. Taip pat fermento depolimerazinis veikimas gali padėti gydant virulentišką *Klebsiella*¹⁰³ K54 bakterijų infekcijas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Klebsiella* bakterijos ir jų savybės

Klebsiella genties bakterijos yra natūralus sveikų žmonių ir gyvūnų mikrobiotos komponentas, kuris įprastai nekelia pavojaus savo šeimininkui⁷⁹. Tai fakultatyviniai anaerobai, aptinkami įvairiose ekologinėse nišose: vandens telkiniuose, nuotekose, dirvožemyje, augaluose, sveikų gyvūnų ir žmonių žarnyne ar nosiaryklėje. Morfologiškai, *Klebsiella* bakterijos yra nejudrios, gram-neigiamos, lazdelės formos (0,3–1,0 μm pločio ir 0,6–6,0 μm ilgio) ląstelės, apgaubtos kapsule^{77,104}. *Klebsiella* bakterijos yra atsakingos už trečdalį visų gram-neigiamų bakterinių infekcijų, dažniausiai plintančių gydymo įstaigose invaziniu būdu atliekamų procedūrų metu, ypač tarp nusilpusių pacientų³. *Klebsiella* gentis apima vienuolika bakterijų rūšių⁷⁹, iš kurių *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ir *K. variicola* yra įprastai siejamos su žmonių infekcijomis¹⁰⁵.

K. pneumoniae priklauso ESKAPE patogenų grupei⁸², kurią sudaro ypač virulentiškos ir daugeliui antibiotikų atsparios bakterijų rūšys: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Enterobacter* spp., kurios būtent susijusios su hospitaliniu būdu plintančiomis problematiškomis infekcijomis. *K. pneumoniae* padermių OXA-48, NDM-1 ir CTX-M-15², atsparių karbapeneminams (*carbapenems*) antibiotikams, atsiradimas nuo 2013 m. išryškina problemą, susijusią su per dideliu antibiotikų vartojimu gydant infekcijas. Padidėjęs priešbakterinių vaistų vartojimas atrankiai skatina atsparių patogenų vystymąsi, kas lemia didesnę jų paplitimą ir aptikimą³.

Negydomos *Klebsiella* infekcijos gali pažeisti šlapimo sistemą, plaučius^{106,107}, kepenis^{108,109}, netgi sukelti gyvybei pavojingas infekcijas, įskaitant endokarditą¹⁰⁹, septicemiją¹⁰⁶, smegenų abscesą¹¹⁰ ir išplisti į gretimus audinius⁸⁵. Priklausomai nuo infekcijos židinio, pacientų mirtingumas gali siekti iki 54%¹¹¹. Įprastai *Klebsiella* infekcijos plinta per fizinį kontaktą, o antisanitarinės sąlygos ir prasta higiena didina užsikrėtimo riziką ir sveikiems asmenims¹¹².

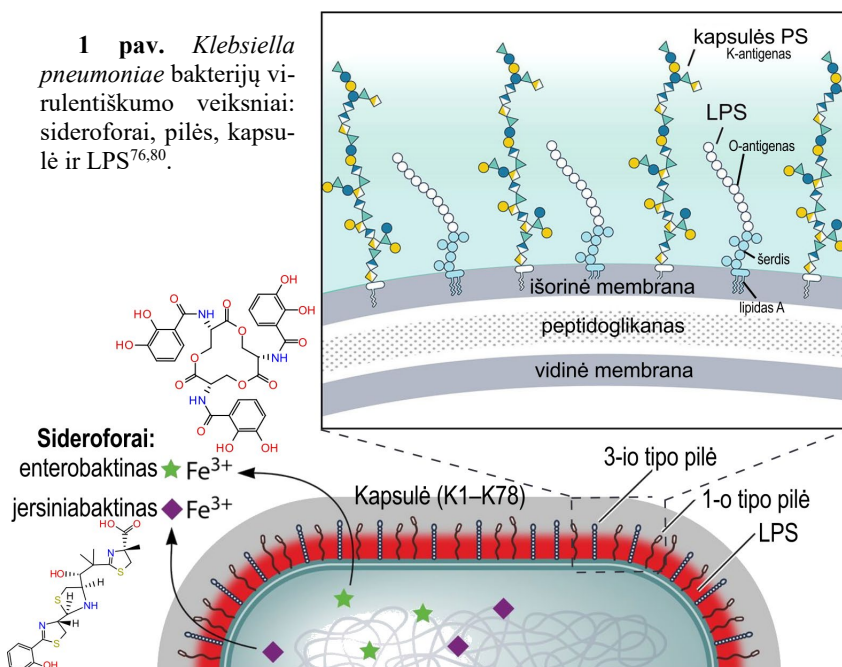
1.1.1. Virulentiškumo veiksniai

Nepaisant atsparumo antibiotikams, bakterijų patogeniškumas labai priklauso ir nuo jų virulentiškumo veiksnių, apimančių: fimbrijas arba pilies (*fimbriae*, *pili*), sideroforus, liposacharidaus (LPS) ir kapsulę, kurie yra gerai ištirtinėti *Klebsiella* spp. bakterijose^{80,113}. Pilės yra bakterijų paviršiaus gijos, pirmiausiai sudarytos iš polihomomerų kaip FimA, būdingų I tipui arba MrkA – III tipui, o jų galuose atitinkamai prisijungia adhesinai FimH ir MrkD. Šios struktūros atsakingos už prisitvirtinimą prie įvairių paviršių. Taip pat pilės skatina bakterijų bioplėvelės (*biofilm*) formavimąsi, kuri yra įvairių polimerų trimatis tinklas,

suteikiantis bakterijoms palankią mikroaplinką ir palengvina jų kolonizaciją^{114,115}.

Sideroforai (*siderophores*) yra mažos molekulinės masės (<1 500 Da) organiniai junginiai, intensyviai chelatuojantys (10^{12} – 10^{52} M⁻¹) geležies (III) jonus. Bakterija išskiria sideroforus į išorę, kur Fe³⁺ yra ištraukiami iš baltyminių kompleksų ir tai sukelia geležies trūkumą organizme^{116,117}.

Lipopolisacharidai yra makromolekulės, sudarytos iš: išorinio polisacharido fragmento (O-antigeno), turinčio atsikartojančią oligosacharidinę struktūrą; šerdies, sudarytos iš išorinės ir vidinės šerdies oligosacharidų; ir lipido A (endotoksino), kuris tarsi inkaras įtvirtina LPS bakterijos išorinėje membranoje (**1 pav.**). O-antigenas apsaugo bakterijas nuo imuninio komplemento aktyvacijos ir padeda išvengti fagocitozės, o lipidas A – nuo katijoninių priešmikrobinių peptidų. Bakterijų lizės metu išlaisvintas lipidas A yra toksiškas gyvūno organizmui ir gali sukelti kraujagyslių pažeidimus^{80,118}.



Plačiausiai ištirtas *K. pneumoniae* virulentiškumo veiksnys yra jų kapsulė (**1 pav.**), sudaryta iš polisacharidų tankaus sluoksnio gaubiančio ląstelę. Jis saugo bakterijas nuo išdžiūvimo ir leidžia prisitaikyti nepalankioje aplinkoje¹¹⁹, taip pat dalyvauja bakterijų bioplėvelės ir sąlyčio su paviršiumi reguliacijoje⁸¹. Kapsulė slopina fagocitozę, priešmikrobinius organizmo peptidus (β -defensinus), komplemento sukeltą opsonizaciją ir uždegiminį atsaką^{76,79,80}. Imuninės sistemos atsako bakterijos gali išvengti mimikrijos būdu, pvz., *E. coli* K1 serotipo polisacharidai yra identiški embriono neuronų sujungimo

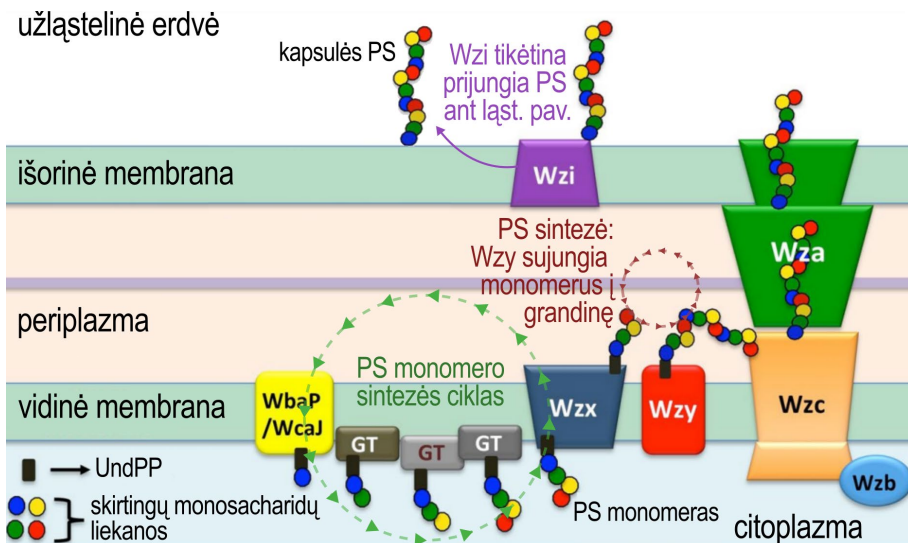
glikoproteino polisialo rūgšties polisacharidams¹²⁰. Kapsulė taip pat yra kliūtis, apsauganti bakterijas ir nuo virusų, kurie savitai atpažįsta polisacharido struktūrą. Nustatyta, kad polisacharido O-metilfosforimidato liekanos yra būtinos *Campylobacter jejuni* užkrėtimui F207 fagu, tačiau atsparumas išsivysto, kai bakterija išjungia savo metilfosforamidato transferazės geną, įvykdant poslinkio mutaciją specifinėje poliG srityje¹²¹.

Mažiau ištirtas *Klebsiella* bakterijų išorinės membranos baltymų, porinių ir transporterių poveikis virulentiškumui. Pastarieji baltymai apsaugo bakterijas nuo imuninio atsako, pašalindami į aplinką priešmikrobinius junginius, tokius kaip humoraliniai peptidai ar antibiotikai⁸⁰.

1.1.2. Kapsulės Wzx-Wzy biosintezės kelias

Bakterijų kapsulė yra sudaryta iš tirpių vandenyje polisacharidų sluoksnio, dažnai pasižyminčio silpnai rūgštinėmis savybėmis ir apgaubiančio visą ląstelės paviršių, o kai kurios *Klebsiella* spp. bakterijos gali turėti tankesnę hiperkapsulę, kuri fenotipiškai pasireiškia intensyviu bakterijų gleivėtumu. Remiantis serologinio aktyvumo tyrimais, kapsulės polisacharidai yra tradiciškai įvardijami kaip K-antigenai, atskiriant juos nuo LPS sandaroje esančių O-antigenų⁷⁶.

Klebsiella kapsulės polisacharidų sudėtis priklauso nuo kapsulės polisacharidų sintezės (*cps*) genų sankaupoje (*cluster*) esančių glikozilo transferazių genų, o biosintezės kelias priklauso nuo genų *wzx* ir *wzy* produktų – flipazės ir polimerazės (2 pav.). Žinomos ir kitos polisacharidų sintezės sistemos, kaip nuo ABC pernašos arba sintazės priklausančios, kurių dėka atitinkamai sintetinami LPS ir *Klebsiella* bakterijoms nebūdingi polisacharidai, kaip hialurono rūgštis¹²².



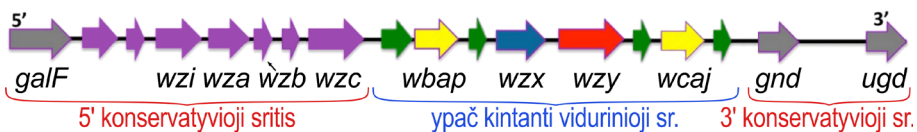
2 pav. *Klebsiella* kapsulės polisacharidų biosintezės Wzx-Wzy kelias^{87,123}.

Taigi, *Klebsiella* spp. *cps* genų sandara koduoja baltymus, atsakingus už polisacharido transporto ir biosintezės sistemas, išsidėsčiusias nuo citoplazmos iki išorinės bakterijos membranos. Citoplazmoje polisacharido sintezė prasideda nuo pirmosios gliukozės arba galaktozės liekanos prijungimo prie lipidinio inkaro (undekaprenilfosfato), atitinkamai vykdomo WcaJ (serotipuose K1, K2, K5 ir kt.) arba WbaP (K3, K9, K20 ir kt.) baltymo. Tuomet skirtingos glikozilo transferazės per sacharido redukuojantį galą papildomai prijungia atitinkamus monosacharidus ir taip susintetina pirmąjį polisacharido monomerą. Monomerai yra sintetinami pastoviai ir Wzx flipazės pernešami į periplazmą, kur jie tarpusavyje sujungiami Wzy polimerazės, ir taip vykdoma polisacharido biosintezė. Pastarojo ilgį reguliuoja Wzc, kurio aktyvumą skatina Wzb fosfatazė. Taip pat Wzc baltymas perduoda polisacharidą į Wza translokoną, kuris perkelia polisacharido grandinę ant bakterijos paviršiaus, kur jis yra prijungiamas arba išlieka sukibęs su Wzi baltymu^{79,87,116,123,124}. Ši kapsulės polisacharido sintezės sistema, apimanti keletą svarbių komponentų, potencialiai įgalina bakterijų kapsulės įvairovę, pasižyminčią skirtinga polisacharidų sudėtimi, kas priklauso nuo glikozilo transferazių fermentinio specifiškumo⁸⁶.

1.1.3. Kapsulės polisacharidų sintezės *cps* genų sandara

Klebsiella bakterijų kapsulės biosintezės genai, koduojantys baltymus, atsakingus už polisacharido sintezę, modifikavimą, reguliavimą ir pernašą, sudaro 20–30 genų *cps* sandarą. Polisacharido sandara priklauso nuo genų įvairovės *cps* srityje ir taip pat lemia *Klebsiella* bakterijų serotipą. Matoma ypač didelė *cps* įvairovė, nes egzistuoja net 81 skirtingas K-antigenas su jau nustatyta polisacharido struktūra, dažniausiai būdinga *K. pneumoniae* bakterijoms. Kita vertus, iki dabar yra žinoma tik vienuolika O-antigenų polisacharidų struktūrų^{76,86,87}.

Klebsiella spp. *cps* bioinformatinė analizė atskleidė, kad *cps* genai dažniausiai koduojami viena kryptimi ir sudaro konservatyvias 5' ir 3' galo sritis, o vidurinioji sritis pasižymi variabilumu (**3 pav.**). 5' srities pradžia siejama su *galF*, koduojančiu UTP-gliukozės-1-fosfato uridililtransferazę, kuri dalyvauja nukleotidų-sacharidų metabolizme. Tuomet yra išsidėstę *cpsACP*, *wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*, koduojantys baltymus, susijusius su transportavimo/ biosintezės reguliavimo sistema. Tik du ypač konservatyvūs *gnd* ir *ugd*, atitinkamai koduojantys 6-fosfogliukonato ir UDP-gliukozės dehidrogenazes, kurios dalyvauja sacharidų metabolizme ir kapsulės biosintezėje, yra aptinkami 3' srityje. Vidurinėje dalyje aptinkami mažiau homologiški genai, koduojantys įvairias glikozilo transferazes ar kitus kapsulės polisacharidus modifikuojančius baltymus^{86,87,125}.



3 pav. *Klebsiella pneumoniae* kapsulės polisacharidų biosintezės *cps* genų schematiškas išsidėstymas su konservatyviomis sritimis. Spalvomis pažymėti genai/ jų produktai yra: **pilka** – *cps* srities riboženkliai; **violetinė** – polisacharido reguliacijos ir pernašos dalyviai; **žalia** – įvairios glikozilo transferazės; **geltona** – *wbp* arba *wcaj*, esminės glikozilo transferazės; **mėlyna** – flipazės; **raudona** – kapsulės polisacharido polimerazės^{86,87,125}.

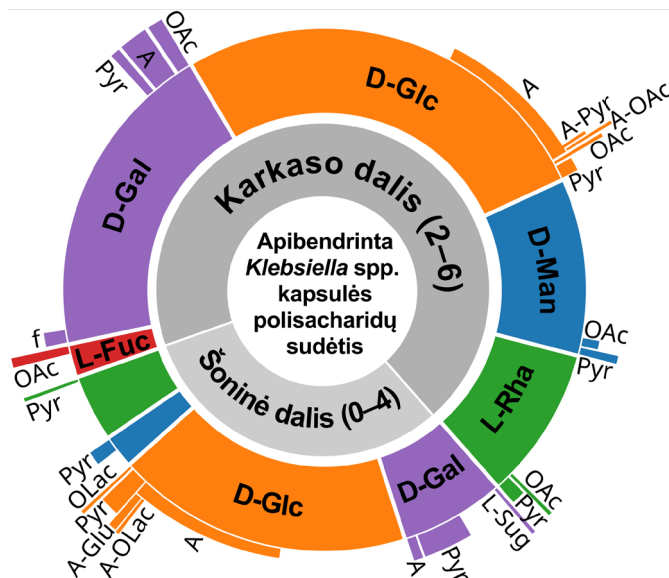
Įdomu tai, kad Wzx ir Wzy homologai išlaikė funkcionalumą tarp skirtingų K serotipų, nors turi mažą sekų panašumą, pavyzdžiui, tarp K54 ir K63 serotipų stebimas tik 26% Wzx tapatumas. Skirtumai tarp K-antigenų serotipų *cps* regionų yra matomi ir glikozilo transferazių genų egzistavimu tarp *cps* konservatyvių 5' ir 3' sričių. Genetinio segmento įterpimą dažnai žymi transpozazės genas (K4, K40, K41, K69, K207-2 serotipuose), rodantis *cps* srities evoliuciją horizontaliosios genų pernašos keliu. Transpozazės įtaka greičiausiai nulėmė geno duplikaciją K4 serotipo *cps* sankaupoje arba geno įterpimą priešinga kryptimi K40 atveju. Tai pat, K33 ir K40 serotipuose nėra *wzi*, nes galimai yra įvykusi geno iškirta (*deletion*), o K30, K36 arba KPB-1 *cps* srityse – genų įterpimas (*insertion*), nes turi papildomus fagams būdingus genus, tačiau jų koduojami produktai nėra susiję su kapsulės biosinteze^{86,88,126}. Taigi, bakterijų *cps* genų sričių genetiniai skirtumai tik parodo galimą polisacharidų įvairovę ir potencialų jų kitimo kelią, tačiau sukeltas bakterijų patogeniškumas priklauso ne vien nuo *cps* genų sudėties.

Žinoma, kad K1, K2, K20, K54 ir K57 serotipo *Klebsiella* bakterijos, kurių kapsulė pasižymi didesniu polisacharidų kiekiu, yra ypač virulentiškos¹²⁷. Sunkiausiai gydomas infekcijas sukelia K1 ir K2 tipo bakterijos, kurios gali išplisti po visą organizmą nuo infekcijos židinio. Nustatyta, kad šių serotipų virulentiškumas priklauso nuo *cps* sintezės transkripcijos veiksnio RmpA, RcsB ir Fur. Fur yra *rmpA* ir sideroforų sintezės genų represorius, kurio aktyvatorius yra geležies (III) jonai¹²⁸. Infekcijos židinyje esant jonų trūkumui, represorius tampa neveiklus ir pradeda RmpA sintezę; šis baltymas oligomerizuojasi su RcsB ir skatina *cps* genų raišką, kas lemia hipervirulentiškos kapsulės fenotipą¹²⁹. Taip pat *rmpA* yra vienas iš genetinių žymenų, kuris susijęs su *Klebsiella* K1 ir K2 sukeliamu kepenų abscesu¹³⁰. Nustatyta, kad K1 kapsulės struktūroje esančios piruvo acetalio ir acetilo grupės yra būtinos pilno polisacharido sintezei, tačiau jos taip pat aktyvuoja makrofagų sukeliamą citokinų sintezę¹³¹. Taip pat K2 tipo *K. pneumoniae* padermė ST307 (OXA-48, O2v2) yra endeminė Italijoje, PAR, Venesueloje, o šio patogeno proveržiai yra stebimi gydymo įstaigose beveik visoje Vakarų Europoje, JAV, Kinijoje ir Argentinoje¹³². Visgi, remiantis <https://pathogen.watch> duomenų bazėje pateikiama informacija,

pasaulyje labiausiai paplitę *Klebsiella* spp. serotipai su nustatytais genomais yra K64, K107 ir K106.

1.1.4. Kapsulės polisacharidų sudėtis

Kiekvienas iš 81-o žinomo *Klebsiella* spp. serotipo turi savitą polisacharido struktūrą (**4 pav.**), paprastai sudarytą iš skirtingų karkaso (2–6) ir šoninių monosacharido piranozės liekanų (0–4), o polisacharido sudėtyje daugiausiai aptinkamos yra D-gliukozės (48%), D-galaktozės (29%), D-ramnozės (21%), D-manozės (19%), o rečiausiai – L-fukozės liekanos (2%). Tik dviejuose *K. pneumoniae* K12, K14 ir viename *K. michiganensis* K41 serotipų polisachariduose yra nustatyta β-D-galaktozės furanozinė forma. Monosacharidų liekanos polisacharido grandinėje yra sujungtos per redukuojantį cukraus galą, tai reiškia, kad anomerinės anglies hidroksilo grupė pakeista kito monosacharido liekana. Įprastai, ~49% visų nustatytų *Klebsiella* kapsulės polisacharidų glikozidinių ryšių sudaro 1→4 jungtys, o rečiausiai aptinkamas glikozidinis ryšys yra 1→6, kuris būdingas šoniniams monosacharidams polisacharido grandinėje^{79,86,88,126}.



4 pav. Apibendrintas monosacharidų su įvairiomis modifikacijomis sudėties pasiskirstymas, apimantis 81 skirtingą *Klebsiella* spp. kapsulės polisacharidą: A – sacharido uroninė rūgštis; Ac – acetilo gr.; Pyr – piruvo acetalio gr.; Lac – laktilo gr.; f – sacharido furanozinė forma; Glu – 6-N-L-glutamo rūgšties liekana; L-Sug – 4-deoksi-L-treo-hekso-4-enopiranozilo uroninės rūgšties liekana. Juostų ilgiai atitinka monosacharidų (Fuc – fukozė, Gal – galaktozė, Glc – gliukozė, Man – manozė, Rha – ramnozė) ir jų modifikacijų dažnumą tarp skirtingų serotipų polisacharidų^{79,86,88,126}.

Polisacharidai dažnai turi įvairias modifikacijas, pavyzdžiui: acetilo, laktilo, ar piruvo acetalio grupes, taip pat gliukozės arba galaktozės uroninės rūgšties formas. Įdomu tai, kad tarp struktūriškai nustatytų *Klebsiella* serotipų, tik K32,

K38, K56 ir K72 polisachariduose nėra sacharido uroninės rūgšties liekanos. Laktilo grupė yra aptinkama tik K66, K22 ir K37 serotipų gliukozės arba gliukurono rūgšties liekanose. Acetilinas dažniausiai stebimas karkaso sacharidų liekanų C2 arba C6 padėtyje, o pastaroji išskirtinai būdinga tik manozės liekanoms. Paplitusi modifikacija yra piruvo acetolio grupė, aptinkama 38% *Klebsiella* K serotipų. Svarbu paminėti, kad vienintelis skirtumas tarp serotipų K30 ir K69 polisacharidų struktūrų yra ryšių išsidėstymas tarp piruvato ir galaktozės liekanų, kurie atitinkamai sujungti C3, C4 ir C6, C4 ryšiais^{79,86,88,126}.

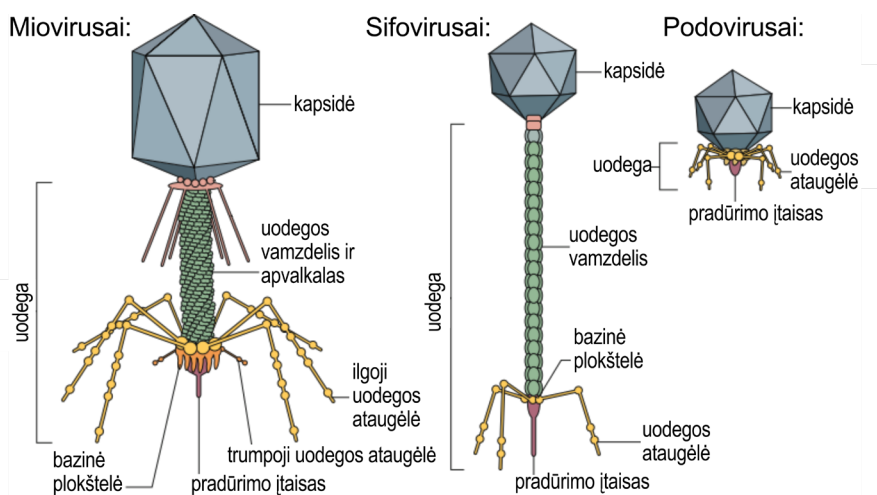
Unikaliomis struktūromis pasižymi K38 serotipo polisacharidas, kurio galaktozės liekanos C3 hidroksilo grupė pakeista 4-deoksi-treo-hekso-4-enopiranozilo uroninės rūgšties liekana, o K82 polisacharido atveju matoma gliukurono rūgšties karboksilo grupės modifikacija L-glutamino rūgštimi^{79,86,88,126}.

1.2. Bakteriofagai ir jų savybės

Bakteriofagai yra vieni iš labiausiai paplitusių virusų, infekuojančių bakterijas, Žemės planetoje. Apytiksliai skaičiuojama, kad bakterijų ir archėjų ląstelių skaičius atviruose vandenynuose, dirvožemyje, vandenynų nuosėdose ir antžeminiuose paviršiuose atitinkamai yra $1,2 \cdot 10^{29}$, $2,6 \cdot 10^{29}$, $3,5 \cdot 10^{30}$ ir $0,25 - 2,5 \cdot 10^{30}$, tačiau bakteriofagų yra bent dešimčia kartų daugiau. Fagai per parą sumažina 20–40% vandenynų bakterijų populiacijos, kas rodo fagų svarbą palaikant biologinę įvairovę ir reikšmę anglies kiekiui aplinkoje^{8,133}.

Bakteriofagai turi DNR arba RNR genomą, kurio dydis įprastai yra 18–180 kbp, sudarytas iš 20–300 genų ir tankiai supakuotas (>5 atm vidinis slėgis) į 45–120 nm dydžio kapsidę^{18,134}. Jų genomai neturi konservatyvaus geno ar NR srities (bakterijų atveju tai yra S16 rRNR), pagal kurią būtų galima skirstyti šiuos virusus į atskiras rūšis, todėl ilgą laiką bakteriofagai buvo klasifikuojami pagal jų uodegos pagrindinius skirtumus. Bakteriofagai, fenotipiškai išsiskiriantys ikosaedro formos kapside, prie kurios yra prijungta morfologiškai daugiau ar mažiau išreikšta uodega, buvo priskiriami uodeguotųjų fagų (*Caudovirales*) eilei. Pastarieji fagai sudarė $>96\%$ visų atrastų bakteriofagų ir apėmė tris dideles šeimas: *Siphoviridae*, *Podoviridae* ir *Myoviridae*. Likę, neuodeguotieji, sudarė $<4\%$ ir buvo įvardijami kaip daugiasieniai (*polyhedral*), gijiniai (*filamentous*) arba neapibrėžtos struktūros (*pleomorphic*) fagai¹³⁵.

Ankstesnis fagų skirstymas vis dar yra naudojamas siekiant pabrėžti jų morfologinius skirtumus, taip suskirstant juos į atitinkamus tipus, vadinamus morfotipus (**5 pav.**). Miotipo fagai (miovirusai) turi ilgą, susitraukiančią ir tvirtą uodegą, skirtingai nei sifotipo virusai (sifovirusai), kurių uodega yra nesusitraukianti ir lanksti, o itin trumpa uodega būdinga podotipo virusams (podovirusams). Uodegos gale yra adsorbcijos kompleksas, nuo kurio priklauso sėkminga bakteriofago infekcija^{135,136}.



5 pav. Skirtumai tarp bakteriofagų morfotipų¹³⁶.

Vis dėlto, augant atrastų virusų duomenų bazėms ir tobulėjant genomų analizės metodams, ankstesnė trijų šeimų nomenklatūra buvo panaikinta ir ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) patvirtinta *Caudoviricetes* klasė, kurią sudaro bakterijų ir archėjų virusai, turintys uodegą ir ikosaedro formos kapsidę, kurioje yra dvigrandės DNR genomas. *Caudoviricetes* klasę sudaro 22 bakteriofagų šeimos ir 30 pošeimių, o klasifikacija yra pagrįsta ortologinių genų skaičiumi ir bendru sekų persidengimu tarp virusų genomų¹³⁷.

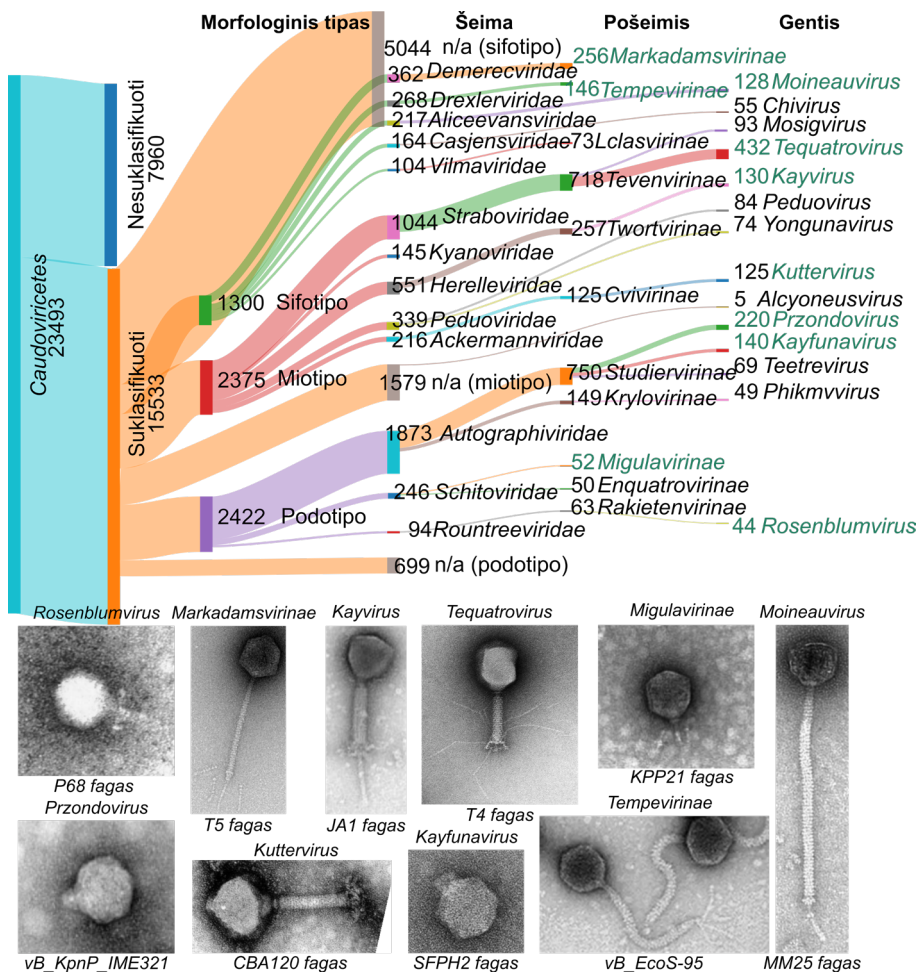
1.2.1. Adsorbcijos kompleksų įvairovė

Priešingai nei bakteriofagų kapsidės ar uodegos vamzdelio struktūros, fagų adsorbcijos kompleksai pasižymi didele struktūrine įvairove, o ypač mažai ištirti sudėtingas prisitvirtinimo struktūras turinčių bakteriofagų adsorbcijos kompleksai. Kita vertus, fagų adsorbcijos komplekse aptinkama įvairūs mokslininkus dominantys baltymai, kaip: fermentai, gebantys skaidyti įvairius polimerus ar lizuoti bakterijas¹³⁸; struktūriniai baltymai, palaikantys bendrą adsorbcijos komplekso struktūrą ar suteikiantys jai lankstumą^{139–141}; adhezina, atpažįstantys ir prijungiantys bakterijos išorinius komponentus¹⁴².

Adsorbcijos komplekso pagrindas, aptinkamas sifo- ir miovirusų uodegos vamzdelio gale, yra bazinė plokštelė, kuri dažnai aiškiai matoma TEM mikrofotografijose, ir kurios nėra podovirusuose. Bazinę plokštelę sudaro struktūriniai baltymai, prie kurių prisijungus baltymams, atsakingiems už bakterijos atpažinimą, suformuojamas viruso adsorbcijos kompleksas. Įprastai bazinė plokštelė sudaro šeštos eilės sukimo simetrijos struktūrą. Ji susirenka prie uodegos distalinio baltymo, prie kurio taip pat prisijungia pradūrimo įtaisas¹⁴³, atsakingas už angos formavimą bakterijos plazminėje membranoje infekcijos metu. Tuo tarpu podovirusų adsorbcijos kompleksas yra daug paprastesnis: bakterijas

atpažįstantys baltymai tiesiogiai prisijungia prie kapsidės heksamerinio portalo baltymo^{47–50}.

Atsižvelgiant į bakteriofagų morfologinius tipus ir dabartinę taksonomiją, maždaug trečdalis iš 23,5 tūkstančių atrastų fagų vis dar yra nesuklasifikuoti (6 pav.)



6 pav. Nustatytų *Caudoviricetes* bakteriofagų pasiskirstymas pagal morfotipus į didžiausias šeimas, pošeimius ir gentis. Žalia spalva pažymėti apačioje pateikti atitinkamos šeimos, pošeimio ar genties atstovai; n/a – nepriskirti jokiai šeimai, tačiau atitinkamo morfotipo suklasifikuoti bakteriofagai^{54,144–152}.

Dauguma suklasifikuotų fagų priskiriami sifovirusams, tačiau iš jų 80% nėra priskirti jokiai šeimai, tačiau jų didžiausią pošeimį sudaro T5 bakteriofagai giminingi virusai su jiems savita adsorbcijos komplekso morfologija: uodegos gale yra trys L-formos ilgosios ataugėlės ir ilgas (≈ 90 nm) pradūrimo įtaisas. Iš dalies podotipo fagai turi daugiausiai suklasifikuotų virusų ir didžiausią iš visų

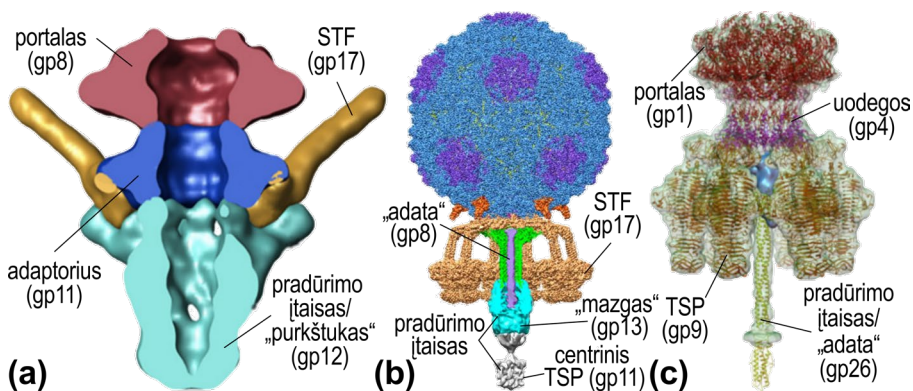
trijų tipų su beveik 1 900 bakteriofagų šeimą *Autographiviridae*. Šioje šeimoje taip pat yra visų didžiausias pošeimis *Studiervirinae*, kuris išsišakoja į daug atstovų turinčias gentis *Przondovirus* ir *Kayfunavirus*, kurių adsorbcijos kompleksas yra itin primityvus, lyginant su kitų podovirusų gentimis kaip *Rosenblumvirus* ar *Migulavirinae*. Tuo tarpu visų didžiausia gentis yra *Tequatrovirus*, priklausanti miotipo bakteriofagams, kuriems būdinga T4 adsorbcijos komplekso morfologija^{54,144–152}.

Didelė bakteriofagų adsorbcijos kompleksų įvairovė rodo jų evoliucinę adaptaciją prie bakterijų-šeimininkų. Kadangi esminės šio komplekso funkcijos yra bakteriofago pritvirtinimas prie bakterijos paviršiaus ir infekcijos pradėjimas, fagai naudoja skirtingas prisijungimo strategijas priklausomai nuo išorinių bakterijos savybių. Už fago adsorbciją ant bakterinės ląstelės yra atsakingi receptorių prijungiantys/ atpažįstantys baltymai (RBP), kurių genetiniai pokyčiai turi didelę įtaką fagų evoliucinei atrankai. Fago adsorbcija gali vykti vieno arba dviejų baltymų (dvikomponentinės) sąveikos metu. Bakterijose, turinčiose peptidoglikano sienelę (gram-teigiamose) arba kapsulę (gram-neigiamose), pirminė, grįžtamoji, sąveika dažniausiai vyksta naudojant polimerą skaidančius baltymus, o antrinė, negrįžtamoji, – paviršiaus baltymus. Nustatyta išimčių, kai atpažįstami kiti polimerai ar tas pats RBP pasižymi keliomis funkcijomis, o tai paprastai būdingų podovirusams. Vieno arba dviejų baltymų sukeltas užkrėtimas yra nustatytas ir bakterijose, kurios neturi kapsulės ir sienelės^{153–156}.

1.2.1.1. Podovirusų adsorbcijos kompleksai

Podovirusai neturi ilgos uodegos, išreikštos bazinės plokštelės, ar ilgųjų uodegos ataugėlių. Kita vertus, mažas adsorbcijos kompleksas yra pakankamas vykdyti infekciją, kurios metu išorinis bakterijos sluoksnis yra degraduojamas ir suformuojamas tunelis iki bakterijos paviršiaus – plazminės membranos, pro kurią suleidžiamas viruso genomas į ląstelės vidų. Tam tikslui, plazminėje membranoje fago pradūrimo įtaisas padaro angą, kuri gram-neigiamų bakterijų atveju yra sudaryta iš abiejų, išorinės ir vidinės, tarpusavyje sulietų membranų. Taip pat savo genomo patekimui į vidų, podovirusai panaudoja bakterijų transmembraninius baltymus – transporterius ar porinus^{47,65}.

Pavyzdžiui, *Studiervirinae* bakteriofagas T7, užkrečiantis *E. coli* turi ganėtinai paprastą adsorbcijos kompleksą (**7 a pav.**), sudarytą tik iš kelių skirtingų baltymų. Virusų uodega susirenka, prisijungiant kapsidės adaptorinį baltymą (gp11), kuris formuoja žiedą ir prie kurio prisijungia šešiamerinis „purškutukas“ (*nozzle*; gp12). Abiejų baltymų kompleksas sudaro bendrą paviršiaus sritį prie kurios įsitvirtina šešios trimerinės trumposios uodegos ataugėlės (STF; gp17)⁴⁷.



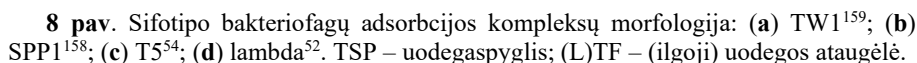
7 pav. Podotipo bakteriofagų adsorbcijos kompleksų morfologija: **(a)** T7⁴⁷; **(b)** P68⁵¹; **(c)** P22¹⁵⁷. TSP – uodegaspyglis; STF – trumpoji uodegos ataugėlė.

Staphylococcus aureus bakteriofagas P68 (*Rosenblumvirus*) turi gerai išreikštą pradūrimo įtaisą (**7 b pav.**), sudarytą iš uodegos „mazgo“ (*knob*, gp13), uodegaspygliaus (TSP; gp11) ir „adatos“ (*needle*, gp8) baltymų, o STF įsitvirtina tarp uodegos ir kapsidės baltymų⁵¹. *Salmonella typhimurium* bakteriofagas P22, priklausantis *Lederbergvirus* genčiai, turi iš vieno „adatos“ baltymo (gp26) sudarytą pradūrimo įtaisą (**7 c pav.**), prijungtą prie uodegos (gp4 ir gp1) tarp kurių prisijungia šeši TSP (gp9)^{65,157}.

1.2.1.2. Sifovirusų adsorbcijos kompleksai

Sifovirusų adsorbcijos kompleksuose paprastai yra nedidelė bazinė plokštelė ir gali būti aptinkamos ilgosios ar trumposios uodegos ataugėlės, uodegaspygliai ir kiti struktūrą palaikantys baltymai. Adsorbcijos metu, sąveika su bakterija sukelia bakteriofago uodegos konformacinius pokyčius – uodegos vamzdelis praplatėja ir susidaro sąlygos genomui iš kapsidės patekti į ląstelės vidų^{52,54,158,159}.

Pavyzdžiui, jūrinio sifoviruso *Pseudoalteromonas phenolica* TW1 (neklasifikuotas) adsorbcijos kompleksas turi pradūrimo įtaisą (**8 a pav.**), sudarytą iš kūginę struktūrą formuojančių baltymų (gp16/18), o jo išoriniame gale yra peptidoglikano hidrolazei homologiškas gp27 lizocimas, kuris sukuria angą infekcijos metu. Pradūrimo įtaisas įsitvirtina prie uodegos vamzdelio per jos distalinį baltymą (gp15), kuris taip pat prijungia ir TSP (gp19)¹⁵⁹.



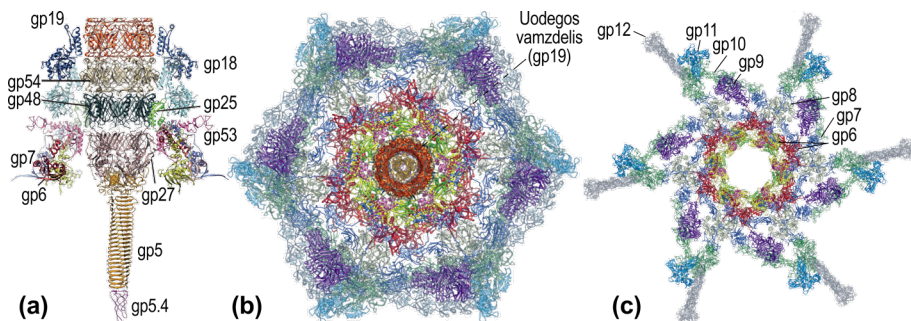
Vienas detaliai ištirtų adsorbcijos kompleksų yra *E. coli* viruso T5 (*Markadamsvirinae*), kuris turi L-formos uodegos ataugėlės (**8 c pav.**), sudarytas iš pb1 ir p132, o pastarasis baltymas virš distalinio uodegos baltymo (pb9) apgaubia bazinės plokštelės uodegos vamzdelį (p140, mažasis uodegos baltymas). Prieš sąveiką, pradūrimo įtaisas (**1P a pav.**) yra sudarytas iš bazinės plokštelės „įvorės“ (*hub*; pb3) ir tiesiosios ataugėlės (pb4), pasibaigiančios RBP (pb5), ir yra nelanksčioje konformacijoje. Įvykus sąveikai su bakterijos paviršiaus baltymu FhuA pradūrimo įtaisas yra „išnarinamas“ per pb4 ir tampa lankstus, kas sudaro sąlygas artimesniam viruso kontaktui su bakterija. Po sąveikos su bakterija, uodegos ilgio matavimo baltymo (pb2) dalis (pb2C) atsiskyla ir sukuria angą, pro kurią T5 genomai patenka į bakteriją^{53,54}.

1.2.1.3. *Miovirusų adsorbcijos kompleksai*

26

baltymų, kurie nulemia uodegos susitraukimą infekcijos metu ir bakterija praduriama vamzdeliu. Tikslinga bakteriofago adsorbcija dažnai priklauso nuo dviejų komponentų sistemos: grįžtamos ir negrįžtamos sąveikos, kurias atitinkamai nulemia LTF ir STF^{21,48,161}.

Klasikinis *Straboviridae* šeimos bakteriofagas, turintis pilnai nustatytą struktūrą, yra *E. coli* infekuojantis virusas T4. Šiame fage yra kompleksiškas pradūrimo įtaisas (**9 a pav.**), prijungtas uodegos gale, o jo išorėje – baltymas lizocimas (gp5.4), skaidantis peptidoglikano sluoksnį. Aplink pradūrimo įtaiso pagrindą formuojama kupolo formos šešianarė bazinė plokštelė (**9 b pav.**). Į pastarosios sudėtį įeina šešios pleištinės (*wedge*) struktūros, sudarytos iš keturių skirtingų baltymų (gp7+gp10←gp8←gp6), o šių STF (gp12) kompleksas su gp11 jungiasi prie gp10. Tuomet bazinėje plokštelėje prisijungia gp9, sąveikaujantis su šešiomis LTF (gp34–37). Susiformavusi struktūra prijungia distalinius uodegos baltymus (gp48, gp54), kurie įgalina bakteriofago uodegos polimerizaciją^{50,161,162}.



9 pav. T4 miotipo bakteriofago adsorbcijos komplekso sudėtis ir morfologiniai pokyčiai: **(a)** pradūrimo įtaiso sandara; **(b)** šešianarė bazinė plokštelė; **(c)** „žvaigždės“ formos adsorbcijos kompleksas, susidaręs po sąveikos su bakterija⁵⁵.

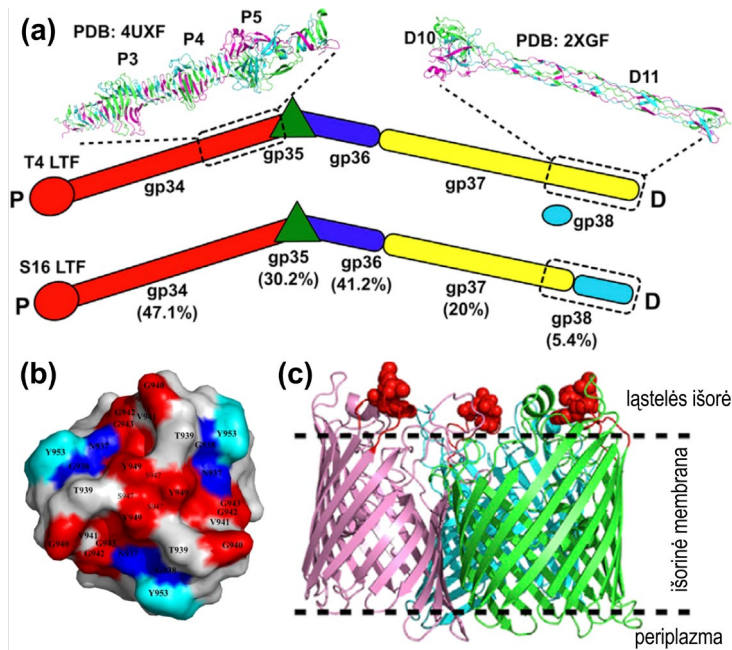
T4 prie bakterijos pirmiausia jungiasi grįžtamąja sąveika per LTF galiukus, kas glaudžiai priartina viriono uodegos galą prie bakterijos paviršiaus. Pastaroji sąveika lemia STF atsilenkimą, kurios gali nekludomai ir negrįžtamai adsorbuoti fagą ant bakterinės ląstelės. Sąveikos sužadintas konformacinis signalas, palaipsniui lemia bakteriofago konformacinius pokyčius: bazinės plokštelės kupolo forma pasikeičia į „žvaigždės“ (**9 c pav.**); uodega susitraukia ir praplatėja; uodegos vamzdelis „įsriegiamas“ į bakterijos vidų; kapsidėje esantis genomus pro fago uodegos vamzdelį patenka į ląstelę^{50,161,162}.

1.2.2. Bakteriofagų prisijungimo ir atpažinimo baltymai

1.2.2.1. Ilgosios uodegos ataugėlės

Įprastai bakteriofagų ilgosios uodegos ataugėlės (LTF, *long tail fibres*) yra plonos, labilios ir pluoštinės nanostruktūros, sudarytos iš daugiau nei vieno baltymo, grįžtamai sąveikaujančios su bakterijos paviršiaus komponentais ir

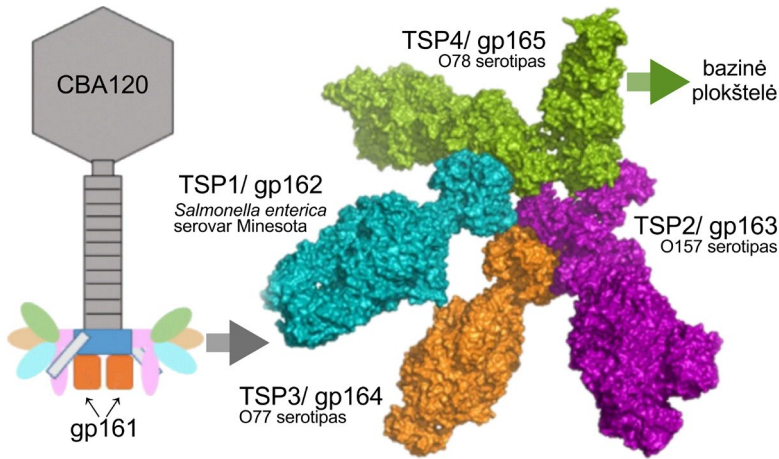
inicijuojančios pradinę viruso adsorbciją¹⁶³. T4 bakteriofago LTF sąveikauja su *E. coli* LPS ir išorinės membranos porinu OmpC. LTF sudarytos iš nuosekliai susijungusių gp34–37 baltymų: homotrimeras gp34 prijungia LTF prie viriono; monomerinis gp35 suteikia struktūrai lankstumo; homotrimerai gp36 ir gp37 formuoja keletą mazginių domenų, o gp37 suformuoja „smeigtuko“ struktūrą, atsakingą už sąveiką su LPS/ OmpC (**10 a pav.**). Įdomu tai, kad gp37 sąveikos paviršiuje yra atskiros ir bendra atpažinimo sritys (**10 b pav.**), atsakingos už asociaciją su OmpC arba LPS^{94,139,164}.



10 pav. LTF struktūra ir ypatybės: (a) viršutinėje dalyje pateikta T4 viruso nustatytos struktūros, apatinėje – struktūrinės baltymų organizacijos palyginimas tarp T4 ir S16 virusų LTF, procentai žymi S16 ir T4 virusų homologinių baltymų panašumą¹⁶⁴; (b) T4 gp37 baltymo C-galinės dalies, atsakingos už sąveikas su LPS arba OmpC, paviršiaus išsidėstymas. Sąveikos pažymėtos spalvomis: mėlyna – su LPS, žydra – su OmpC, raudona – su LPS ir OmpC¹³⁹; (c) trimerinio OmpC struktūra (atskiri subvienetai pažymėti žydra, rožine ir žalia spalvomis) ir jo trys kilpos (19 aa, raudona spalva), kurias atpažįsta S16 LTF¹⁶⁴.

Panaši struktūrinė baltymų organizacija matoma ir *Salmonella* fago S16 LTF, tačiau ataugėlės gale yra papildomas baltymas gp38, kuris atsakingas už grįžtamąją sąveiką su LPS ir porinu OmpC. LTF sąveika vyksta per tris porino peptidines kilpas, esančias bakterijos paviršiuje (**10 c pav.**). Kita vertus, T4 fago gp38 nesudaro LTF, bet jis veikia kaip šaperonas, susukantis gp37 į natyvią struktūrą¹⁶⁴. Svarbu paminėti, kad naujai susiformavę bakteriofagai prieš pasklisdami po aplinką, turi kompaktiškai prigludusias LTF išilgai viruso uode-

gos vamzdelio, kas papildomai apsaugo bakteriofagą nuo klaidingos infekcijos pradžios¹⁶³.



11 pav. CBA120 bakteriofago šakotoji uodegos ataugėlė, susirenkanti per N galo domenų iš keturių TSP baltymų²¹.

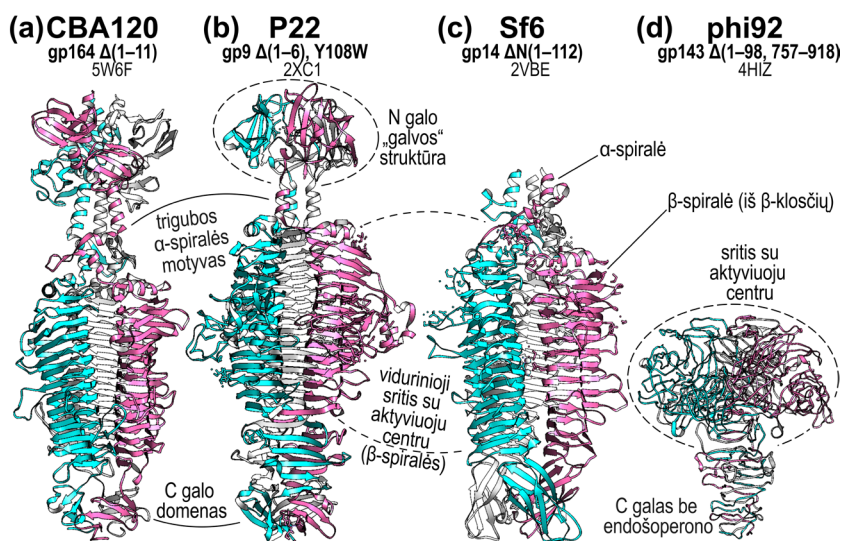
Taip pat bakteriofagai gali turėti šakotąsias ilgąsias uodegos ataugėles, kas yra matoma *Ackermannviridae* šeimos fago CBA120 (**11 pav.**), infekuojančio *E. coli*, struktūroje. Atskirai jos yra sudarytos iš keturių TSP baltymų, TSP1–4 (gp162–165), kurių N galuose yra tandeminiai ir į T4 gp10 panašūs prisijungimo domenai, tačiau pastarieji yra nustatyti tik TSP2 ir TSP4. Baltymas TSP4 jungiasi prie CBA120 fago uodegos galo ir veikia kaip platforma TSP1 ir TSP2 prijungimui, atitinkamai, TSP3 jungiasi prie TSP2^{21,141}.

1.2.2.2. Bakteriofagų uodegaspygliai

Savo struktūra trumpesni ir platesni už bakteriofagų ataugėles baltymai yra uodegaspygliai (TSP, *tail spike protein*), kurie taip pat yra atsakingi už bakterijų atpažinimą ir įprastai pasižymi fermentiniu aktyvumu. Iš esmės literatūroje visi nedideli ir išsikišę fago paviršiaus baltymai, turintys depolimerazinį aktyvumą, nepriklausomai nuo jų struktūrinės padėties fage, yra įvardijami kaip TSP. Įdomu tai, kad kai kuriuose faguose (CBA120) iš jų yra formuojamos ilgosios šakotosios uodegos ataugėlės. Panašiomis funkcijomis pasižymintiems TSP dažnai būdinga ir panaši struktūrinė organizacija. Pvz., atskiri TSP baltymų, atpažįstančių heksozės O ir K-antigenus, subvienetai formuoja bendrą, trumpą (≈ 180 Å), *amfora* ašotį primenančią trimerinę struktūrą (**12 a–c pav.**). Jos N gale yra „galva“, sudaryta iš β -sumuštinių arba β -suktinių (β -rolls) formuojamų domenų, kurie neretai atskiriami α -spiralėmis ir yra atsakingi už baltymo-baltymo sąveiką ir (arba) jungimąsi prie bazinės plokštelės. Dažnai „galvos“ struktūra per trigubą α -spiralės motyvą būna atskirta nuo likusios baltymo dalies. Šioje dalyje yra vidurinioji baltymo sritis, sudaryta iš tvarkingai asocijavusių β -spiralių, atskirai suformuotų iš β -klosčių ir turinti depolimerazės

katalitinį centrą arba papildomus angliavandenius prijungiančius modulius (CBM). TSP baltymui svarbi trimerizacija, kadangi aktyvusis centras yra baltymo ertmėje ir neretai gali būti sudarytas iš skirtingų subvienetų. Trimerizaciją ir taisyklingą baltymo susisukimą skatina iš β -sumuštinių suformuotas baltymo C galas, kuriame taip pat gali būti aptinkami CBM. Žinoma, kad TSP C-galinis domenas papildomai gali padėti vykdyti fago adsorbciją. Taip pat, keletos skirtingo tipo TSP baltymų turėjimas įprastai nulemia bakteriofago daugiavalentiškumą – gebėjimą infekuoti daugiau nei vieno tipo ar rūšies bakterijas^{21,23,169,35,37,136,141,165–168}.

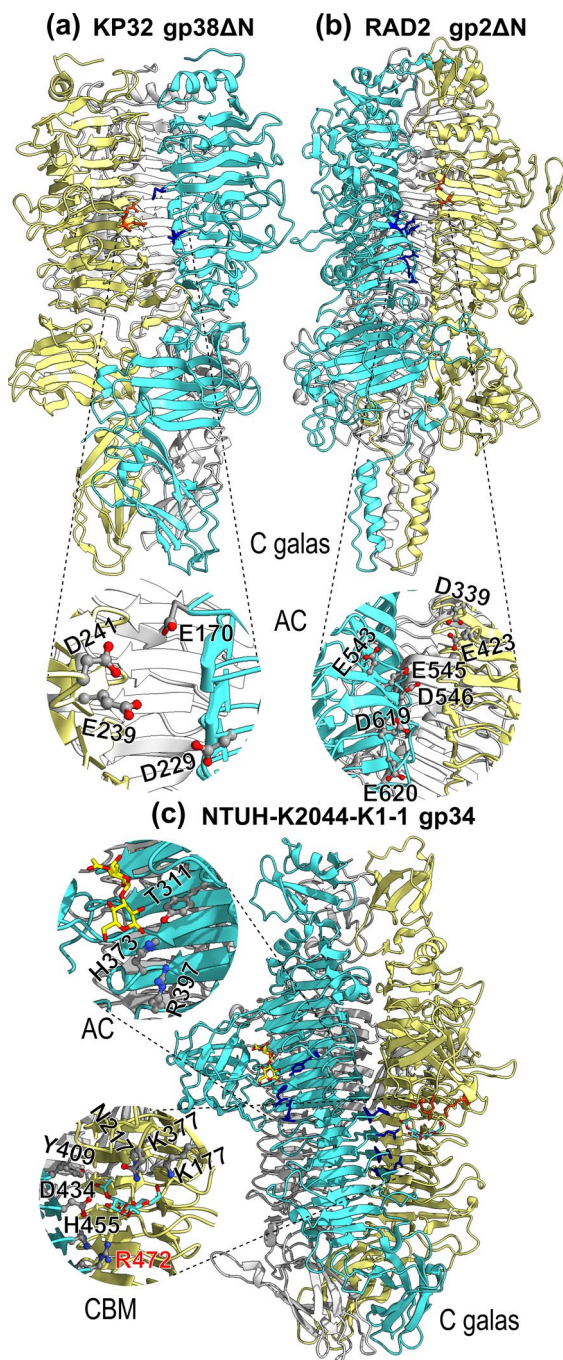
Tuo tarpu sialo rūgšties K-antigenus atpažįstantys TSP bendrai formuoja „grybo“ struktūrą (**12 d pav.**), sudarytą iš trijų persipynusių monomerų su dar nežinomos struktūros N galo dalimi. Atskiri polipeptidai persipina į „sraigto“ sritį su aktyviuoju centru, o C gale, sudarytame iš persipynusios trigubosios β -spirālės, dažniausiai būna vidumolekulinio šaperono domenas (endošaperonas), kuris yra proteolitiškai nuskeliamas taip suformuojant galutinę baltymo struktūrą^{22,170}.



12 pav. TSP baltymų struktūros: (a) CBA120 TSP3/ gp164²¹; (b) P22 gp9⁶⁵; (c) Sf6 gp14 be N-galinės srities¹⁶⁸; (d) phi92 gp143 be N-galinės srities ir C-galinio endošaperono²². Rožinė, žydra, ir pilka spalvos žymi skirtingus polipeptidus, o keturių simbolių kodas – struktūros identifikacijos numerį RCSB PDB duomenų bazėje.

Klebsiella spp. infekuojančių fagų KP32¹⁶⁹ su NTUH-K2044-K1-1³⁸ (*Autographiviridae*) ir RAD2¹⁶⁵ (*Drexelvriidae*) TSP taip pat išlaiko *amforos* struktūrą su viduriniąja sritimi, sudaryta iš β -spiralių (**13 pav.**). Kita vertus, baltymai pasižymi ir struktūriniais skirtumais, kaip aktyviojo centro išsidėstymas (**13 a, b pav.**), kuris RAD2 gp2/DpK2 ir KP32 gp38 baltymuose yra sudarytas iš skirtingų subvienetų, neigiamai įkrautoje ertmėje^{165,169}. Tuo tarpu

fago NTUH-K2044-K1-1 gp34 yra teigiamai įkrautas, tame pačiame subvienete (**13 c pav.**)³⁸. Fermentiniam aktyvumui yra ypač reikšmingos asparto ir glutamo rūgščių liekanos KP32¹⁶⁹ ir RAD2¹⁶⁵ depolimerazėms (**13 a, b pav.**), o NTUH-K2044-K1-1 gp34 (**13 c pav.**) – tirozino, histidino ir arginino³⁸.



13 pav. Virusų KP32, RAD2 ir NTUH-K2044-K1-1 atitinkamų jų TSP baltymų, gp38 (6TKU), gp2 (7LZJ) ir gp34 (7W1E), struktūrų palyginimas: (a) gp38ΔN 1,8 Å raiškos rentgeno kristalografijos būdu nustatyta struktūra¹⁶⁹; (b) gp2ΔN krio-elektroninės mikroskopijos 2,7–5,4 Å raiškos atkurta struktūra¹⁶⁵; (c) gp34 baltymo 1,95 Å raiškos rentgeno kristalografijos metodu nustatyta struktūra³⁸. Geltona, žydra ir pilka žymi atskirus polipeptidus, o raudona ir mėlyna – aminorūgštis, esančias aktyviajame centre (AC), tarp skirtingų subvienetų. AC ir angliavandenius prijungiančio modulio (CBM) išsidėsinimas su pažymėtomis aminorūgštimis. Geltona arba žydra žymi produkto buvimą AC arba CBM srityje. Raudona R472, esanti CBM srityje, yra svarbi katalizės reguliacijoje.

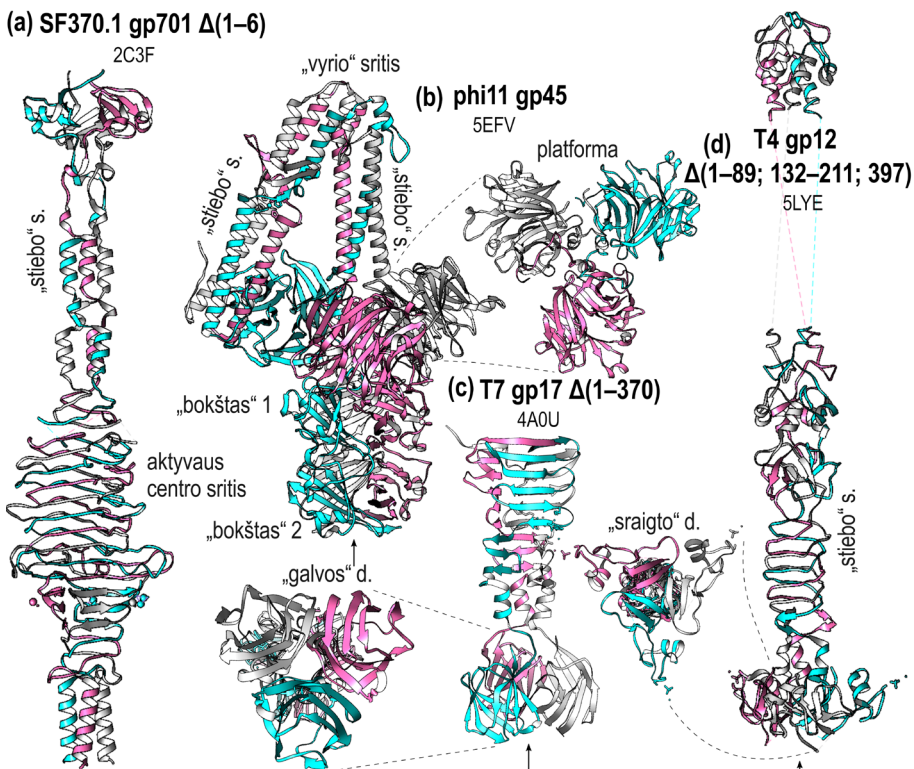
Tarp NTUH-K2044-K1-1 gp34 subvienetų yra CBM, kuris nevykdo katalizės, tačiau veikia kaip alosterinio slopinimo sritis ir skatina viruso adsorbciją, nes modulyje esančios R472 išveiklinimas alanino pakaita nulėmė, kad susidaręs produktas neslopino depolimerazės gp34 aktyvumo, tačiau susilpnėjo fago adsorbcija. Pastaroji sritis yra už neįprasto „jojiko“ domeno (**13 c pav.**), kuris taip pat uždengia gretimai esantį subvienetą³⁸. Savitas struktūrinis motyvas yra ir RAD2 baltymo gp2/DpK2 N gale (nėra pateikta), kuris sudarytas iš trigubos α -spiralinės pluošto, kurio funkcija nėra žinoma¹⁶⁵. O gp38 unikalumas pasireiškia tuo, kad jis prisijungęs kitą TSP (gp37) suformuoja šakotą struktūrą^{38,165,169}.

Neseniai nustatyta kito *K. pneumoniae* K2 serotipo bakteriofago K2-2 depolimerazės struktūra ir ištirtos baltymo gp58 oligomerizacijos savybės ir aktyvaus centro sudėtis. Nustatyta, kad trimerei susiformuoti itin svarbios aminorūgščių liekanos Tyr435 ir Lys552, kurios formuoja tarpsubvienetinius vandenilinius ryšius, o Ser424 ir Asp515 – papildomai formuoja H-ryšius ir subvieneto viduje. Išveiklinimas alaninu parodė, kad Asp515 pakaita nulemia beveik visišką oligomerizacijos nuslopinimą, o Ser424 – tik dalinai. Įdomu tai, kad Asp515 mutantas dalinai formuoja dimerus, kurie išlaiko tarpsubvienetinį aktyvųjų centrą, sudarytą iš katalitinių Glu267 ir Glu323 liekanų, dėl ko išlieka ir dalinis depolimerazės aktyvumas⁴².

1.2.2.3. *Trumposios uodegos ataugėlės*

Mokslinėje literatūroje, nepaisant funkcinių ir struktūrinių skirtumų, trumposios uodegos ataugėlės (STF, *short tail fibres*) ir TSP neretai įvardijami kaip uodegos ataugėlės (TF, *tail fibres*). STF gali būti bent iki dviejų kartų ilgesnės ir siauresnės nei TSP ir dažniausiai sudarytos iš tarpusavyje „susipynusių“ trijų homomerų. Struktūrą gali sudaryti kelios dalys, kaip: „stiebo“ sritis, sudaryta iš α -spiralių arba β -klosčių, kurioje yra aptinkamas struktūrai lankstumo suteikiantis „vyrių“ domenas; „sraigto“/ „galvos“ domenai, atsakingi už sąveiką su bakterijos paviršiaus komponentais; „bokšto“ struktūros (**14 pav.**), sudarytos iš β -klosčių^{142,171–176}.

Nors yra sunku visas STF apibrėžti apibūdinančia bendra struktūra, tačiau savybės, kaip STF prisijungimas prie bazinės plokštelės per N galą ir C galo domenų sąveika su išoriniais ląstelės polimerais, yra iš esmės išlikusios tarp skirtingų STF^{176,178}. Susiduriama ir su neįprastomis STF savybėmis, kaip fermentinis aktyvumas nustatytas *Streptococcus* profago SF370.1 ataugėlės gp701 baltyme (**14 a pav.**). Įdomu tai, kad gp701 aktyvusis centras yra sudarytas iš β -klosčių, susipynusių tarp subvienetų, skirtingai nei tipiniuose TSP¹⁷⁷.



14 pav. STF ir jų struktūrinės savybės: (a) *Streptococcus* profago SF370.1 gp701/HylP¹⁷⁷; (b) phi11 sulenktos konformacijos gp45¹⁷⁵; (c) T7 gp17 C galas¹⁷⁶; (d) T4 atlenktos konformacijos gp12^{142,172}. Rodyklės nurodo iškeltų „sraigto“ ir „galvos“ domenų stebėjimo kryptį. Rožinė, žydra ir pilka spalvos žymi skirtingus polipeptidus, o keturių simbolių kodas – struktūros identifikacijos numerį RCSB PDB duomenų bazėje.

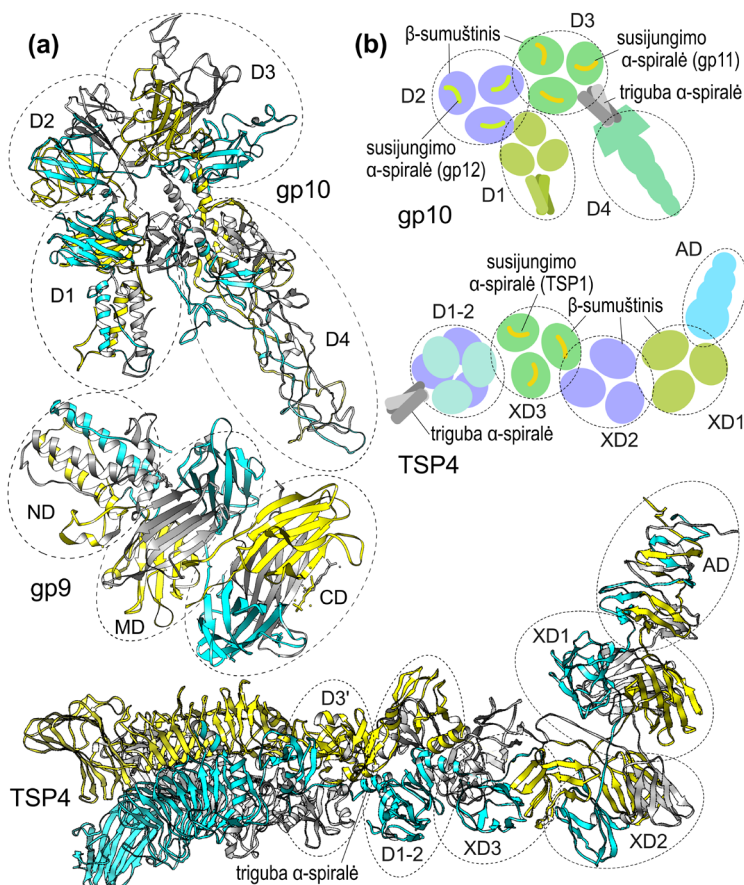
STF sąveikos su bakterija sritys įprastai yra paslėptos bakteriofago bazinės plokštelės viduje, sulenktose konformacijoje (**14 b pav.**). Grįžtamoji sąveika lemia STF konformacinius pokyčius, kurių metu STF atsilenkia ir vykdo negrįžtamą sąveiką, nulemiančią fago genomo patekimą į bakteriją^{140,175,179}. Nors STF C galo sritis išlaiko sąveikos su bakterija funkciją, tačiau gali skirtis ir formuoti „sraigto“ ar „galvos“ struktūras (**14 c, d pav.**), kurios yra matomos T7 ir T4 faguose^{142,172,176}.

Bakteriofagų TSP, terminalinis LTF baltymas ar STF, kurie yra atsakingi už viruso adsorbciją ir infekcijos iniciaciją, dar kitaip įvardijami kaip receptorių atpažįstantys baltymai (RBP, *receptor binding proteins*), o iš jų pasižymintys giminingumo sąveika akcentuojami kaip adhezinais^{178,180}.

1.2.3. Adsorbcijos komplekso baltymų prisijungimo domenai

T4 bakteriofago adsorbcijos komplekso susirinkimo metu STF ir LTF prisijungia per tarpinius baltymus gp9 ir gp10, esančius bazinės plokštelės sudėtyje. Tuo tarpu šakotąsias LTF turinčiuose faguose yra nustatytos tik tarpiniam

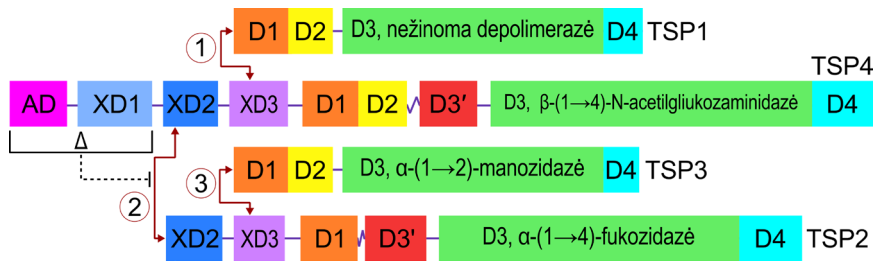
baltymams homologiškos sritys, esančios TSP N-galinėse „galvų“ struktūrose ir atsakingos už baltymo-baltymo sąveikas. Taigi, T4 bakteriofago gp10 prie bazinės plokštelės prisijungia per D1 ir D4 domenus, o D3 ir D2 atskirai prijungia gp11 ir gp12 (STF) per jų tris N-galines α -spirales (**15 pav.**). T4 trimerinis gp9 N-galiniu domenu jungiasi prie bazinės plokštelės, o sudarytu iš antiparalelios β -statinaitės C-galiniu – prie LTF gp34^{141,179,181}.



15 pav. T4 gp10 (5IV5), gp9 (1S2E) ir CBA120 TSP4 (n/a) nustatytos struktūros ir T4 gp10 grafinis palyginimas su CBA120 TSP4 N galu^{141,179,181}. Geltona, žydra ir pilka spalvomis pažymėti atskiri polipeptidai: (a) ND, CD, MD yra atitinkamai N-/ C-galiniai ir vidurinysis domenai; (b) Skirtingomis spalvomis išskirti atskiri domenai, sudaryti iš trigubų β -sumuštinių.

Bakteriofago CBA120, turinčio šakotąsias LTF, kurių baltymų TSP2 ir TSP4 N galuose yra nustatyti į T4 gp9 arba gp10 panašūs domenai (**15 a, b pav.**), atitinkamai žymimi kaip: XD1 (homologiškumas gp9 MD didesnis nei gp10 D1), XD2 (homologiškas gp10 D2 arba D3) ir XD3 (homologiškas gp10 D2 arba D3, tačiau mažiau nei XD2 atveju). Taip pat CBA120 TSP1–4 N galuose yra nustatyti saviti domenai, D1 ir D2, kurie kartu su XD1–3 formuoja baltymo „galvos“ struktūrą, atskirtą nuo likusios baltymo dalies („kūno“) trigubos α -

spiralės motyvu. TSP2,4 papildomai turi D3' „galvos“ domenų, esančius baltymo „kūno“ struktūroje (**11, 15 ir 16 pav.**)^{21,141,182}.



16 pav. Schematinis CBA120 TSP1–4 domenų išsidėstymas ir baltymų susirinkimo seka. N galo arba „galvos“ domenai pažymėti spalvomis: **rožinė** – „inkaro“/ prijungimo prie bazinės plokštelės; **melsva, mėlyna ir violetinė** – CBA120 domenai, struktūriškai panašūs į T4 gp10 D1–3, iš kurių XD2,3 veikia kaip „platforma“ kitų baltymų prijungimui; **oranžinė, geltona ir raudona** – CBA120 TSP1–4 saviti domenai, kurių D1 dalyvauja baltymo-baltymo prisijungimo sąveikoje, o D3' yra N galo domenai, nesantis baltymo „galvos“ struktūroje. **Žalsva** – vidurinis D3 domenai, pasižymintis fermentiniu aktyvumu; **žydra** – D4, C galo domenai. Linijos tarp juostelių žymi aminorūgščių kilpas tarp domenų, o vingiai žymi „kaklo“ trigubos α -spiralės motyvus, kurie atskiria TSP „galvą“ nuo likusios baltymo dalies. Numeriai šalia raudonų linijų su rodyklėmis žymi prisijungimo tarp domenų eiliškumą. Taškinė linija žymi prisijungimo slopinimą prie mutacinio baltymo, turinčio dviejų domenų iškritą (Δ)¹⁴¹.

Iš keturių TSP, tik TSP4 N gale yra AD „inkaro“ domenai, prijungiantis baltymą prie bazinės plokštelės. XD2 ir XD3 veikia kaip „platformos“, prijungiančios TSP1 ir TSP2 baltymus per jų D1 domenai, ir taip suformuoja šakotąją LTF struktūrą (**16 pav.**). „Galvoje“ esantys domenai turi panašią trijų β -sumuštinių struktūrą, sudarytą iš 4–8 β -klosčių, kurios dažniausiai atskiriamos α -spiralinių motyvais. Domenai XD2 arba XD3 yra trimerinės struktūros (trigubas β -sumuštinių) ir vykdo prisijungimą su kitu TSP per trimerinio D1 domeno tris α -spirales (**15 b pav.**)^{21,141,182}.

Vis dėlto, CBA120 TSP1–4 susirinkimas į LTF yra kompleksiškesnis, reikalaujantis daugiau nei dviejų baltymų prisijungimo sričių (**16 pav.**). TSP3 per savo D1 prisijungia prie TSP2 XD3 tik tada, kai TSP4 yra prisijungęs prie TSP1, nors domenų sąveikos sritys yra atskiros. Taip pat parodyta, kad TSP2 jungimąsi per XD2 prisijungimo domeną slopina TSP4 domenų AD ir XD1 iškrita, kuri nepažeidžia XD2 srities. Tai reiškia, kad prisijungimui įvykti reikia gretimų sričių formuojamų struktūrų, kurios tikslingai palaiko XD2 funkciją, o iškritos atveju tai yra prarandama. Ši ypatybė rodo, kad CBA120 TSP baltymai neatsitiktinai susirenka į ataugėlę, o konkrečia seka^{21,141,182}.

Homologiškumas T4 gp10 D2 ir D3 domenams buvo nustatytas ir fago G7C gp66 N galo srityje, kuri prisijungia kitą TSP – *E. coli* 4s tipo polisacharidų esterazę, gp63.1. Baltymo gp66 N gale esančios 130 aa yra galimai atsakingos už prijungimą prie bazinės plokštelės, panašiai kaip ir CBA120 TSP4 atveju.

Pažymėtina, kad gp63.1 N galas yra homologiškas CBA120 TSP1, kas taip pat rodo, kad gp63.1 ir gp66 formuoja šakotą struktūrą¹⁸³. Apibendrinta informacija apie minėtus domenų ir jų aminorūgščių sritys yra pateikta **1P lent.**

1.3. Bakteriofagų depolimerazės

Fagų baltymai, turintys fermentinį aktyvumą, gali būti naudojami sudėtingų oligosacharidų sintezei iš polisacharidų⁴². Šiais oligosacharidais gali būti kuriamos glikovakcinos, nukreiptos prieš patogeniškas bakterijų padermes¹⁸⁴. O bakterijas lizuojantys fagų baltymai yra jau sėkmingai pritaikyti gydyti įvairias infekcijas, pvz., *Staphylococcus aureus* sukeltą egzema⁴¹. Įprastai fagų fermentai pasižymi dideliu stabilumu, o jų aktyvumas fiziologinėmis sąlygomis¹⁸⁵ – tai patrauklios savybės, skatinančios mokslininkus tyrinėti šiuos baltymus.

Bakteriofagų baltymai dažnai pasižymi skirtingu fermentiniu specifiskumu, susijusiu su bakterijų išorinių komponentų savybėmis. Fagai gali turėti peptidazes [EC3.4.19; skirstymas pagal IUBMB nomenklatūrą], lipazes/ esterazes [3.1.1], ar peptidoglikano sluoksnį skaidančius lizocimus, kurie atskirai grupuojami ([EC3.5.1], [EC3.4.19], [EC2.4.1]) pagal veikimo mechanizmą ir skeliamo ryšio molekulinę kilmę, kadangi peptidoglikanas yra heterogeniška struktūra⁴⁰. Tuo tarpu, fagų TSP įprastai pasižymi depolimeraziniu aktyvumu – polimerą degraduojančia savybe, kuri dažniausiai pasireiškia kaip glikozilo hidrolazės [EC3.2.1] arba liazės [EC4.2.2] veikimo mechanizmu. Kadangi fagų uodegos ataugėlėse dažniausiai aptinkamos depolimerazės, todėl didžiausias dėmesys bus skiriamas šiems baltymams ir jų fermentiniam specifiskumui.

1.3.1. Depolimerazių su nustatytu specifiskumu įvairovė

Siekiant nustatyti depolimerazės specifiskumą nėra pakankama įvertinti tik fermento veikimo principą (liazė, hidrolazė), kadangi polisacharidų sudėtis ir struktūra įprastai heterogeniška tarp skirtingų bakterijų serotipų, todėl yra svarbu nustatyti tiek substrato struktūrą, tiek depolimerazės skeliamą ryšį, kas leistų prognozuoti susidariusį produktą. Daugumos žinomų kapsulės polisacharidų sudėtis buvo nustatyta, naudojant pačius bakteriofagus, turinčius depolimerazes. Jų aktyvumu suskaidyti polisacharidai iki oligosacharidų palengvino analizę, tačiau informacijos apie pačias depolimerazes ar jų genus nėra žinoma^{186,187}.

Ganėtinai paprasta nustatyti fermentinį specifiskumą depolimerazėms, skaidančioms polisacharidus, sudarytus iš vienos monosacharido liekanos kaip sialo rūgštis ar fruktozė, ir turinčius vienodą pasikartojantį glikozidinį ryšį. Literatūroje aprašytos keturios depolimerazės K1E gp47, CUS-3 gp3¹⁸⁸, K1F gp17¹⁸⁹ ir ΦK1-5 gp47¹⁹⁰, kurios hidrolizuoja α -(2→8)-N-acetilneuramino rūgšties polisacharidus. Tuo tarpu PP35 gp156¹⁹¹ ir ΦNIT1 gp219¹⁹² depolimerazės atitinkamai hidrolizuoja β -(1→2)-D-6-deoksialtrozės ir α -(1→6)-fruktozės polisacharidus.

Nemažai atrasta ir sudėtingesnes polisacharidų struktūras (O ir K antigenuose) skaidančių depolimerazių bakteriofaguose, infekuojančiuose *E. coli*^{20–22}, *Salmonella* spp.^{23–27} ir *A. baumannii*^{28–31} bakterijas. Šios depolimerazės pasižymi didele specifiskumu įvairovė, priklausomai nuo polisacharido struktūros ir sudėties, tačiau iš esmės daugiausiai yra specifiskai hidrolizuojančiųjų, atitinkamų polisacharidų, α arba β -(1→3) glikozidinius ryšius^{23,24,26–30,193}. Depolimerazių vykdomų reakcijų metu susidaręs produktas-oligosacharidas redukuojančiame sacharido gale dažniausiai turi vieną iš šių monosacharido liekanų: galaktozės, gliukozės, manozės, ramnozės ar jų modifikuotus variantus. Mažiau nustatyta fagų depolimerazių, turinčių glikozilo hidrolazės aktyvumą 1→2, 1→4, 1→6 ar 2→6 ryšiams, kurių kiekvienas atitinkamai buvo identifiкуotas HK620 p57⁸⁹, APK37 gp44³⁰, TaPaz gp79³¹ ir APK44 gp44³⁰. Kita vertus, liaziniu aktyvumu pasižyminčių depolimerazių yra nustatytas daug mažesnis skaičius, būtent: *E. coli* K5 KflA³⁵ ir phiK1-5 gp46³⁶, *P. aeruginosa* LKA1 gp49³⁷ ir *A. baumannii* AP22 gp54²⁹. Jos skelia uroninės rūgšties junginių, gliukozės arba manozės, α arba β -(1→4) glikozidinius ryšius atitinkamuose polisachariduose.

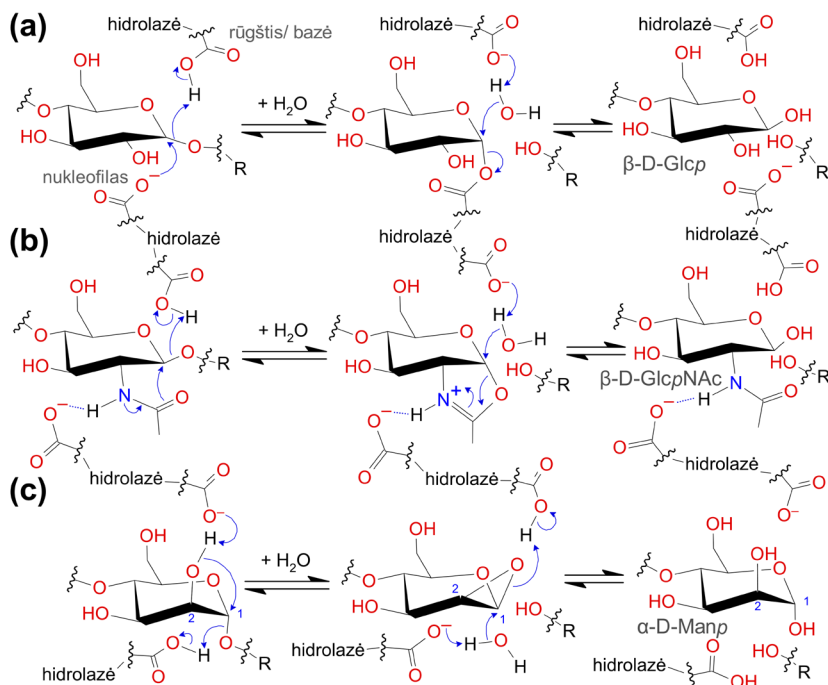
Nemažai depolimerazių aptikta ir *Klebsiella* faguose: K5-2, K5-4³², KN3-1³³, IME321³⁴, KpV virusuose¹⁹⁴, o KLPN1⁶⁶, KP32⁶⁷, KP36¹⁹⁵, Φ K64-1⁶³, ϕ Kp24^{68,69} nustatyta daugiau nei po vieną, tačiau ne visoms yra žinomas fermentinis specifiskumas. Kita vertus, *Klebsiella* K-serotipų struktūriniuose tyrimuose¹⁹⁶ aprašyta, kad bakteriofagai Φ 69¹⁹⁷, 20¹⁹⁸ ir 24¹⁹⁹ turi depolimerazes, pasižyminčias β -(1→4)-manozidazės, β -(1→2)-galaktozidazės ir β -(1→2)-gliukozydazės aktyvumu prieš K69, K20, ir K24 serotipo polisacharidus, tačiau jas koduojantys genai nėra žinomi. Nustatytas fermentinis specifiskumas yra depolimerazėms gp46 ir gp42, išskirtoms iš atitinkamai KpV767 (*Autographiviridae*) ir KpV79 (*Jedunavirus*) fagų, infekuojančių K57 serotipo *Klebsiella* bakterijas. Abu baltymai pasižymi β -(1→3)-galaktozidazės aktyvumu, kurio metu K57 serotipo polisacharidas yra hidrolizuojamas iki tetrasacharido (α -D-Manp-(1→4)- α -D-GalpA-(1→2)- α -D-Manp-(1→3)- β -D-Galp) ir oktasacharido⁷⁰. Neseniai nustatyta *K. pneumoniae* bakteriofago VLC6 depolimerazė gp58 pasižymi β -(1→4)-endogliukozydazės aktyvumu prieš K2 tipo polisacharidą, o jos fermentiniam aktyvumui užtenka dimerinės baltymo formos⁴². Tuo tarpu tik viena liazė su žinomu specifiskumu yra išskirta iš *Klebsiella* bakterijas infekuojančių bakteriofagų. Tai NTUH-K2044-K1-1 bakteriofago gp34 (**13 c pav.**), turinti savitą struktūrą ir skelianti K1 serotipo polisacharido β -D-Glcp-(1→4)- β -D-GlcpA glikozidinį ryšį³⁸.

Verta paminėti ir kitus bakterijų polimerinius junginius veikiančius fagų fermentus. Pavyzdžiui, fago Φ NIT1 turima gp1 peptidazė, hidrolizuoja *B. Subtilis* sintetinamą poli- γ -glutamato polimerą, kuris įprastai apsaugo bakterijas nuo imuninio atsako ir infekcijos virusais³⁹. Esterazinis aktyvumas yra aprašytas

bakteriofaguose Aristophanes (gp41) ir G7C (gp63.1), atitinkamai prieš *E. coli* 4sO ir *A. baumannii* K26 polisacharidus, kuriuose yra deacetilnamos atitinkamų monosacharidų liekanų, 6-deoksitalozės ir N-acetil-D-galaktozamino, 6-O⁹⁰ ir 3-O¹⁸³ acetilo grupės.

1.3.2. Glikozilo hidrolazės

Glikozilo hidrolazės gali turėti bent tris skirtingus veikimo mechanizmus, priklausomai nuo substrato struktūros ir fermento stereoselektyvumo. Klasikinis Košlando rūgšties/bazės mechanizmas yra pagrįstas dvejomis aminorūgščių karboksilo grupėmis, veikiančiomis kaip Luiso rūgštis/bazė ir nukleofilas, dėl ko hidrolizuojamas substrato glikozidinis ryšys ir susidaro fermento-glikozilo tarpinis junginys (**17 a pav.**). Skirtingi tarpiniai junginiai yra stebimi N-acetilheksozaminidazėse ir α -endomananazėse, kurių katalizuojamų reakcijų metu formuojami oksazoliniumas (**17 b pav.**) ir epoksidas (**17 c pav.**), atitinkamai susidarantys iš sacharido N-acetilo modifikacijos ir 2-OH grupės^{40,138,200–203}.

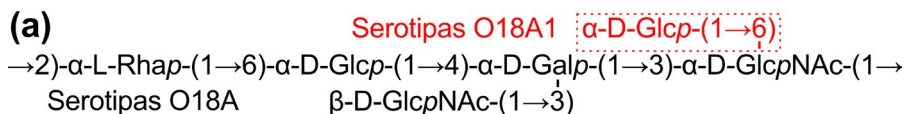


17 pav. Klasikinis Košlando glikozilo hidrolazės mechanizmas (**a**) ir susidarantys skirtingi tarpiniai junginiai: hidrolazės-glikozilo (**a**); oksazoliniumo (**b**); epoksido (**c**). Glcp, GlcpNAc, Manp – gliukozės, N-acetilgliukozamino ir manozės piranozinės monosacharidų liekanos, susidarantių produkto redukuojančiame gale^{201,202}.

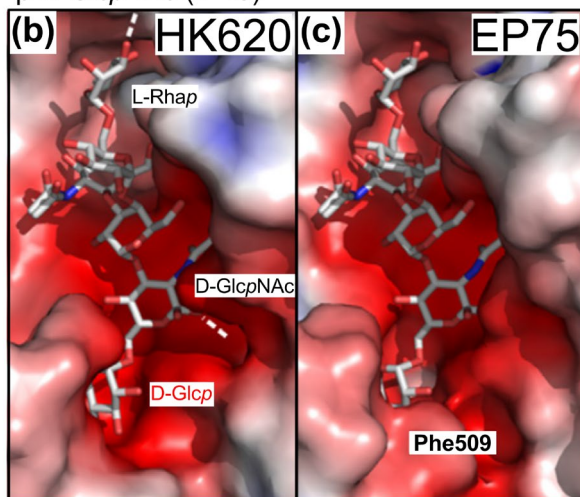
Įdomu tai, kad fermentinis aktyvumas gali vykti ir alternatyviu veikimo būdu, kuris pasireiškia per bekrūvės polines aminorūgštis. *E. coli* bakteriofago CBA120 α -(1→4)-endofukozidazės, TSP2, aktyviąjame centre, atlikus alanino mutagenezę nustatyta, kad Asp571, Glu568 ir Asp506 yra svarbios fermento

tiniam aktyvumui, o aspartato rūgšties liekanų pakeitimas į asparaginus neturėjo įtakos¹⁶⁶.

Kadangi depolimerazių aktyvusis centras yra vidinėje baltymo ertmėje, todėl šalia skeliamo ryšio esantys monosacharidų pakaitai gali turėti įtakos fermentiniam aktyvumui. Pvz., *E. coli* fago HK620 α -(1→2)-endo-N-acetilgliukozaminidazės gp9 su EP75 depolimerazės gp167 aminorūgščių (115–698 su 115–741) sričių persidengimas pasižymi 45% sekos tapatumu su identiškomis konservatyviosiomis sritimis ir tai netrukdo abiemis baltymams skaidyti O18A antigeno polisacharidus. Vis dėlto, tik gp9 yra aktyvus prieš O18A1, kuriame polisacharidas (**18 a pav.**) turi papildomą gliukozės liekaną.



18 pav. *E. coli* polisacharidų serotipų O18A ir O18A1 struktūrinės savybės (a), ir O18A1 polisacharido išsidėstymas gp09 (b) ir gp167 (c) katalitiniuose centruose²⁰⁴.

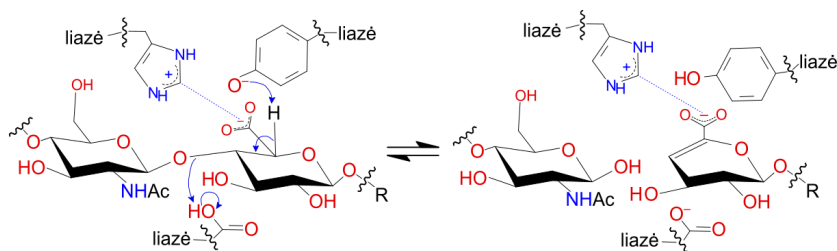


Baltymų paviršiaus analizė parodė, kad vietoje glicino liekanos HK620 gp9, EP75 gp167 turi fenilalanino (**18 b, c pav.**), kuri keičia sąveiką su šonine gliukozės liekana O18A1 polisacharide ir dėl to nevyksta katalizė^{20,204}. Taip pat yra nustatyta, kad polisacharido modifikacijos, esančios toliau nuo hidrolizuojamo ryšio, gali neturėti įtakos fermentiniam aktyvumui. P22 fago gp9 baltymo α -(1→3)-endoramnozidazės aktyvumui neturi reikšmės *S. typhimurium* O-antigeno A, B, D1 serogrupių polisacharidų atitinkami šoniniai monosacharidai: paratozė, abekvožė ir tiveliozė – 3,6-dideoksi heksozės izomerai²⁶.

1.3.3. Glikozilo liazės

Liazės gali būti *sin* arba *anti* stereoselektyvios ir vykdo glikozidinio ryšio skėlimą β -eliminacijos principu. Jų aktyviajame centre polisacharido uroninės rūgšties karboksilo grupės neigiamas krūvis yra neutralizuojamas teigiamai įkrautomis aminorūgščių liekanomis (lizinas, histidinas) arba divalenčių jonų ir

aminorūgščių kompleksais (Asn-Ca²⁺), ir tai palengvina C5 deprotonizavimą. Tuo tarpu, aktyviajame centre esanti tirozino liekana gali padidinti reaktyvių grupių (aspartato r./ glutamo r.) pKa, kas palengvina 1→4 glikozidinio ryšio skilimą. Susidaro oligosacharidas, turintis nesočiąją C4-C5 jungtį ir redukuojantį galą (**19 pav.**).²⁰⁵



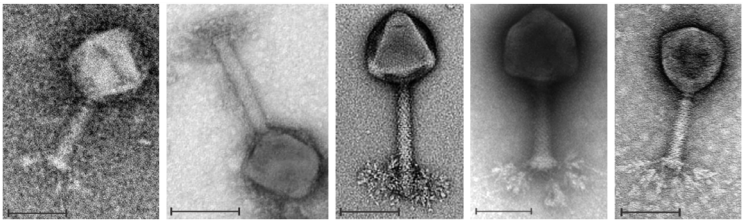
19 pav. Liazės veikimo mechanizmas²⁰⁵.

Nustatyta, kad *E. coli* K5 fago KflA liazės aktyvusis centras sudarytas iš Phe202, Lys208, Glu206 ir Tyr229, o Lys ir Glu liekanos yra kritiškai svarbios fermentiniam aktyvumui, veikiančiam *sin*-β-eliminacijos būdu³⁵. Tuo tarpu, *P. aeruginosa* LKA1 bakteriofago gp49 liazės katalizę vykdo Asp497, His494 ir His499 liekanos. Reakcijos metu *P. aeruginosa* O5 antigeno polisacharidas skeliamas ir susidaro liazėms neįprastas produktas – 1,3-diazinano junginys, susidarantis iš tarpinio nestabilaus redukuojančio galo per N-acetilo grupę³⁷.

1.4. Didieji bakteriofagai

Ypatingai dideli bakteriofagai, turintys >200 kbp genomus, vadinami *jumbo* fagais. Vienas didžiausių ir anksčiausiai atrastų yra *Bacillus megaterium* bakteriofagas G, turintis 453 nm ilgio uodegą ir 160 nm kapsidę, kurioje talpinamas 497 513 bp genomus. Lizės metu iš 1,2–1,5×2,0–4,0 μm bakterinės ląstelės į išorę pasklinda apie 30 fago G virionų²⁰⁶. Atradus daugiau *jumbo* virusų susidomėjimas jais išaugo, nes nustatyta, kad jie pasižymi savybėmis, kurios nėra būdingos mažesniems bakteriofagams. *Jumbo* virusų genomai papildomai koduoja DNR ir RNR polimerazes, atitinkamai dalyvaujančias genomo replikacijoje ir genų transkripcijoje. Juose taip pat nustatyta daugiau nei viena, savitą antikodoną turinčios tRNR sekos, kas rodo, kad virusinės kilmės RNR polimerazė vykdo genų nurašymą infekcijos pradžioje⁵⁹. Didieji fagai dažnai pasižymi unikalia adsorbcijos komplekso struktūra, kuri gali būti sudaryta iš įvairiai kompleksiskų ir labilių nanostruktūrų, neaptinkamų mažesniuose faguose. Tai nekelia abejonių, kodėl bakteriofagų φKZ (*P. aeruginosa*), ΦRSL1 (*Ralstonia solanacearum*), ar phAPEC6 (*E. coli*) nustatytų adsorbcijos kompleksų struktūros yra mažos 25–28 Å raiškos. Visi trys fagai turi panašų šešianarį adsorbcijos kompleksą, greičiausiai sudarytą iš STF arba TSP, kuris iš dalies primena heksagoninę žvaigždę^{58,61,207}.

Dauguma atrastų *Klebsiella* bakterijas infekuojančių didžiųjų fagų yra miovirusai, pasižymintys šakotomis LTF. Bakteriofagų N1M2²⁰⁸, GBH019²⁰⁹, ϕ Kp24⁶⁴, Φ K64-1⁶³, ir vB_KleM-RaK2¹⁰⁰ genomai (250–350 kbp) turi, apie 260–560 genų ir yra supakuoti į >100 nm kapsides (**20 pav.**). Jų genomuose yra nustatyta iki devynių atskirų tRNR, o ϕ Kp24 ir vB_KleM-RaK2 – viena ir dvi sekos, koduojančios tRNR su unikaliais antikodonais. Taip pat, GBH019, Φ K64-1 ir vB_KleM-RaK2 fagų genomai pasižymi homologinių genų organizacijos mozaikiškumu, ir bendrai priklauso nedidelei *Alcyoneusvirus* genčiai (**6 pav.**)^{59,63,100,208–211}.



	GBH019	N1M2	ϕ Kp24	Φ K64-1	vB_KleM_RaK2
NCBI Nr.	-	MN642089	MW394391	AB897757	NC_019526
bakt. šeimininkė	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella</i> KV-3
kapsidė, nm	132,7	113×101	110	129*	123
uodega, nm	163,4	158×21	177×23,1	159×24*	128×21,5
gDNA, bp	347546	253367	307210	346602	345809
GC turinys, %	32	40,9	45,1	31,7	32
kod. sekos	534	257	372	541	534
TF baltymai	4	-	14	11	10
tRNR	6	3	9	-	7
tRNR antikodonai	-	MRN	SNDQYRLM?	-	RS×2NT?×2
infekuojami K-serotipai	K2, K51, K102	K186*	K2, K13, K19, K25, K35, K46, K61, K64, K81	K1, K11, K21, K25, K30, K35, K64, K69, KN4, KN5	-

20 pav. *Klebsiella* spp. didžiųjų bakteriofagų TEM mikrografijos ir pagrindiniai ypatumai. Raidės žymi aminorūgštis, ? – nenustatytas aminorūgštis; * – straipsnio autorių nepateikti parametrai. Pateiktas mastelis yra 100 nm^{63,100,208–211}.

Didžiuosiuose faguose taip pat matomas didelis kiekis skirtingų TF baltymų, kurie gali pasižymėti savitu depolimeraziniu aktyvumu. Nustatyta, kad ϕ Kp24 fagas turi 14-a TF baltymų, kurie tikriausiai apsprendžia viruso daugiavalentiškumą, nes jis gali užkrėsti net devynis skirtingus *Klebsiella* spp. K-serotipus: K2, K13, K19, K25, K35, K46, K61, K64 ir K81. Remiantis ϕ Kp24 krio-EM analizės duomenimis buvo pasiūlytas jo šokotosios LTF architektūros modelis, kurį sudaro 14-a TF baltymų su numanomu depolimeraziniu aktyvumu. Struktūros pamatą formuoja prie viruso uodegos galo prisijungęs, visų didžiausias baltymas, gp306. Jis savo N-galiniais domenais taip pat prijungia gp313, gp294, gp295 ir gp301, o pastarieji trys turi T4 gp10 homologiškus baltymų prijungimo domenų, kurie suriša likusius TF baltymus ir nulemia LTF struktūros šakotumą. Sąveikos su bakterija metu adsorbcijos kompleksas suploksėja, o pasikeitusi konformacija byloja apie įvykusį bakterijos užkrėtimą⁶⁹. Didelės raiškos (<10 Å)

Klebsiella spp. *jumbo* virusų adsorbcijos kompleksų struktūrų dar nėra nustatyta, tačiau apie jų savybes suteikti informacijos gali jau ištirti mažesnieji fagai kaip KP32¹⁶⁹ ar CBA120^{21,141}, kurių sudėtyje aptinkamos panašios depolimerazės, formuojančios šakotąsias nanostruktūras (žr. sk.: 1.2.2.3, 1.2.2.4 ir 1.2.3).

GBH019 *jumbo* fage (20 pav.) bioinformatinės analizės metu aptikti bent trys numanomi ataugėlių baltymai, o mikrobiologiniai tyrimai parodė, kad virusas gali užkrėsti *K. pneumoniae* K2 (tik SG44 izoliatą), K51 ir K102 serotipus. Papildomai įvertinta, kad K51 tipo polimerą veikia gp279 depolimerazė²⁰⁹. Kita vertus, Taivano šalies mokslininkų atrastame didžiajame fage ΦK64-1 nustatyta 11-a TF baltymų. Skaidrių zonų testu, devyniems TF buvo identifikuotas ir priskirtas depolimerazinis aktyvumas (1 lent.) prieš KN4, K21, K11, KN5, K25, K35, K1, K64 serotipus. Įdomu tai, kad ΦK64-1 S2-6 depolimerazė buvo aktyvi prieš du seprotipus, K30 ir K69⁶³.

Tyrimo objektas, bakteriofagas vB_KleM-RaK2 (RaK2), yra vienas pirmųjų atrastų didžiųjų virusų, infekuojančių *Klebsiella* sp. bakterijas. Bioinformatinė ir proteominė analizės atskleidė, kad bent dešimt numanomų struktūrinių baltymų (gp098 ir gp526–534) sudaro RaK2 adsorbcijos kompleksą. Devyni genai, koduojantys baltymus gp526–534, sudaro 19 kbp genų sandarą. Atskirai nuo jos esantis gp098 genas yra greta kapsidės ir jos portalo baltymus koduojančiųjų. Didelis RaK2 gp098, gp529, gp530 ir gp533¹⁰⁰ baltymų sekų identiškumas (≥90%) buvo nustatytas atitinkamai su bakteriofago ΦK64-1 gp25, gp59, gp60, ir gp63⁶³, kurie pasireiškia depolimeraziniu aktyvumu prieš *K. pneumoniae* K25, K35 ir K30/K69 serotipus (1 lent.).

1 lentelė. RaK2 baltymų palyginimas su ΦK64-1, pagrįstas „Blastp“ analize⁶³.

RaK2 baltymas	Aminorūgščių sekos			ΦK64-1	
	ilgis	homologinė dalis, %	sutapimas, %	baltymas	K-tipas*
gp098	595	1–595, 100	595/595, 100	S2-8/gp25	-
gp526	580	1–121, 20	75/122, 61	S1-2/gp55	KN4
gp527	715	1–688, 96	187/718, 26	S1-1/gp57	K11
gp528	1113	1–632, 56	518/633, 82	S2-1/gp58	KN5
gp529	584	1–584, 100	581/584, 99	S2-2/gp59	K25
gp530	779	1–779, 100	754/779, 97	S2-3/gp60	K35
gp531	895	89–347, 28	231/259, 89	S2-4/gp61	K1
gp532	806	13–308, 36	225/298, 76	S2-5/gp62	K64
gp533	767	1–767, 100	690/767, 90	S2-6/gp63	K30/K69
gp534	688	85–668, 85	449/605, 74	S2-7/gp64	-

* – *Klebsiella* kapsulės serotipas, kuriam priskirtas ΦK64-1 baltymo depolimerazinis aktyvumas.

Bakteriofagų RaK2 ir ΦK64-1 adsorbcijos kompleksus sudarančių baltymų panašumas suteikia informacijos, kad šeimininkų ratas bent dalinai persidengia tarp abiejų virusų, o nustatyta φKp24 šakotosios LTF struktūra suteikia naudingų įžvalgų atliekant ir RaK2 adsorbcijos komplekso tyrimus.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Virusai ir mikroorganizmai

Didysis bakteriofagas: vB_KleM-RaK2 (RaK2), infekuojantis *Klebsiella* sp. KV-3 bakterijas; dr. Vytautas Klausas[†] išskyrė iš kūdros Rokiškio rajone. RaK2 genomo seka yra NCBI duomenų bazėje nr. JQ513383.

Bakterijų padermės, skirtos:

a) klonavimui:

DH10B, *Escherichia coli*: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*dlacZ*ΔM15 Δ*lacX74 endA1 recA1* Δ(*ara, leu*)7697 *araD139 galU galK nupG rpsL* (Str^R) λ⁻ (Thermo Fisher Scientific, Lietuva).

b) rekombinantinių baltymų sintezei:

Arctic express (DE3), *Escherichia coli*: B F⁻ *ompT hsdS* (*rB⁻ mB⁻*) *dcm*⁺ Tet^rgal^λ *endA Hte* [*cpn10 cpn60 Gent^r*] (Agilent technologies, JAV).

ER2566 arba T7 Express, *Escherichia coli*: B *fhuA2 lacZ::T7 lon ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 dcm R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1* Δ(*mcrC-mrr*) 114::IS10 (New England Biolabs, JAV).

HMS174 (DE3), *Escherichia coli*: F⁻ *recA1 hsdR* (*rK12⁻ mK12⁺*) (Rif^R) (Novagen).

Rosetta pLysS (DE3), *Escherichia coli*: F⁻ *ompT hsdS_B* (*rB⁻ mB⁻*) *gal dcm* pLysSRARE (Cam^R) (Novagen, JAV).

c) RaK2 bakteriofago tyrimams:

Klebsiella pneumoniae veterinarinis KV-3 izoliatas, išskirtas Vilniaus universiteto Biochemijos institute. Genomo seka pateikta NCBI duomenų bazėje nr. **SAMN31360738**;

d) depolimerazinio aktyvumo identifikavimui:

⊗ *Klebsiella* sp. KV-1 izoliatas; ⊗ *Klebsiella pneumoniae* 279;

⊗ *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724; ⊗ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705.

2.1.2. Plazmidiniai vektoriai ir DNR pradmenys

Vektoriai:

pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific) buvo naudojamas tikslinį geną turinčių klonų savitai atrankai, pET16b ir pET28b (Novagen, JAV) – rekombinantinių genų raiškai.

Rekombinantinių genų padauginimui skirtos pradmenų poros yra pateiktos **2 lent.**, o sekoskaitos analizei buvo panaudoti atitinkamų plazmidžių komerciniai

pradmenys: pJET1.2 tiesioginis/ atvirkštinis ir T7 promotoriaus/ terminatoriaus (pET16b/28b).

2 lentelė. PGR pradmenys ir jais atliktų PGR-ų amplikonų dydžiai.

Genas	Raiškos vektorius	RE taikiny	T/A	Pradmens (5' → 3') seka	PGR, bp
098	pET28b	NheI	T	ATGGCTAGCGATACTATGACTGGCAAC	765
		BamHI	A	ATTCGGATCCTGACTGTGTGCAGAT	
526	pET28b	NheI	T	TACAGCTAGCTTAAACGAGGACAATATGTC	1829
		BamHI	A	TAACAGGATCCATTAAATATTCCTAGATGTG	
527	pET28b	NheI	T	ATGCTAGCTCTGGTACAACAAATACAA	553
		BamHI	A	TAACAGGATCCTCGTTTTAATTAGTTGG	
528	pET16b	NdeI	T	TACACATATGAAAAGGAATTATGACATGGC	1152
		BamHI	A	TACTAGGATCCTGTAGTGGTGAGCTTAATG	
529	pET28b	NheI	T	TGGCTAGCATGGGAAATTTTATAC	1755
		BamHI	A	TCGGATCCTATTATGCACCTCTAATA	
530	pET28b	NheI	T	GAAGCTAGCGTCAGTTACACTACATCA	530
		BamHI	A	AAGTGGATCCTTTAGGTTGTATAAAATT	
531	pET16b	Sall	T	CTTGTCGACGAGGTTAATATGTCATTGA	2708
		BamHI	A	TAAGGATCCTTTTTTATACTGAAGTTCCTG	
532	pET16b	Sall	T	TCAGTCGACGTCCTTAAGTAATTTAAGCTC	2542
		BamHI	A	TAATGGATCCATTACTAGGTGAAAG	
533	pET16b	Sall	T	TCAGTCGACGTCATTAATTCAACTTTCACC	2358
		BamHI	A	GCCGGATCCGATAATGACATAATCGAT	
534	pET28b	NheI	T	CCAACGCTAGCATGCAAATAGCTGG	767
		BamHI	A	TACAGGATCCATTATATAGTTAAGAACTTAC	

RE – restrikcijos endonukleazė, kurios DNR taikinio seka yra paryškinta, T – tiesioginis, A – atvirkštinis.

2.1.3. Cheminiai junginiai, makromolekulės

Gamintojas	Medžiagos pavadinimas
Alfa aesar:	chloroformas; D-(+)-gliukozė.
Bio-Rad:	amonio persulfatas (APS); β-merkaptioetanolis.
Carbosynth:	L-fukozė; X-Glc; X-GlcA.
Chempur:	citrinos rūgštis; druskos rūgštis (HCl).
Fluka:	chloramfenikolis; D-celobiozė; dinatrio karbonatas (Na ₂ CO ₃); fenilmetilsulfonilo fluoridas (PMSF); formaldehidai; kalio šarmas (KOH); natrio acetatas; natrio citratas; natrio šarmas (NaOH).
Honeywell:	etanolis (98%); etilacetatas; fenolis; metanolis.
LaChema:	magnio II sulfato heptahidratas (MgSO ₄ ·7H ₂ O); vario II sulfato pentahidratas (CuSO ₄ ·5H ₂ O).
Lachner:	acto rūgštis; sacharozė; sieros rūgštis (H ₂ SO ₄).
Li-cor:	ožkos prieštriušinis IgG ir 680RD fluoroforo konjugatas (IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody).
Merck:	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis kaip Luiso bazė (Tris);

	agaras; etidžio bromidas (EtBr); kalcio II chloridas (CaCl_2); kalio chloridas (KCl); L-glicinas; mielių ekstraktas; skruzdžių rūgštis (HCOOH); triptonas; karbamidas.
Roth:	1-butanolis; 1-propanolis; amonio karbonatas; dikalio hidrofosfatas (K_2HPO_4); dinatrio hidrofosfatas (Na_2HPO_4); kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4); natrio chloridas (NaCl); natrio dodecilo sulfatas (SDS); pieno milteliai.
Serva:	bromfenolio mėlis; etilendiamino tetraacto (EDTA) rūgštis; glicerolis; tetrametiletildiaminas (TEMED); vario II sulfatas (CuSO_4).
Sigma-Aldrich:	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolio hidrochloridas kaip Luiso rūgštis ($\text{Tris}\cdot\text{HCl}$); 4-anyžio aldehidas; 4-nitro fenilo substratai; 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfoninės rūgšties dinatrio ($\text{ANTS}\cdot 2\text{Na}^+$) druska; acetonitrilas (ACN); akrilamidas (AA); ampicilinas; bis-akrilamidas; boro rūgštis (H_3BO_3); chloramfenikolis; D-gliukuroninės rūgšties $\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$ druska; dimetilsulfoksidas (DMSO); Folino ir Čiokateu fenolio reagentas; Freudo pilnas ir nepilnas adjuvantai; imidazolas (ImH); jaučio serumo albuminas (BSA); kanamicinas; karboksietilceliuliozė; natrio azidas (NaN_3); natrio borohidridas (NaBH_4); natrio ciano borohidridas (NaCNBH_3); prieštriušiniai IgG konjuguoti 10 nm Au dalelėmis; prieštriušiniai pilni IgG konjuguoti peroksidaze, poli-L-lizinas; tetraciklinas; trichloracto (TCA) rūgštis; trifluoracto (TFA) rūgštis; <i>Tween</i>-20.
Thermo Fisher Scientific:	agarozė; baltymų molekulinio masės žymenys (<i>Page Ruler Prestained Protein Ladder</i>, 10–180 kDa, #26616, Lietuva); Dnazė I, izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas (IPTG); Kumasi briliantinis mėlis G250; magnio II sulfatas (Mg_2SO_4); restrikcijos endonukleazės (BamHI, NdeI, NheI, SalI); nikelio II sulfato heksahidratas ($\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$); peroksidazės substratas ($\times 10$): 3,3'-diaminobenzidinas (DAB); stabilus peroksidazės ($\times 1$) buferinis tirpalas; T4 DNR ligazė; X-Gal.

2.1.4. Mitybinės terpės, tirpalai, geliai, substratai

Luria-Bertani (LB) terpė:

1% triptonas, 0,5% mielių ekstraktas, 1% NaCl, pH 7,0.

Sterilinimas: 121°C, 20 min autoklave su 1 atm slėgiu.

Luria-Bertani agarizuota (0,5 arba 1,2% LA) terpė:

0,5 arba 1,2% agaras, 1% triptonas, 0,5% mielių ekstraktas, 1,0% NaCl, pH $\approx$ 7,0. Sterilinimas: 121°C, 20 min autoklave su 1 atm slėgiu.

Bakteriofagų surinkimo tirpalas:

49 mM Na_2HPO_4 , 68 mM NaCl, 17 mM KH_2PO_4 .

Sterilinimas: 121°C, 20 min autoklave su 1 atm slėgiu.

Pridedama 1,0 mL sterilaus 0,1 M MgSO_4 į 100 mL pradinio tirpalo.

CsCl gradiento tirpalai:

iš CsCl druskos paruošiami 5,6, 3,92, 3,22 ir 2,52 M koncentracijos vandeniniai tirpalai, atitinkamai turintys 1,71, 1,49, 1,40 ir 1,31 g/mL tankį.

Bakteriofagų dializės tirpalai po gryninimo CsCl gradientu:

I – 3 M NaCl, 100 mM Tris·HCl, pH≈7,4;

II – 0,3 M NaCl, 100 mM Tris·HCl, pH≈7,4.

Baltymų elektroforezės (SDS-PAGE) tirpalas (10×):

250 mM Tris, 2 M L-glicinas, 1% SDS.

Baltyminių mėginių užnešimo dažas (4×):

200 mM Tris·HCl (pH 6,8) , 50 mM EDTA, 40% glicerolis, 8% SDS, 0,08% bromfenolio mėlis, 600 mM β-merkaptoetanolis.

Skirstomasis PAA gelis (≈10–14%):

9,88–13,84% akrilamidas (30%), 0,26–0,37% bis-akrilamidas (0,8%), 123 mM Tris 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,2% TEMED, pH≈8,8.

Koncentruojamasis PAA gelis (≈4%):

3,85% akrilamidas (30%), 0,1% bis-akrilamidas (0,8%), 123 mM Tris, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,2% TEMED, pH≈6,8.

Kumasi dažas PAA geliui:

0,1% Kumasi briliantinis mėlis G-250, 30% metanolis, 30% acto rūgštis.

PAA gelio plovimo tirpalas:

5% metanolis, 7% acto rūgštis.

Tris·acetatas·EDTA (TAE, 50×) tirpalas DNR elektroforezei:

2 M Tris, 1,0 M acto rūgštis, 50 mM EDTA.

Agarozė (0,5–1,0%) DNR elektroforezei:

0,5–1,0 g agarozė, 99,5–99,0 g TAE (1×).

Baltymų chromatografijos tirpalai:

A1: 25–50 mM Tris, pH 8,0;

A2: 20 mM natrio fosfatinis, pH 8,0;

B1: 25 mM Tris, 0,7 M imidazolas, pH 8,0;

B2: 50 mM Tris, 0,5 M imidazolas, pH 8,0;

B3: 20 mM natrio fosfatinis, 0,7 M imidazolas, pH 8,0.

Tirpalai skirti gryninti denatūruojančiomis sąlygomis:

A1k: 50 mM Tris, 6,0 M karbamidas, pH 8,0;

B2k: 50 mM Tris, 6,0 M karbamidas, 0,5 M imidazolas, pH 8,0.

A/B reagentai baltymų konc. nustatymui pagal Lourio metodą:

A – 0,4% NaOH, 2% Na₂CO₃;

B – 0,5% CuSO₄·5H₂O, 1,0% natrio citratas.

PBS (10×) antiserumų skiedimui:

1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄, 11,5 mM K₂HPO₄, pH 7,4.

Sterilinimas: 121°C, 20 min autoklave su 1 atm slėgiu.

Baltymų pernašos tirpalas „Western blot“ analizei:

25 mM Tris, 192 mM L-glicinas, 0,1% SDS, 20% metanolis.

Membranos blokavimo mišiniai:

- i) 1% pm: 1,0% pieno milteliai, 154 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05% Tween-20, 0,02% NaN₃. Saugoma 4–8°C prieš naudojimą.
- ii) 3% BSA: 3,0% BSA, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 0,05% Tween-20. Saugoma -20°C prieš naudojimą.

Membranos plovimo tirpalas (PBST):

0,5% Tween-20, PBS (1×).

TEM gardelės tirpalas:

150 mM NaCl, 20 mM 0,02 M natrio fosfatas, pH 8,1.

Uranilo (2%) acetato tirpalas:

20 mg uranilo acetato druskos ištirpinama 0,955 mL vandens ir pridedama 25 µL 2 M acto rūgšties.

NaBH₄ (0,6 M) tirpalas:

20 mg NaBH₄ ištirpinama 0,910 mL H₂O ir 0,100 mL 0,1 M KOH.

ANTS (0,2 M) derivatizacijos tirpalas:

43 mg ANTS·2Na⁺ druskos ištirpinama tirpale, sudarytame iš 0,229 mL H₂O ir 0,0404 mL 99,8% acto rūgšties.

NaCNBH₃ (1,0 M) tirpalas:

63 mg NaCNBH₃ ištirpinama 1,000 mL DMSO.

DEAE sacharidų chromatografijos tirpalai:

- A – 20 mM natrio fosfatas, pH 8,1, ≈3,14 mS/cm;
- B – 20 mM natrio fosfatas, 1,0 M NaCl, pH 8,1, ≈72 mS/cm.

TFA rūgšties (8,0 M) tirpalas:

0,700 mL TFA rūgšties ištirpinama 0,443 mL H₂O.

TLC analizės judrios fazės:

- i) 1-propanolio (1-proOH): etilacetato (EtOAc): vandens (H₂O) santykiu 6:1:3 (v/v/v);
- ii) 1-butanolio (1-butOH): etanolio (EtOH): H₂O santykiu 5:3:2 (v/v/v).

Anyžio aldehido (1%) dažas:

90,6% etanolis, 1,0% 4-anyžio aldehidas, 1,0% acto rūgštis, 3,4% H₂SO₄. Paruošimas: 0,50 mL aldehido ištirpinama 46,3 mL 96% etanolio, tuomet maišant ir lėtai supilama 0,50 mL acto r. ir 1,76 mL H₂SO₄.

Depolimerazės substratų paieškos tirpalai:

- i) sacharidų (0,05–0,01 M) vandeniniai tirpalai panaudoti kaip kontrolės: L-fukozė, D-(+)-gliukozė, D-gliukuronatas Na·H₂O ir D-(+)-celobiozė;

ii) polisacharidų (1–5 mg/mL) vandeniniai tirpalai: krakmolai (iš bulvių), karboksimetilceliuliozė, amilozė (iš bulvių) ir pektinas (iš citrusinių vaisių);

iii) 4-NP chromogeninių junginių (0,01 M) DMSO tirpalai: butiratas, valeratas, acetatas, stearatas, β -L-arabinopiranozidas, α -D-ksilopiranozidas, α -L-fukopiranozidas, α -L-arabinofuranozidas, α -L-arabinopiranozidas, β -D-ksilopiranozidas, 4'-nitrobenzanilidas, 4-nitroacetanilidas, palmitatas ir dekanooatas;

iv) 5-bromo-4-chloro-3-indolilo chromogeninių junginių (0,01 M) DMSO tirpalai: β -D-galaktopiranozidas, β -D-gliukopiranozidas, β -D-gliukorono r. piranozidas.

Depolimerazės aktyvumui tirti skirti tirpalai (0,05 M ir pH 3–10): ruošti maišant 0,2 M rūgšties/bazės porų tirpalus, t. y. citrinų rūgštį/citratą (pH 3–6), Tris-HCl/Tris (pH 7–9) ir boro rūgštį/NaOH (pH 10), atitinkamu santykiu pagal *Henderson-Hasselbalch* aproksimaciją. Naudotas lakmuso popierinis indikatorius pH įvertinimui.

2.2. Metodai

2.2.1. Bioinformatiniai metodai

2.2.1.1. *RaK2 struktūrinių baltymų bioinformatinė analizė*

„AlphaFold2“ bioinformatinis įrankis buvo naudojamas modeliuojant RaK2 gp098 ir gp526–534 baltymų trimerines struktūras, kurios buvo tikslinamos 12 ciklų su 16 struktūrinių šablonų. Pirmiausia buvo modeliuojami maži, apie 350 aa ilgio, tačiau persidengiantys baltymo fragmentai, kurie galiausiai apjungti į pilną struktūrą, naudojantis „UCSF Chimera v1.16“ programine įranga, kuri taip pat panaudota sugeneruotų struktūrų vaizdinimui. Modelių patikimumas buvo įvertintas pagal pLDDT (*predicted Local Distance Difference Test*) potencialo skalę (0–100%), kuri matuoja numatyto atstumo nuokrypį modelyje nuo žinomos struktūros.

„Protein Data Bank“ (PDB) duomenų bazės su bent 25–90% (PDB25, PDB50, PDB90) sričių identiškumu buvo naudojamos nustatant artimiausius struktūrinius homologus, pateikiant struktūrinės sritis į „Dali“ serverį ir atrenkant patikimiausius homologus bakteriofagų baltymams ir pagal didžiausią Z-įvertį, nusakantį statistiškai reikšmingą dviejų baltymų persidengimą (struktūrinę homologiją) tarp aminorūgščių liekanų susilankstymo srityje. Įprastai Z-įverčio reikšmė >2 rodo, kad abi struktūros turi bendrą biologinę prasmę: panaši baltymų funkcija, aktyvumas ar sąveika su ligandu, o >8 – struktūros dalijasi bendra kilme, baltymai ortologai. Taip pat baltymų sekos buvo analizuojamos „Hhpred“ įrankiu, naudojantis PDB_mmCIF70 su įprastiniais nustatymais ir 10–20% minimaliu sekų persidengimu.

Proteazės skaidomas taikiny s gp530 C galo 650–779 sričiai buvo analizuojamas „MMAFT“ bioinformatiniu įrankiu, lyginant ją su kitais faginiais baltymais: GA1 gp12, ΦK1-5 gp46, K1E endoNE, Φ63D endoN, T5 pb1, 29 gp12, PZA gp12, B103 gp12 ir K5 KlfA, turinčiais C-galinį vidumolekulinį šaperono domeną (endošaperoną).

Trimerinių RaK2 baltymų struktūrų modeliavimas buvo atliktas dr. Audriaus Laurynėno (Biochemijos instituto bioanalizės skyrius), o domenų homologijos analizė – dr. Lauros Kalinienės.

2.2.1.2. *Klebsiella* sp. KV-3 serotipo nustatymas

Bioinformatinė analizė buvo atlikta *Klebsiella* sp. KV-3 genomo 30 887 bp fragmentui (3637592–3668479), kuris nustatytas pirmine „Blast“ homologine DNR sekų analize. Šis fragmentas apima *cps* genų sandaugą, kurią atitinkamai 5' ir 3' galuose riboja *terC* ir *rfaA*. Nustatant *Klebsiella* sp. KV-3 K-serotipą buvo pasitelkiamas atvirojo kodo įrankis „Multigeneblast“ su numatytaisiais parametrais ir 81 *Klebsiella* K-serotipais (**2P lent.**), turinčiais nustatytas polisacharidų struktūras ir žinomus *cps* genotipus, kurie panaudoti kaip sekų palyginiai (*references*). Siekiant patikrinti analizės duomenis, *Klebsiella* sp. KV-3 *cps* genų sritis buvo papildomai analizuojama „K-Pam⁸⁷ ir „Kaptive“²¹² bioinformatiniais įrankiais.

2.2.2. Mikrobiologiniai, genų inžinerijos ir biocheminiai metodai

2.2.2.1. Bakterijų auginimas ir imliųjų ląstelių paruošimas

Bakterijos auginamos 2–24 val. purtyklėje (Innova 44, New Brunswick Scientific), esant 180–200 min⁻¹ kratymo dažniui ir 30–37°C, užsėtos sterilioje LB terpėje su atitinkamu antibiotiku (50 µg/mL ampicilinu, 35 µg/mL kanamicinu ar 35 µg/mL chloramfenikoliu). Bakterijos panaudojamos imliųjų ląstelių ruošimui, plazmidinės DNR išskyrimui, baltymų indukcijai, fago padauginimui ar jo biosintezės tyrimams.

Imliųjų ląstelių ruošimas elektroporacijai (4°C): bakterijoms užaugus iki OD₆₀₀ 0,4–0,8, suspensija centrifuguojama 5–15 min, esant 2 700×g (5804R, Eppendorf) ir galiausiai surenkama biomasė pašalinus supernatantą. Ji tris kartus plaunama su 10% sterilaus glicerolio tirpalu, kurio kiekis atitinka pradinį bakterijų suspensijos tūrį. Galiausiai biomasė suspenduojama į 1/10 pirminio tūrio 10% glicerolį. Paruoštos imliosios ląstelės išpilstomos į 60 µL porcijas ir saugomos -80°C.

Imliųjų ląstelių ruošimas cheminei transformacijai: surinkta bakterijų biomasė suspenduojama viename pradinės kultūros tūryje 0,1 M CaCl₂ tirpalo ir laikoma 20–45 min, ledo vonioje (4°C), centrifuguojama ir surinkta biomasė suspenduojama 1/10 tūryje 0,1 M CaCl₂ tirpalo. Vykdoma paruoštų imliųjų ląstelių transformacija.

2.2.2.2. Imliųjų ląstelių transformacija

Elektroporacija (4°C): imliųjų ląstelių 60 µL porcija sumaišoma su 25–50 ng pDNR arba 2,5–5 µL ligavimo reakcijos mišinio, perkeliama į 2 mm pločio elektroporacijos kiuvetę (50/CS, Research Products International). Įvykdomas 3–5 ms elektros impulsas, sugeneruotas 1990 mV/cm įtampos srove (Electroporator 2510, Eppendorf). Po krūvio, 1,0 mL LB terpe surinkta bakterijų suspensija gaivinama 30–60 min, esant 37°C. Tik 1/10 dalis išsėjama ant LA terpės su atitinkamu antibiotiku Petri lėkštelėje (90×16,2, Nova).

Cheminė transformacija: paruošta 50–100 µL imliųjų ląstelių porcija sumaišoma su pDNR arba ligavimo mišiniu ir 20–30 min šaldoma (4°C) ledo vonioje. Netrukus ląstelių suspensijai su DNR atliekamas 1–2 min, 42°C šokas karščiu ir staigus atšaldymas (4°C). Taip transformuotos ląstelės yra gaivamos ir išsėjamos ant 1,2% LA su antibiotiku. Abejais atvejais lėkštelės su bakterijomis laikomos 30–37°C termostate (BD115, Binder) apie 16–24 val.

2.2.2.3. RaK2 padauginimas ir titravimas

Bakterijų, *Klebsiella* sp. KV-3, augimui (60 mL LB, 30°C, 180 min⁻¹, 2–3 val.) pasiekus 0,4–0,5 optinį tankį (Biophotometer AG22331, Eppendorf), paveikiama su 2–5 MOI (*multiplicity of infection*, bakteriofago ir bakterinių ląstelių skaičiaus santykis) RaK2 bakteriofago suspensijos ir infekcija vykdoma 3–5 val. Po infekcijos, surenkama biomasė (60 min, 14 500×g ir 4–6°C), kuri veikiama 1,0–2,0 mL bakteriofagų surinkimo tirpalu, 100–200 µL chloroformo ir 2–4 u DNAzės I (Thermo Fisher Scientific) apie 60 min, esant 37°C su pastoviu 80–110 min⁻¹ kratymu. Padaugintą bakteriofagą turintis supernatantas atskiriamas nuo netirpios frakcijos vykdant centrifugavimą 20 min, 2 700×g, 4°C (5810R, Eppendorf).

Fago titravimas: išskirto fago suspensiją nuosekliai skiedžiant LB terpe 1–2 eilės skiedimais (iki $\times 1 \cdot 10^{11}$) paruošiami analitiniai mėginiai, kurių po 10–100 µL sumaišoma su 500 µL bakterijų suspensija ($OD_{600} \approx 0,5$) ir 2,5 mL 0,5% LA terpės (50–55°C; TB2, Biometra). Viskas gerai sumaišoma ir supilama į Petri lėkštę su 1,2% LA. Paskirsčius mišinį po visą paviršių, apie 15 min laikoma iki kada jis sustings ir inkubuojama 30°C apie 14–24 val. Suskaičiuojami bakterijų gazone viruso sufomuoti lizės centrai ir apskaičiuojamas išskirto fago titras – tai infektyvių virionų koncentracija mililitre (pfu/ mL).

2.2.2.4. RaK2 gryninimas CsCl gradientu

Fago gryninimui naudojamas CsCl gradientas²¹³, kurį sudaro CsCl skirtingos koncentracijos (tankio) vandeniniai tirpalai: 5,6 M (1,7 g/mL), 3,92 M (1,49 g/mL), 3,22 M (1,40 g/mL), 2,52 M (1,31 g/mL), supilstyti po 1–3 mL į 12 mL polipropileninį mėgintuvėlį (Beckman Coulter) koncentracijos mažėjimo tvarka, ir viršutinį sluoksnį sudarė didelio titro ($\geq 10^{10}$ pfu/mL, 2–4 mL) RaK2 suspen-

sija. Mėginys ultracentrifuga (Optima L-100K ir rotorius SW40, Beckman Coulter) sukamas 73 000×g vidutine jėga (24 000 min⁻¹ dažniu) 4°C, 2–3 val. Priklausomai nuo tankio CsCl gradiente, virionai yra sutelkiami į siaurą matinį sluoksnį. Švirkštu surenkamas ir dializuojamas I tirpale (30 min, 4°C) pusiau pralaidžios membranos žarnoje (14 kDa MWCO, Roth). Dializė kartojama dar tris kartus po 1,5–2 val. II tirpale ir išgrynintas fagas surenkamas į 1,5 mL mėgintuvėlį ir saugomas 4–8°C.

2.2.2.5. *RaK2 genų padauginimas PGR metodu*

Fago RaK2 tiksliniai genai buvo padauginti vykdant PGR fermentiniu mišiniu *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) su specifiskai genams komplementariais pradmenimis (**2 lent.**). Reakcijos mišinio sudėtis: 2 µL RaK2 išgryninto mišinio ($\geq 10^{10}$ pfu/mL) kaip matricinės DNR šaltinis, atitinkamai po 2,5 µM tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų, *Phusion Master Mix* mišinys, bei grynas be nukleazijų vanduo. PGR atliekama termocikleryje (Mastercycler 5345, Eppendorf), nustačius parametrus pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.2.6. *Plazmidžių atranka PGR metodu – kolonijų PGR*

Po transformacijos, ant selektyvios 1,2% LA terpės išaugusios bakterijų kolonijos suspenduojamos į 5 µL LB terpės. Kolonijų PGR atliekama su 2,5 µL bakterijų suspensijos, plazmidei būdingais sekoskaitos pradmenimis ir *Dream-Taq Green PCR Master Mix* (2×) mišiniu (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo nurodymus. Vykdoma DNR elektroforezė 0,7–1,2% agarozės gelyje ir įvertinamas PGR būdu padauginto fragmento dydis. Likęs 2,5 µL bakterijų suspensijos, kurioje buvo nustatyti tikslinio dydžio fragmentai, užsėjamas į LB terpę, praturtintą atitinkamu antibiotiku, ir auginamas plazmidės padauginimui ir išskyrimui.

2.2.2.7. *DNR elektroforezė agarozės gelyje*

Priklausomai nuo DNR dydžio, elektroforezei buvo naudojamas 0,7–1,2% agarozės gelis. DNR elektroforezė vykdoma 25–45 min, esant 7 V/cm arba 135–170 V įtampai (EPS 500/400, Amersham pharmacia biotech), su mėginiais paruoštais *DNA Gel Loading Dye* (6×) dažė (Thermo Fisher Scientific). Gelis dažomas 5–10 min 0,5 µg/mL EtBr tirpale. DNR fragmentų dydžiui įvertinti naudojami standartiniai DNR žymenys, *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific), kurie matomi transiluminatoriaus (UVT-28 ME, Herolab GmbH) skleidžiamoje ultravioletinėje šviesoje.

2.2.2.8. *Plazmidinės DNR padauginimas ir išskyrimas*

PGR būdu atrinktos ir tikslinę pDNR turinčios *E. coli* DH10B kolonijos auginamos LB terpėje su antibiotiku (pJET1.2 ir pET16b – 50 µg/mL ampicili-

no; pET28b – 35 µg/mL kanamicino), esant 180 min⁻¹ ir 37°C apie 16–24 val. Centrifuguojama (2 700×g, 5–30 min, 4°C) ir iš surinktos biomasės išskiriama padauginta pDNR, naudojant *GeneJET Plasmid Miniprep Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific) rinkinį pagal gamintojo nurodymus.

2.2.2.9. DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

DNR hidrolizė buvo vykdoma *FastDigest* restrikcijos endonukleazėmis (RE), NdeI, NheI, BamHI ir SalI (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo nurodymus, o susidarę DNR fragmentai analizuojami atlikus jų elektroforezę.

2.2.2.10. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio

Atlikus elektroforezę mėginiams su RE-azėmis hidrolizuota DNR, tiksliniai fragmentai steriliai išpjaunami iš gelio ir išskiriami naudojantis *GeneJET Gel Extraction Kit* rinkiniu (Thermo Fisher Scientific) pagal jame pateiktą protokolą.

2.2.2.11. RaK2 rekombinantinių baltymų kūrimas

Siekiant išgauti tirpius rekombinantinius baltymus, pilno ir nepilno ilgio RaK2 genų amplikonai buvo klonuojami į pET16b ir pET28b genų raiškos vektorius. Amplikonų padauginimo metu naudotų pradmenų sekos su RE-azių taikiniai yra pateiktos **2 lent.** Atitinkamomis RE-azėmis hidrolizuoti RaK2 genų amplikonai buvo įterpiami T4 DNR ligazės vykdoma reakcija į atitinkamai hidrolizuotus vektorius. Ligavimo reakcija buvo atlikta naudojantis *Rapid DNA Ligation Kit* (Thermo Fisher Scientific) rinkinį pagal jame pateiktą protokolą. Po reakcijos, ligavimo mišiniu transformuojamos imliosios bakterijos ir atliekamas kolonijų PGR. Iš atrinktų kolonijų išskiriamos plazmidės ir jų DNR sekos patikrinamos sekoskaitos (Macrogen, Pietų Korėja) duomenų analizės būdu. Klaidų neturintys plazmidiniai konstruktai panaudojami rekombinantinių baltymų sintezei vykdyti.

2.2.2.12. Rekombinantinių baltymų biosintezės indukcija IPTG

E. coli DE3 genų raiškos padermės (HMS174, Rosetta, Arctic Express arba ER2566), turinčios pET16b/28b su atitinkamai įterptais RaK2 genais auginamos LB terpėje su antibiotiku (50 µg/mL ampicilinu arba 35 µg/mL kanamicinu), esant 37°C ir 180 min⁻¹, apie 2–3 val. Pasiekus bakterijų kultūrai OD₆₀₀ 0,5–0,9, ji atšaldoma 10 min 4°C, kad pasireikštų šalčio šoko sukeltų viduląstelių šaperonų sintezė prieš baltymų sintezės indukciją.

Indukcijos sąlygos: pastovi bakterinės kultūros aeracija su 200 min⁻¹ kratymu, 0,1–1,0 mM IPTG, 17–30°C, apie 5–21 val. Tada centrifuguojama (20 min, 2 700×g, 4°C) ir surinkta biomasė saugoma -20°C arba ardoma ultragarsu. Rekombinantinio baltymo išeiga ir tirpumas įvertinami SDS-PAGE analize, o lizatas naudojamas baltymo grynimui.

2.2.2.13. *Biomasės ardymas ultragarsu*

Surinkta biomasė su indukuotu rekombinantiniu baltymu suspenduojama chromatografijos A tirpale 1:19 santykiu (m/v), pridedama proteinazių slopiklio, [PMSF] = 1–2 mM. Vykdomas 5–10 min ardymas ultragarsiniu homogenizatoriumi (UZDN-2T) su 22 kHz dažniu, esant 30 s ardymo ir 30 s pertraukos ciklams (4°C). Lizatas centrifuguojamas 12 000×g, 45 min, 4°C ir surinktas supernatantas naudojamas baltymo gryninimui.

2.2.2.14. *Baltymų elektroforezė, SDS-PAGE*

SDS-PAGE naudojamas poliakrilamidinis (PAA) gelis, kurį bendrai sudaro 4% koncentruojamasis kartu su 10–14% skirstomuoju arba 4–18% gradientiniu geliais. Užnešimo dažė paruošiami baltyminiai mėginiai, 5–10 min kaitinami 95°C ir suleidžiami į PAA gelį. Apie 20–25 min vykdoma SDS-PAGE baltymų elektroforezės tirpalu užpildytoje vonelėje (Mini-protean tetra cell, Bio-Rad), esant 10 mA srovei (EPS 601, Cytiva) iki mėginiai patenka į skirstomąjį gelį ir esant didesnei 30 mA srovei apie 45–60 min iki dažas pasiekia gelio kraštą. Gelis 2–3 min dažomas karštame 0,1% Kumasi dažo tirpale ir blukinamas SDS-PAGE gelio plovimo tirpale apie 2–3 val. Gelyje pasiskirstę baltymai pilnai išryškinami kelis kartus jį plaunant karštame vandenyje.

2.2.2.15. *Rekombinantinių baltymų gryninimas*

Baltymų gryninimui naudota chromatografinė sistema (AKTA Purifier 100 FPLC system, GE Healthcare Life Sciences) ir 1–5 mL nikelio chelatinė kolonėlė (HiTrap Chelating HP, GE Healthcare Life Sciences), įkrauta Ni²⁺ jonais. Visa sistema pralaunama vandeniu ir užpildoma baltymų chromatografijos A tirpalu. Baltymų detekcijai matuojama 280 nm šviesos bangos sugertis (A₂₈₀). Tikslinį baltymą su His-inkaru turintis supernatantas yra užnešamas ant Ni²⁺ kolonėlės, kuri nuplaunama 6 kolonėlės tūriais (CV) chromatografijos A tirpalu. His-baltymas yra palaipsniui disocijuojamas nuo kolonėlės eliucijos (B) tirpalu į 0,5 mL frakcijas, esant 12 CV ilgio 0–100% eliucijos gradientui.

Atliekama SDS-PAGE analizė, kuria įvertintos frakcijos, turinčios didžiausią ir gryniausią His-baltymo išėigą, yra apjungiamos ir tada vykdoma dializė, pusiau pralaidžios membranos žarnoje (12 kDa MWCO, Sigma-Aldrich), chromatografijos A tirpale, tūrių santykiu 1: 1 000, 4°C, 16–24 val. Išgrynintas baltymas koncentruojamas karboksimetilceliuliozės milteliais, nustatoma koncentracija Lourio metodu ir saugoma esant -20°C.

Baltymų gryninimui denatūruojančiomis sąlygomis buvo naudojami chromatografijos tirpalai A1k/B2k, praturtinti 6 M karbamidu. Netirpi lizato frakcija buvo maišoma ir tirpinama apie 1 val., esant 20 ±3°C tirpale A1k su 6 M karbamidu. Po centrifugavimo (30 min, 16 000×g) surenkama ištirpusi dalis,

kuri naudojama gryninimui. FPLC sistemos paruošimas ir baltymo gryninimas atliekamas denatūruojančios sąlygos pagal ankstesnį aprašymą.

2.2.2.16. Baltymų koncentracijos nustatymas Lourio metodu

Rekombinantinių baltymų koncentracijos nustatymui naudojami A, B ir Folino ir Čiokateu fenolio reagentai, o matavimai atliekami spektrofotometru (*Helios γ*, Thermo Fisher Scientific). Procedūra atliekama vadovaujantis Lourio pateikta metodika²¹⁴ ir laboratorijoje pagal jaučio serumo albumino standartus (50–300 µg/mL) sudaryta kalibracine kreive, kuri buvo išreikšta tiesės lygtimi:

$$C_B = (A_{750} - 0,003) / 0,00257 \times SV,$$

kurioje C_B yra baltymo koncentracija, µg/mL, A_{750} – 750 nm ilgio šviesos bangos sugerties reikšmė 1,0 cm pločio kiuvetėje ir SV – mėginio skiedimo veiksnys, kartais.

2.2.3. Imunologiniai ir mikroskopinės analizės metodai

2.2.3.1. Triušių imunizacija RaK2 rekombinantiniais baltymais

Imunologiniai tyrimai buvo atliekami Inovatyvios medicinos centre, konsultavo dr. Irena Dumalakienė. Tyrimų su gyvūnais licencija Nr. 0209 buvo suteikta Lietuvos valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos nuo 2010 lapkričio 11 d.

Antiserumai prieš išgrynintus rekombinantinius RaK2 baltymus kaip antigenus buvo išgauti imunizuojant sidabrinis triušius po 4×0,25 mg kiekvieno baltymo vienam triušiui. Kiekviena 1 mL dozė paruošiama skiedžiant 0,25 mg baltymo su 50 mM Tris, 10% glicerolio, pH 8,0 ir laikoma -20°C prieš imunizaciją. Procedūra atliekama kas dvi savaites, naudojant 1 mL atšildytos dozės, sumaišytos (1:1, v/v) su pilnu Freundo (1-ajai imunizacijai) arba nepilnu Freundo adjuvantu (2–4 imunizacijai). Paruošta suspensija insulino švirkštu suleidžiama dalimis po 8×0,2 mL į triušio poodinį sluoksnį ir po 2×0,2 mL – į raumeninį audinį. Praėjus dviem savaitėms po paskutinės imunizacijos, surenkamas triušio kraujas. Po paros šaltai nusistovėjęs ir sukrešėjęs kraujas yra centrifuguojamas (20 min, esant 1 500×g, 4°C) ir išskiriamas serumas su specifiniais antikūnais. Išskirtas antiserumas (gelsvai rausvos spalvos supernatantas) saugomas -80°C²¹⁵.

2.2.3.2. RaK2 infekcijos slopinimas antiserumais

Prieš kiekvieną RaK2 rekombinantų baltymą išgautas antiserumas buvo panaudojamas bakteriofago infekcijos slopinimo tyrime. Atskiri RaK2 suspensijos mėginiai ($\approx 10^{10}$ pfu/mL) švelniai maišantis veikiami, praskiestu 100 kartų PBS_{bis} tirpale, skirtingu antiserumu, esant 20 ±3°C, apie 1 val. Tuomet titruojant nustatomi mėginių infektyvaus bakteriofago kiekiai, o lyginant reikšmes su kontrole (antiserumu nepaveiktu bakteriofago kiekiu) įvertinimas antiserumų slopinamasis poveikis bakteriofago infekcijai. Titravimo duomenys išreiškiami rekšmių vidurkiais iš keturių eksperimento pakartojimų duomenų (n=4) logarit-

minėje skalėje. Apskaičiuojami standartiniai nuokrypiai ($\pm$ SD) ir įvertinamas slopinimo reikšmingumas, atliekant dvipusį „Studento“ testą nepriklausomiems mėginiams.

2.2.3.3. RaK2 adsorbcijos slopinimas

Vykdam centrifugavimą (2,5 min, $20 \pm 3^\circ\text{C}$, $15\,200\times g$), iš 0,5 mL *Klebsiella* sp. KV3 bakterijų suspensijos (37°C , $180\,\text{min}^{-1}$, 1–2 val., OD_{600} 0,8–1,0) surenkama biomasė. Ji plaunama 0,25 mL 0,2 M natrio fosfato, pH=6 tirpalu ir $2\times 0,5$ mL sterilaus vandens, ir galiausiai suspenduojama į 0,075 mL 20 mM natrio fosfato, pH=6 tirpalą. Atskirai suspensijos yra 30 min (37°C) veikiamos 10 μg gp531, 15 μg gp098C, abiejų baltymų kiekių mišiniu ir 25 μL buferiniu tirpalu (kontrolė). Po poveikio surenkamos biomasės ir plaunamos LB terpe, joje praskiedžiamos iki 5,0 mL ir atskirai vykdoma 8 min adsorbcija, visiems mėginiams vienodu, RaK2 fago kiekiu, esant 0,5–1,0 MOI. Siekiant įvertinti poveikį bakteriofago adsorbcijai, po centrifugavimo (20 min, $2\,700\times g$, 4°C), buvo atliekamas supernatantų titravimas ir infektyvių virionų kiekio nustatymas.

RaK2 adsorbcijai netiesioginis^a gp098 ir gp531 poveikis įvertinami lyginant fagų kiekių reikšmes su dviem kontrolėmis: (1) pradinio fago kiekiu, naudotu kiekvienam mėginiui, tačiau paruoštu LB terpėje ir (2) laisvu fagų kiekiu, likusiu po pradinės adsorbcijos ant baltymais nepaveiktų KV-3 bakterijų. Duomenys išreiškiami procentinių reikšmių vidurkiais su apskaičiuotais $\pm$ SD ($n=6$). Atliekant dvipusį „Studento“ testą nepriklausomiems mėginiams, įvertinamas baltymų netiesioginio poveikio reikšmingumas RaK2 adsorbcijai ant KV-3 ląstelių.

2.2.3.4. „Western blot“ analizė

„Western blot“ analizė buvo atliekama išskirtų antikūnų reaktyvumo ir RaK2 baltymų biosintezės pradžios nustatymui. RaK2 biosintezės tyrime *Klebsiella* sp. KV-3 bakterijos (OD_{600} 0,3–0,5, 30°C , $180\,\text{min}^{-1}$, 50 mL) užkrečiamos RaK2, MOI = 2. Infekcija vykdoma 50 min ir kas 10 min paimamas 2 mL mėginys, iš kurio surenkama biomasė (1 min, $12\,000\times g$, 4°C), kuri netrukus užšaldoma -80°C , kad nuslopinti viruso vystymąsi.

Atliekama surinktiems mėginiams SDS-PAGE gradientiniame 4–18% PAA gelyje, kuris laikomas 15–20 min baltymų pernašos tirpale ($25\text{--}20^\circ\text{C}$). Tuo tarpu, atitinkamai paruošiamos, pagal gamintojo rekomendacijas, nitroceliuliozės arba PVDF membranos (Thermo Fisher Scientific) ir sudedamas baltymų pernašos buferiniame tirpale išmirkytas „Western blot“ *sumuštinis*. Jame tarp dviejų 5 mm storio „Whatman“ popieriaus lakštų yra arčiau katodo paklotas ir

^a netiesioginis, nes RaK2 adsorbcija vyksta ant bakterijų, tačiau jos yra paveiktos baltymu, kas turi įtakos viruso adsorbcijai.

membrana uždengtas PAA gelis. Vykdoma drėgna pernaša 15 arba 3 val., esant atitinkamai 80 arba 400 mA srovei.

Membrana blokuojama 3% BSA arba 1% pieno miltelių (pm) mišiniu 45–60 min, esant $20 \pm 3^\circ\text{C}$ su lengvu maišymu arba 1–1,5 paros be maišymo, tačiau laikoma šaltai ($4\text{--}8^\circ\text{C}$) ir apversta, į tirpalą panardintais baltymais. Membrana veikiama 90–120 min ($20 \pm 3^\circ\text{C}$) polikloniniu antiserumu, praskiestu 100–5 000 kartų 1% BSA arba 1% pm blokavimo mišinyje. Tada plaunama $4 \times 3\text{--}5$ min PBST ir 45–60 min veikiama antriniais antikūnais, konjuguotais su peroksidaze arba fluoroforu²¹⁶. Plovimai kartojami, o paskutinis yra atliekamas su PBS prieš „Western blot“ baltymų-antikūnų sąveikos nustatymą.

Antikūnų sąveikos vieta membranoje aptinkama, vykdant peroksidazės DAB substrato hidrolizės reakciją (susidaro rusvos spalvos junginys); arba matuojant raudonos šviesos (700 nm) sužadintą fluorescenciją (Odyssey 9120, Li-Cor).

2.2.3.5. *RaK2 žymėjimas aukso nanodalelėmis ir TEM analizė*

Antiserumai, išgauti naudojant RaK2 rekombinantinius baltymus, skiedžiami 35–100 kartų gardelės tirpale ir veikiami (1:1, v/v) 2 min su išgryninto bakteriofago suspensija ($\approx 10^{10}$ pfu/mL). Po sąveikos, 30 μL mišinio pilama į silikoninio padėkliuko šulinėlį (Agar Scientific) ant kurio dedama nikelio-vario TEM gardelė (Agar Scientific) ir 15–25 min mėginys paliekamas adsorbuotis 37°C termostate. Gardelę plaunama gardelės tirpalu $3\text{--}5 \times 1$ min ($20 \pm 3^\circ\text{C}$) ir veikiama 15–25 min aukso dalelėmis konjuguotais antikūnais, 30–100 kartų praskiestais gardelės tirpale, esant 37°C . Pakartojami plovimai ir gardelėje padengti mėginiai išryškinami 2% uranilo acetato tirpalu 1–1,5 min, esant $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Ore išdžiovintos gardelės analizuojamos su transmisinių elektronų mikroskopu (268D, Morgagni), esant 140 000–180 000 kartų didinimui. TEM analizės buvo atliekamos Biotechnologijos instituto eukariotų genų inžinerijos skyriuje, konsultuojant dr. Justui Lazutkai ir dr. Alionai Avižieninei, o didesnės raiškos TEM mikrografijas (Tecnai G2 F20 X-TWIN) padarė Fizinių ir technologijos mokslų centro (FTMC) mokslininkas dr. Martynas Skapas.

2.2.3.6. *RaK2 analizė atominių jėgų mikroskopu (AFM)*

Šviežiai atskeltas homogenišką paviršių turintis žėručio (IV laipsnio, SPI Supplies. Inc.) sluoksnis buvo modifikuotas 0,01% poli-L-lizino tirpale, 30 min $20 \pm 3^\circ\text{C}$ ir tuomet padengtas 10 μL CsCl gradientu išgryninta RaK2 suspensija ($1,6 \cdot 10^{10}$ pfu/mL), paruošta 0,02 M natrio fosfato, 0,15 M NaCl (pH 8,1) tirpale. Po 2 min inkubacijos, mėginys nuplaunamas *milli-Q* vandeniu ($18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$), nusausinamas po N_2 dujų srove ir analizuojamas atominių jėgų mikroskopu (Dimension Icon AFM, Bruker), esant pastovios amplitudės baksnojimo režimui (ore) su mikrogembėje pritvirtintu zondų (TESPA, Bruker), kurios nominali spyruoklės konstanta 2–40 N/m. Vaizdai analizuoti naudojant programinę įrangą

NanoscopeAnalysis v1.9. AFM analizę atliko dr. Marija Jankunec Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje (Biochemijos institutas).

2.2.4. Depolimerazės charakterizavimo metodai

2.2.4.1. Depolimerazinio aktyvumo skaidrių zonų testas

Klebsiella sp. KV-3 bakterijos (OD_{600} 0,3–0,5, 37°C, 180 min⁻¹) sumaišomos su 2,5 mL 0,5% LA terpe, užpilamos ant Petri lėkštės su 1,2% LA ir paliekamos 5–15 min džiūti, esant 20 ±3°C. Paruošti nuoseklūs rekombinantinio baltymo ir fago skiedimai LB terpėje yra lašinami po 4 µL ant užpiltų bakterijų paviršiaus lėkštelėje. Išdžiūvus lašams, inkubuojama 30°C, 16–24 val. Užaugusių bakterijų sluoksnyje, lašinimo vietoje, įvertinamos galimai susidariusios skaidrios zonos. Baltymų stabilumas įvertinamas pakaitinant mėginius 15 min 46–66°C temperatūroje prieš skaidrių zonų testą (*spot test*).

2.2.4.2. Depolimerazės substratų pirminė atranka

Siekiant įvertinti RaK2 gp531 depolimerazės specifiškumą substratams, panaudoti įvairūs komerciniai junginiai, būtent: (i) 4-nitrofenilo ir 5-bromo-4-chloro-3-indolilo dariniai; (ii) oligo ir polisacharidai (**3P lent.**).

Reakijų sudėtys: (i) 1 mM chromogeninio junginio, 1 µg gp531, 50 mM Tris, pH 8 buferinis tirpalas, 100 µL bendras tūris; (ii) 2 mM oligosacharidų arba 3 mg/mL polisacharidų, 3 µg gp531, 20 mM natrio fosfatinis tirpalas, pH 6, 20 µL bendras tūris.

Reakijų sąlygos: (i) 30°C, 1–2 val. (TS-100, Biosan) ir susidarę produktai analizuojami spektrofotometru, matuojant 405 arba 615 nm sugertį; (ii) 37°C, 16–18 val., analizuojama TLC.

2.2.4.3. Plonasluoksnė chromatografija (TLC)

Po 1–2 µL mėginio užnešama ant silikageliu padengtos plokštelės (60 F254, Merck; 40±1 mm). Sausa plokštelė įstatoma į TLC celę su 0,5–1,0 mL judrios fazės ir bent vieną kartą apie 20 ±5 min vykdoma TLC. Priklausomai nuo analizuojamų junginių, jų atskyrimui naudotos skirtingos judriosios fazės:

- ☉ 1-proOH: EtOAc: H₂O (6:1:3, v/v/v) – polisacharido hidrolizės produktams;
- ☉ 1-butOH: EtOH: H₂O (5:3:2, v/v/v) – ANTS-/ mono-/ disacharidams.

Junginių aptikimas TLC plokštelėje: sacharidai išryškinami padengiant 1% anyžio dažų ir pakaitinant; arba 365 nm ultravioletinė šviesa (UV-8 M/L, Herolab) sukelia ANTS modifikuotų sacharidų fluorescenciją.

2.2.4.4. Polisacharido išskyrimas iš *Klebsiella* sp. KV-3

Naktinė *Klebsiella* sp. KV-3 kultūra persėjama į dešimt kartų didesnę LB terpės tūrį, kuriame bakterijos auginamos 37°C termostate 9–11 dienų. Tada

įpilama 37% formaldehido tirpalo 60 µL/ 10 mL bakt. suspensijos ir švelniai maišoma traukos spintoje ($20 \pm 3^\circ\text{C}$ apie 1 val.). Pridedama 1 M NaOH 5 mL/10 mL ir intensyviai maišoma dar 3 val.

Centrifuguojama ($12\,000\times g$, 4°C , 45–60 min) ir surenkamas supernatantas, kuris filtruojamas per 0,4 µm membraną (Supor 47 mm, Pall Life Sciences) ir naudojantis ultrafiltravimo sistema su 10 kDa MWCO membrana sukonzentruojamas iki 1/10 pirminio tūrio, kuris dializuojamas vandenyje 4°C , 16–24 val.

Pridėjus TCA rūgšties (20%, m/v) į mišinį, išsodinami baltymai ir nukleorūgštys. Nuosėdos pašalinamos po centrifugavimo ($12\,000\times g$, 4°C , 1 val.) ir išskiriamas polisacharidas iš surinkto supernatanto 96% etanolio (galutinė 58–60% konc., -20°C , 16–24 val.). Tada polisacharidas surenkamas centrifuguojant, jis ištirpinamas vandenyje, perkeliamas į dializės žarną ir vandeniu vykdoma dializė (4°C , 16–24 val.). Galiausiai surinktas mėginys išdžiovinamas šalčiu (Alpha 2-4 LSCbasic, Martin Christ)^{217,218}.

2.2.4.5. Polisacharido skaidymas rekombinantiniu gp531

Išskirtas polisacharidas iš *Klebsiella* sp. KV-3 bakterijų buvo naudojamas kaip gp531 substratas vykdant depolimerazinę reakciją. Reakcija atliekama 20 mM natrio fosfatiniame, pH 6 tirpale su 0,15–12 mg polisacharido ir 3–25 µg gp531, 30°C 0,5–20 val. Tuomet reakcijos mišiniuose slopinamos, praskiedus mėginius ACN iki 50%, o netirpios nuosėdos pašalinamos iš mėginio po centrifugavimo 8 min, $12\,000\times g$.

Supernatantas analizuojamas TLC ir HPLC-MS metodais, siekiant nustatyti susidariusius junginius arba panaudojamas sacharidų modifikacijos reakcijoms. Laukinio tipo (wt) polisacharidų hidrolizei naudojama atplauta *Klebsiella* sp. KV-3 bakterijų biomasė, kuri buvo surinkta po 2 val., 2 ir 11 parų kultyvavimo. Detalesnis procedūros aprašymas yra 2.2.3.3. skyrelyje.

2.2.4.6. Sacharidų HPLC-MS analizė

Polisacharidų hidrolizės mėginiai, komerciniai mono- ir disacharidai bei chemiškai modifikuoti (redukuoti ir derivatizuoti) sacharidai buvo analizuojami naudojant didelio efektyvumo skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos (HPLC-MS) sistemą (Shimadzu), turinčią fotodiodų matricos (PDA) detektorių ir masės spektrometrą (LCMS-2020, Shimadzu) su elektropurškimo jonizacijos šaltiniu. Junginių atskyrimas atliekamas naudojant C18 chromatografinę kolonėlę (3×150 ; Pack Pro C18, YMC) 40°C temperatūroje ir judriąją fazę, kurią sudarė 0,1% skruzdžių rūgšties arba 10 mM amonio karbonato vandeninis tirpalas (A) ir acetonitrilas (B). Eliucija buvo atliekama 12 min 5–95% gradiento režimu. Jonų masių matavimo sritis apėmė 250–2 000 m/z ribas. Teigiama ir neigiama jonizacija buvo vykdoma, esant 350°C temperatūrai jonizacijos celėje ir ± 4500 V įtampai su N_2 dujomis, skirtomis mėginio aerozolio gavimui ir

išdžiovinimui. Mėginių jonizacijos duomenys analizuojami naudojant „LabSolutions“ spektrometrijos programinę įrangą.

2.2.4.7. Sacharidų redukcija NaBH_4

Polisacharido hidrolizės su gp531 produktai, gauti iš 0,6 mg polisacharido kiekio, buvo redukuojami tamsoje naudojant 0,15 M NaBH_4 , pagamintame 2,5 mM KOH bendrame 200 μL tirpale, $20 \pm 3^\circ\text{C}$, 16 val. Po reakcijos, pridedama 15% mėginio tūrio 2 M acto rūgšties.

L-fukopiranozė (L-Fucp), D-gliukopiranozė (D-Glcp), D-gliukopironuroninė rūgštis (D-GlcpA) ir D-celobiozė (D-Cell) buvo redukuojami su tris kartus didesniu reduktoriaus molių kiekiu ir naudojami kaip kontrolės. Išdžiovinti vakuuminiame koncentratoriuje (Speedvac SPD2010, Thermo Savant) ir ištirpinti vandenyje mėginiai buvo analizuojami TLC ir HPLC-MS.

2.2.4.8. Sacharidų derivatizacija ANTS

Depolimerazės gp531 katalizuojamos polisacharido hidrolizės produktai (iš 12 mg, 25°C , 16 val.) derivatizuojami naudojant 250 μL tirpalą, paruoštą (1:1, v/v) iš: 0,2 M ANTS (2,62 M acto rūgštyje) ir 1 M NaCNBH_3 (DMSO tirpiklyje). Derivatizacijos mišinys sumaišomas su išdžiovintais reakcijos produktais ir reakcija vykdoma 37°C iki 24 val. Išdžiovinus reakcijos mišinį vakuuminiame koncentratoriuje, susidarę junginiai ištirpinami vandenyje ir iš jų esantis ANTS-tetrasacharidas išgryninamas chromatografijos būdu.

Kontroliniams sacharidams (L-Fucp, D-Glcp, D-GlcpA, D-Cell) derivatizacija ANTS buvo atlikta vykdant reakciją medžiagos kiekio santykiu 6:5:25, atitinkančiu sacharidą: ANTS: NaCNBH_3 . Galiausiai paruošiami ANTS derivatizuotų junginių vandeniniai tirpalai tolimesniems tyrimams.

2.2.4.9. ANTS-tetrasacharido gryninimas

ANTS modifikuotas tetrasacharidas (susintetintas, vykdant išskirto KV-3 polisacharido skaidymą gp531 ir cheminę modifikaciją ANTS) buvo išgrynintas naudojantis chromatografine sistema ir paeiliui dvi, DEAE (Hitrap, GE healthcare) ir nudruskinimo *Sephadex SG10* (Pharmacia Fine Chemicals, Švedija), kolonėlės. Pirmu etapu, jonų mainų chromatografijos A ir B tirpalais, pagal chromatografijos eliucijos/ gradiento žingsnius: 0–50% gradientas su B tirpalu per 8,2 CV; 50% B, 18,5 CV; 50–100% B, 8 CV; 100% B, 15 CV – pašalintas nesureagavęs ANTS, matuojant A_{365} ir frakcijų grynumą įvertinant TLC analize. Apjungus ir išdžiovinus grynas frakcijas iki 0,5 mL, jame esantis ANTS-tetrasacharidas buvo išgryninamas nuo didelės druskų konc. Šiame etape buvo naudojama SG10 kolonėlė (10×370; 30 mL sorbento), praplauta 3 CV vandens, o užneštas mėginys sudarė 3% CV. Vandeniui surinktos frakcijos,

turinčios mažiausią druskų kiekį ir ANTS-tetrasacharidą panaudotos kitiems tyrimams.

2.2.4.10. Sacharidų hidrolizė TFA rūgštimi

Siekiant nustatyti oligosacharidų redukuojantį galą, gp531 reakcijos katalizuojami produktai, jų NaBH₄ arba ANTS reakcijų metu susidarę junginiai ir ANTS-celiuliozė buvo 10–180 min hidrolizuojami 4,0 M TFA rūgštimi, esant 90°C. Po hidrolizės, TFA rūgštis buvo išgarinama vakuuminiame koncentratoriuje, o susidarę junginiai ištirpinami vandenyje ir įvertinami TLC ir HPLC-MS analizėmis.

2.2.4.11. Santykinis gp531 aktyvumas skirtingomis sąlygomis

Siekiant įvertinti optimalias gp531 veikimo sąlygas, fermentinės reakcijos buvo vykdomos 10–70°C ir pH 3–10 sąlygomis. Susidarę produktai analizuojami TLC ir HPLC-MS metodais. Remiantis HPLC-MS duomenis (n=4), apskaičiuotas santykinio gp531 aktyvumo vidurkis, išreikštas procentais su standartiniais nuokrypiais (±SD). Skaičiavimams naudoti jonų masių signalų, 663⁻ ir 687⁺ m/z, atitinkančių pagrindinį gp531 katalizuojamos polisacharido hidrolizės produktą (tetrasacharidą), intensyvumų plotų reikšmės, atėmus kontrolines, kai HPLC sulaikymo laikas yra 2–4 min srityje.

Aktyvumo priklausomybę nuo temperatūros įvertinančias reakcijas sudarė: 45 µg išskirto *Klebsiella* sp. KV-3 polisacharido ir 0,3 µg gp531 ištirpinti 20 mM natrio fosfato, pH 6 tirpale. Reakcijos vykdomos 90 min, esant 10–70°C, naudojantis PGR aparatu (Eppendorf, 5345 Mastercycler). Kontrolė buvo mėginys (20°C), kuriame fermentas išveiklinamas, reakcijos laikui pasiekus <5 min.

Aktyvumo priklausomybę nuo pH įvertinančias reakcijas sudarė: 75 µg polisacharido ir 1 µg gp531 ištirpinti 50 mM pH 3–10 tirpaluose (citrato, pH 3–6; Tris, pH 7–9; natrio borato, pH 10). Reakcijos vykdomos 20°C, 16 val. Neigiama kontrolė buvo reakcijos mėginys be baltymo, ištirpintas 50 mM citrato, pH 3 tirpale.

Visuose mėginiuose fermentas išveiklinamas ACN, surenkama (8 min, 20°C, 12 000×g) tirpi frakcija ir analizuojama TLC ir HPLC-MS metodais.

3. REZULTATAI

3.1. RaK2 baltymų bioinformatinė analizė

Moksliniuose straipsniuose aprašyta, kad fagų adsorbcijos kompleksą sudarantys baltymai, ypač uodegaspygliai ir ataugėlės, įprastai formuoja homotrimerines struktūras, todėl naudojantis „AlphaFold2“ įrankiu atitinkamai buvo modeliuojamos mono- ir trimerinės gp098, gp526–534 RaK2 baltymų struktūros. Struktūrinių homologų paieška PDB duomenų bazėje buvo atlikta „Dali“

įrankiu, o pateiktos sekos išanalizuotos „Hhpred“. Detalesni analizių rezultatai pateikti priede **Nr. 1**, o baltymų nustatytų domenų pozicija ir santykiniai dydžiai aminorūgštimis pateikti **2P pav.**

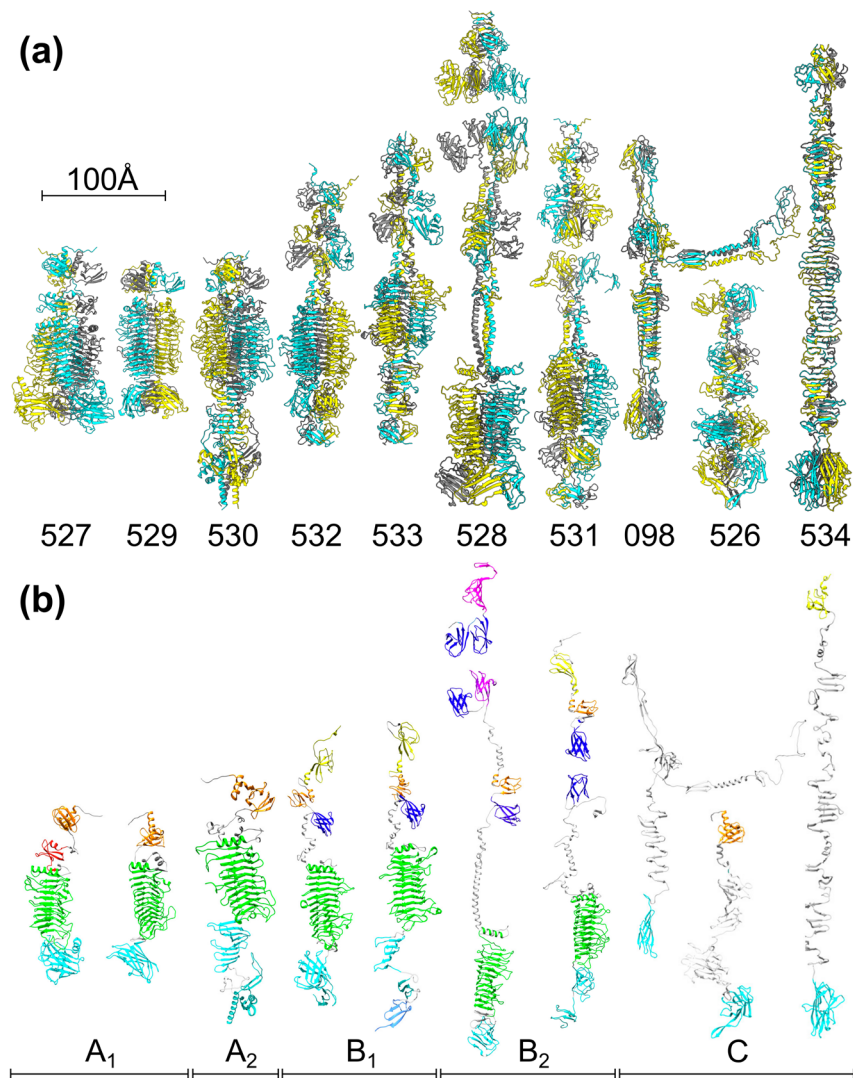
Iš ankstesnių RaK2 tyrimų¹⁰⁰ yra žinoma, kad bent dešimt baltymų (gp098 ir gp526–534) sudaro jo adsorbcijos kompleksą, todėl šia bioinformatine analize buvo siekiama nustatyti baltymų struktūrinius elementus, kuriais galimai formuojama ilgoji šakotoji ataugėlė ir įvertinti jų biologines funkcijas. Siekiant nuoseklesnio modelių aprašymo ir sutelkiant dėmesį į esminius dalykus, sugeneruoti modeliai buvo sugrupuoti į tris grupes, atsižvelgiant į baltymų struktūrinės sritis ir bendrą panašumą su TSP baltymais. Taip pat jų patikimumas buvo įvertintas pagal pLDDT skalę (**3P pav.**), kuri rodo, kad mažiausiai patikimi struktūriniai elementai numatyti gp098, gp528 ir gp534 baltymams. Panašumas, pagal kurį buvo grupuojami RaK2 baltymų modeliai, yra susijęs su tipiniais TSP, kuriuos sudaro dvi pagrindinės dalys: „galva“, kurioje yra N-terminaliniai domenai (NTD), formuojami iš β -sumuštinių ir „kūnas“, kuriame paprastai yra centrinis domenas (CD), atsakingas už fermentinį aktyvumą ir sudarytas iš tvarkingai susijungusių β -spiralių, o gale yra C-terminaliniai domenai (CTD), sudaryti iš β -klosčių. Dažnai šias dvi baltymo dalis skiria išreikšta „kaklo“ struktūra – trigubos α -spiralės motyvas. Taigi, sumodeliuotos struktūros buvo sugrupuotos (**21 pav.**) į: A₁ – artimos TSP, tačiau turinčios mažai išreikštą „kaklo“ motyvą (gp527 ir gp529); A₂ – panašios į A₁ grupę, tačiau papildomai turinčios TSP nebūdingus CTD (gp530); B₁ – panašios į TSP, tačiau su labiau išreikštu „kaklo“ motyvu ir daugiau nei du NTD turinčia „galvos“ struktūra (gp532–533); B₂ – panašios į B₁, tačiau N gale turinčios ypač ryškų „kaklo“ motyvą ir „galvos“ struktūroje esančius keturis ar daugiau NTD (gp528 ir gp531); C – mažai panašios ir bendrai išsiskiriančios unikaliomis baltymų struktūromis (gp098, gp526 ir gp534).

A grupės struktūros yra panašiausios į tipinius TSP. Po vieną ir du NTD atitinkamai turi gp529 su gp530 ir gp527, kurie sudaryti iš trigubo β -klosčių sumuštinio ir atitinkamai homologiški CBA120 TSP_{1,4} ir TSP_{1,2} baltymų savitiems D domenams^{21,166,219,220}. Visiems šiems baltymams sumodeliuotas CD, depolimerazinio aktyvumo regionas, sudarytas iš trigubos β -spiralės, tačiau struktūriniai homologai skiriasi. Įdomu, kad gp530 turi du CTD, kurių pirmasis suformuoja trikampę prizmę iš atskirų polipeptidų. Antrasis CTD₂ yra homologiškas T5 L-formos ataugėlės pb1 C galo vidumolekulinio šaperono domenui (endošaperonui), kuris skatina pb1 susisukimą ir vėliau yra atskeliamas, o likusi natyvaus baltymo dalis, yra nustatyta²²¹, kad sąveikauja su oligomanoze. Taip pat įdomu, kad gp529 CTD yra homologiškas T4 gp9 baltymo C daliai, atsakingai už prisijungimą prie ilgosios T4 uodegos ataugėlės gp34²²². Tuo tarpu gp527 CD ir CTD struktūros yra panašios į CBA120 TSP₄ C galo domeną²¹.

B₁ grupės baltymai (gp532 ir gp533) išsiskiria nuo A grupės tuo, kad turi papildomai po du NTD ir CTD domenų, o „galvos“ struktūrą atskiria aiškus trigubos α -spiralės motyvas. Tuo tarpu B₂ grupės baltymai yra gp528 ir gp531, kurie turi dar didesnę (iki 5 NTD) „galvos“ domenų skaičių su dar labiau išreikštu α -spiralės motyvu, kuris gp528 atveju yra atskiriamas dvejomis trimerinėmis antiparalelinėmis β -statinaitės struktūromis, kurias jungia triguba kilpa. Baltymams gp531, gp532 ir gp533 numatyti po du domenų, homologiškus savitiems CBA120 TSP1–3 D1 ir D2, kurie sudaryti iš trigubų β -sumuštinių ir atsakingi už baltymo-baltymo sąveiką. NTD domenai, homologiški CBA120 TSP4 XD2 (T4 gp10 D2 analogai), kurie sudaryti iš trigubų β -sumuštinių ir sąveikauja su D domenais, buvo nustatyti: po vieną gp532 ir gp533 baltymuose, du – gp531 ir penki – gp528^{21,166,219,220}. Visuose B grupės baltymuose taip pat aptikta CD depolimerazės sritis, daugiausiai homologiška phi29 gp12²²³. Baltymuose gp531 ir gp532 nustatyta po du CTD, kurių pirmasis sudaro trigubą β -sumuštinių ir homologiškas T4 gp9 sričiai, esančiai tarp dviejų gp9 baltymo-baltymo sąveikos domenų²²². Tuo tarpu gp533 CTD1 sudaro trikampę β -prizmę, homologišką P22 gp9⁶⁵, tačiau „Hhpred“ analizė parodė gp533 CTD1,2,3 sekų homologiją CBA120 TSP2 C galui¹⁶⁶. Mažas modelio patikimumas buvo nustatytas gp528 vieninteliam CTD (**2P pav.**), kuris struktūriškai homologiškas *Clostridium histolyticum* kolagenazės baltymui, kas veikiausiai rodo, kad gp528 CTD skatina bakteriofago prisijungimą prie bakterijos²²⁴. Neįprasta struktūrinė homologija su tirozino fosfatazės baltymu matoma gp532 CTD²²⁵. Likę gp531 ir gp533 baltymų CTD yra struktūriškai homologiški uodegaspyglių baltymams kaip CBA120 TSP2, 3^{166,220} ir phi92 gp150^(nepublikuota).

C grupės baltymai turi unikaliausią struktūrą ir mažiausiai panašūs įprastiems TSP. Šios grupės baltymuose (gp098, gp526 ir gp534) nebuvo nustatyta depolimerazės sritis CD, o struktūrinė homologija daugiausia siejasi su bakteriniais baltymais. Tik gp526 ir gp534 nustatyti NTD domenai struktūriškai homologiški atitinkamai CBA120 D1 ir D2. „AlphaFold2“ sumodeliavo gp534 trimerinę „stiebo“ struktūrą, kurios C galo domenai yra struktūriškai homologiškas žmogaus ektodisplasinui, kuris pasižymi receptorių prijungiančia savybe²²⁶. Gp526 „kūną“ sudaro du trikampiai²²⁷ ir du β -sumuštinių domenai. Pirmasis iš pastarųjų yra struktūriškai homologiškas bioplėvelės glikanus modifikuojančio fermento WceF (*Pantoea stewartii*) C galui²²⁸, o antrasis – fago phiAB6 TSP (*A. baumannii*)²²⁹. Mažo patikimumo modelis buvo sugeneruotas gp098, tikėtina, dėl jo unikalios aminorūgščių sekos, kuriai panašių struktūrų dar nėra nustatyta. Didesniu patikimumu sumodeliuotas gp098 C galas, sudarytas iš penkių antiparalelių β -klosčių su paraleliu β -klosčių β -spiralės motyvu ir β -sumuštinio domeno, kuris turi struktūrinę homologiją su *P. aeruginosa* R2 piocino ataugėle, pasižyminčia RBP savybėmis²³⁰.

Taigi, visi sugeneruoti RaK2 baltymų struktūriniai modeliai yra savitai unikalus ir pasižymi tiksliai struktūrine domenų ar jų daline homologija nustatytoms baltymų struktūroms PDB duomenų bazėje. Tik gp527, turi beveik viso baltymo artimą struktūrinį homologą. Baltymo gp527 trimerinė „kūno“ dalis, be NTD, artimai persidengia su CBA120 baltymu TSP4ΔN.



21 pav. RaK2 baltymų bioinformatinė analizė: „AlphaFold2“ trimeriniai baltymų modeliai (a) ir baltymų monomerai su pažymėtais homologiškais struktūriniais motyvais, nustatytais „Hhpred“ ir „Dali“ įrankiais (b). Spalvos žymi: (a) **geltona**, **žydra** ir **pilka** – atskirus polipeptidus; (b) **rožinė** – „inkaro“ domeną, dalyvaujantį ataugėlės prijungime prie bazinės plokštelės; **mėlyna** ir **violetinė** – XD2 ir XD3, homologiškus T4 gp10 D2 ir D3; **oranžinė**, **geltona** ir **raudona** – D1, D2 ir D3', homologiškus CBA120 savitiems N galo domenams; **žalsva** – depolimerazės sritis, sudarytus iš β-spiralių; **žydra** ir **melsva** – C-galinius; **pilka** – tarpdomenines jungtis arba sritis, homologiškas kitiems bakteriofagų

kilmės baltymams. Struktūrinės grupės: **A₁** – panašūs į tipinius TSP; **A₂** – panašūs į **A₁** grupės baltymus, tik C gale turi endošaperoną; **B** – tipiniai TSP su baltymų prisijungimo domenais (**B₁₋₂**) ir turintys ypač išreikštas trigubos α -spiralės sritis (**B₂**); **C** – nepanašūs į TSP ir unikalios struktūros.

Kadangi gp530C struktūra pasižymi homologija endošaperonui, kuris fagų baltymuose dažniausiai yra proteolitiškai atskeliamas, todėl gp530 aminorūgščių seka buvo analizuojama „MMAFT“ bioinformatiniu įrankiu, palyginant ją su kitais baltymais: GA1 gp12, Φ K1-5 gp46, K1E endoNE, Φ 63D endoN, T5 pb1, 29 gp12, PZA gp12, B103 gp12 ir K5 KlfA²³¹. Nustatyta, kad gp530 taip pat turi konservatyvias endošaperonui būdingas sritis (**4P pav.**), iš kurių trijose yra identiškos aminorūgštys. Viena iš jų – serinas, VSDENYK (gp530) sekoje, kurioje yra proteinazių taikynys tarp serino ir asparto r., o tai reiškia, kad gp530 endošaperonas tikriausiai taip pat nuskeliamas.

3.2. Rekombinantinių RaK2 baltymų sintezė ir gryninimas

Adsorbcijos komplekso tyrimo metu, siekiant ištirti jame esančių ilgųjų ataugėlių baltymų sudėtį ir galimą aktyvumą, buvo klonuojami RaK2 genai, koduojantys gp098 ir gp526–532 baltymus. Jų amplikonai buvo padauginami vykdant PGR su atitinkamais pradmenimis (**2 lent.**) ir įterpti į genų ekspresijos vektorius pET16b ir pET28b, siekiant sukurti rekombinantinius baltymus su His $\times$ 10 ir His $\times$ 6 inkarais (*His-Tag*), esančiais polipeptidų N galuose. Šis rekombinantinių baltymų kūrimas buvo pagrįstas supratimu, kad virusų uodegos ataugėlių baltymų C galuose yra domenai, skatinantys polipeptido tikslingą susisukimą ir baltymo oligomerizaciją, todėl N gale įvesta modifikacija galimai turės mažesnę įtaką jo struktūrai ir savybėms^{169,183,232}.

Taigi, siekiant išgauti didelius tirpaus rekombinantinio baltymo kiekius, biosintezė buvo indukuojama įvairiomis sąlygomis: naudojant skirtingas *E. coli* DE-3 genų raiškos padermes (HMS174, Rosetta, Arctic Express ir ER2566); palaikant pastovią 17–30°C temperatūrą ir 0,5–1,0 mM IPTG induktoriaus koncentraciją; vykdant indukciją 16–21 val. Kita vertus, tik gp526 ir gp531–533 rekombinantiniai baltymai buvo sintetinami tirpūs, kai indukcija buvo vykdoma (**3 lent.**) *E. coli* Rosetta (DE3) arba HMS174 (DE3) padermėje su 0,5–1,0 mM IPTG, esant 17–30°C apie 17–21 val.

Siekiant pagerinti likusiųjų baltymų, gp098, gp527, gp528, gp530 ir gp534, tirpumą, sukurti rekombinantiniai variantai, turintys nepilną aminorūgščių seką, atitinkančią polipeptido tik N arba C galą (**3 lent.**). Iš penkių baltymų, tik gp098C ir gp528N buvo sintetinami tirpūs, atitinkamai vykdant indukciją Rosetta (DE3) ir HMS174 (DE3) padermėje su 0,8–1,0 mM IPTG, esant 20–25°C ir apie 18 val. Likę nepilnos sekos gp527C, gp530C ir gp534C buvo netirpūs, tačiau buvo ištirpinti ir išgryninti denatūruojančiomis sąlygomis, naudojant karbamidu praturtintus tirpalus A1k/B2k. Nepaisant sėkmingo balty-

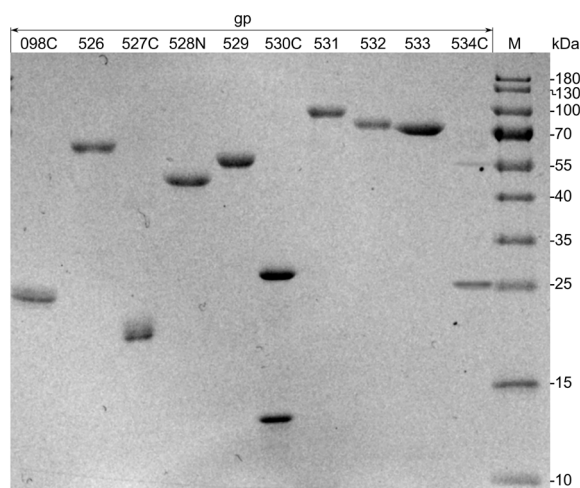
mų gryninimo, jie pasižymėjo agregacija po renatūracijos proceso, atlikus dializę tirpale be chaotropinio junginio.

3 lentelė. RaK2 rekombinantinių baltymų, jų indukcijos ir gryninimo parametrai.

M, kDa			Indukcijos sąlygos					Baltymų gryninimo B tirpalas	Produktas Žymuo
gp	wt	RB	IPTG, mM	t, °C	Δt, h	Padėmė, DH3	pDNR, pET-		
098	62,9	26,3	1	22	18	Rosetta	28b	B2	His6::pΔ(1–228) gp098C
526	63,1	66,1	1	20	18	Rosetta	28b	B2	His6::p gp526
527	79,5	21,6	0,5	30	18	Rosetta	28b	B2k	His6::pΔ(1–538) gp527C
528	121,8	46,3	0,8	25	18	HMS174	16b	B1	His10::pΔ(373–1113) gp528N
529	62,5	64,9	0,5	17	17	Rosetta	28b	B2	His6::p gp529
530	86,1	29,7	0,5	30	18	Rosetta	28b	B2k	His6::pΔ(1–537) gp530C
531	97,8	100,3	0,5	17	19	Rosetta	16b	B3	His10::p gp531
532	87,3	89,8	1	30	17	HMS174	16b	B1	His10::p gp532
533	82,8	85,4	0,5	30	21	Rosetta	16b	B2	His10::p gp533
534	70,8	28,4	0,5	30	18	Rosetta	28b	B2k	His6::pΔ(1–441) gp534C

M – molekulinė masė, gp – geno produktas; wt – laukinis tipas; RB – rekombinantinis baltymas; Δt – indukcijos trukmė; pDNR – plazmidinis genų raiškos vektorius (pET16b arba pET28b); gryninimo eluicijos tirpalai: B1 – 25 mM Tris 0,7 M imidazolas (ImH), pH 8,0; B2 – 50 mM Tris 0,5 M ImH, pH 8,0; B2k – B2 praturtintas 6 M karbamidu; B3 – 20 mM natrio fosfatas, 0,7 M ImH, pH 8,0; His6/10 – šešių/dešimties His liekanų peptidinis inkaras; p – baltymas; C arba N žymuo – mutantinio baltymo (nepilnos sekos baltymo C arba N galo dalis) žymėjimas tekste.

Atlikus išgrynintų baltymų SDS-PAGE, PAA gelyje matyti, kad kartu su gp530C išgrynintas papildomas baltymas, kurio molekulinė masė (≈13 kDa) yra dvigubai mažesnė (**22 pav.**).



22 pav. Išgrynintų RaK2 rekombinantinių baltymų SDS-PAGE analizė 14% PAA gelyje; po 1–5 μg baltymo. M – baltymų molekulinės masės žymenys (#26616).

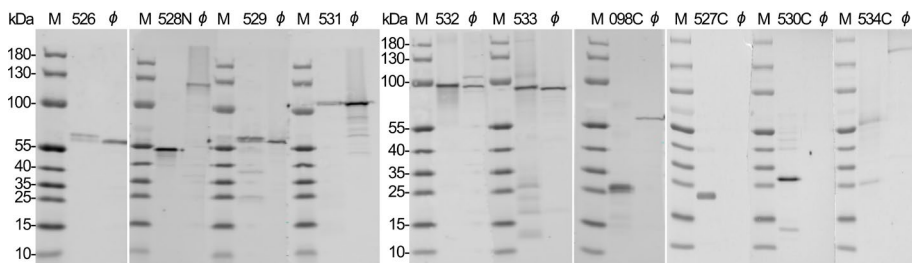
Tikėtina, tai yra susiję su gp530 struktūroje esančia proteinazių taikinio seka endošaperone (**4P pav.**), kas įgalina rekombinantinio gp530C proteolizės metu susidaryti dviems vienodos molekulinės masės baltymams (≈14,6 kDa), iš kurių vienas, su His-inkaru, buvo matomas PAA gelyje po gryninimo. Galiausiai, iš-

gryninti baltymai buvo panaudoti kaip antigenai triušių imunizacijoje, siekiant išgauti atitinkamus antiserumus.

3.3. RaK2 baltymų biosintezės „Western blot“ analizė

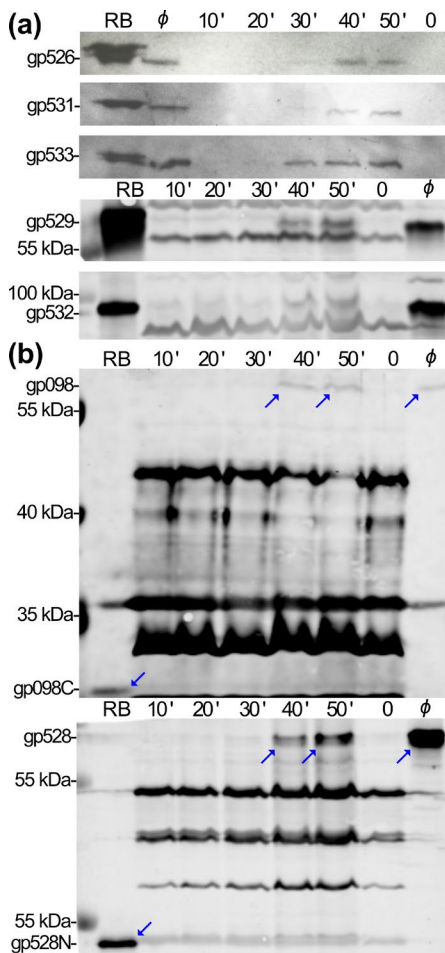
Išskirti antiserumai prieš rekombinantinius baltymus (gp098C, gp526, gp527C, gp528N, gp529, gp530C, gp531–533 ir gp531C) buvo naudojami „Western blot“ tyrime, siekiant patikrinti reaktyvumą prieš RaK2 baltymus. Analizė parodė (**23 pav.**), kad visi išskirti antiserumai buvo reaktyvūs prieš atitinkamus antigenus (rekombinantinius baltymus), o RaK2 viriono struktūroje (fago suspensijoje) reaktyvūs buvo tik antiserumai, kurių antigenai buvo išgryninti nedenaatūruojančiomis sąlygomis. Antiserumai prieš gp527C, gp530C, ir gp534C nerodė aktyvumo RaK2 suspensijose, net jei fago ir pirminių antikūnų kiekis buvo ≈ 10 kartų didesnis. Tikėtina, tai gali būti susiję su agreguojančių baltymų savybėmis, kas turi įtakos antiserumo susidarymui imunizacijos metu – antikūnai pasižymi erdviu atpažinimo epitopu, kurio struktūra pakinta vykdant SDS-PAGE.

Įdomu, kad anti-gp534C rodė sąveiką su RaK2 suspensijoje esančiu ≈ 150 kDa baltymu. Tikėtina, tai atitinka nepilnai denatūravusio gp534 dimerą (142 kDa), nes antigeno mėginyje taip pat matoma sąveika su du kartus didesnės, negu gp534C, molekulinės masės baltymu. Taip pat buvo matomas gp531 ir gp532 kryžminis aktyvumas su anti-gp532/531, o tai galbūt susiję su esančia N galo srities didele homologija tarp baltymų (1–330:5–322 aminorūgščių sritys, 41% identiškumas pagal „Blastp“ analizę).



23 pav. RaK2 struktūrinių baltymų „Western blot“ analizė. Rekombinantiniai baltymai gp526, gp528N, gp529, gp531–533, gp098C, gp527C, gp530C ir gp534C (4–1130 ng) buvo naudojami kaip teigiamos kontrolės; ϕ – išgryninto RaK2 suspensija ($1,5\text{--}19,1 \cdot 10^8$ pfu); M – baltymų molekulinės masės žymenys (#26616). SDS-PAGE analizėje naudotas 4–18% gradientinis skirstomasis PAA gelis.

Išskirti ir aktyvūs antiserumai buvo panaudoti RaK2 tiriamųjų baltymų biosintezės įvertinimui. Biosintezė buvo tikrinama atliekant „Western blot“ analizę su RaK2 infekcijos mėginiais, surinktais kas 10 min po *Klebsiella* sp. KV-3 bakterijų užkrėtimo bakteriofagu (**24 pav.**).



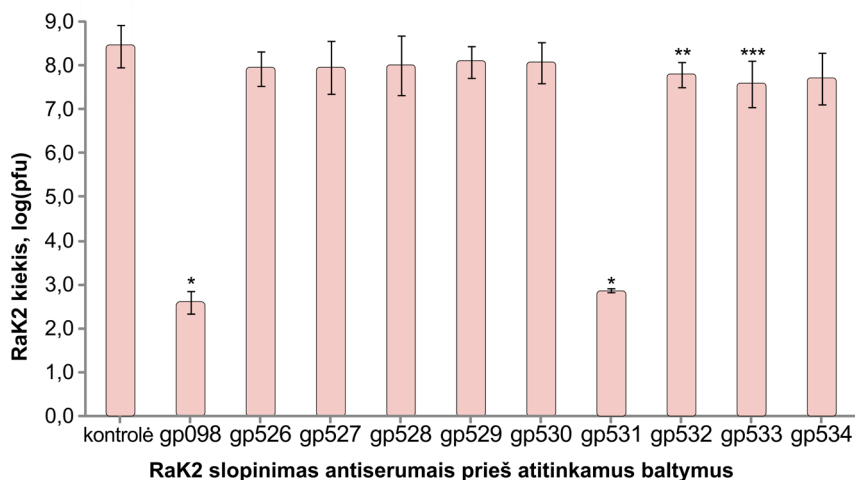
24 pav. Bakteriofago RaK2 baltymų biosintezės „Western blot“ analizė. Naudoti antiserumai, išgauti prieš pilnos (a) ir nepilnos (b) sekos rekombinantinius baltymus (RB). *Klebsiella* sp. KV-3 mėginiai prieš (0) ir po 10–50 min infekcijos su išgryninta RaK2 suspensija, kuri taip pat buvo naudojama kaip teigiama kontrolė (φ). Baltymų molekulinės masės žymenų (#26616) dydžiai pateikti paveikslėlio kairėje. Mėlynos rodyklės žymi atitinkamus RaK2 wt ir nepilnus rekombinantinius baltymus membranoje. SDS-PAGE analizėje panaudotas 10% skirstomasis PAA gelis.

Nustatyta, kad tirti RaK2 baltymai yra sintetiniami jau po 30–40 min nuo infekcijos pradžios, tai reiškia, kad šių struktūrinių baltymų genai yra nurašomi nuo vėlyvųjų promotorių, kadangi ankstyvieji promotoriai veikia pirmosiomis infekcijos minutėmis. Daliai tiriamųjų baltymų, gp098, gp528, gp529 ir gp532 (24 pav.), buvo pritaikytas iki 1 000 kartų jautresnis „Western blot“ metodas, tačiau buvo matomas didesnis aktyvumas fonui, bet ne tiksliniams baltymams. Tikėtina, tai yra susiję su prastu struktūrinių ir nepilno dydžio rekombinantinių baltymų imunogeniškumu.

3.4. RaK2 infekcijos ir adsorbcijos slopinimas

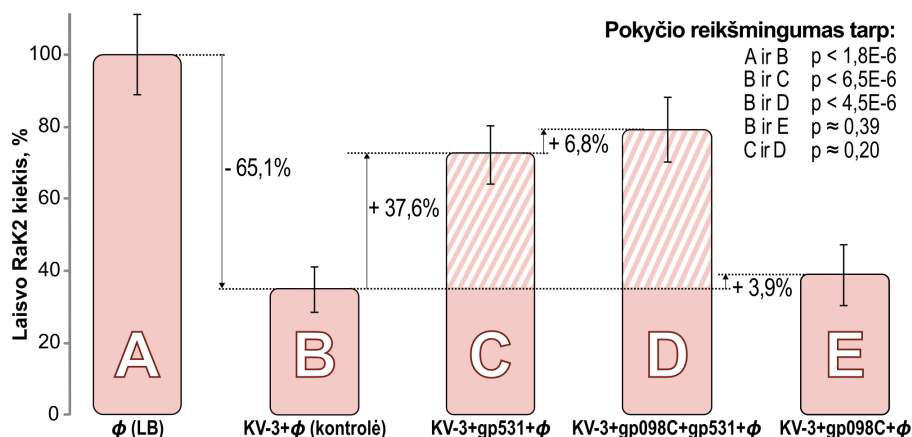
Išskirti polikloniniai antiserumai buvo panaudoti RaK2 baltymų, atsakingų už *Klebsiella* sp. KV-3 bakterijų užkrėtimą, nustatymui. Šių baltymų blokavimas atitinkamais antiserumais turėtų pasireikšti reikšmingu infektyvaus bakteriofago kiekio sumažėjimu. Vykdam RaK2 baltymų blokavimą antiserumais, nustatyta, kad RaK2 gp098 ir gp531 yra kritiškai reikšmingi bakteriofago infektyvumui (25 pav.). Pastarasis yra slopinamas daugiau nei $\approx 400\,000$ kartų, arba 1 μL

antisero nuslopina daugiau nei $\approx 4,5 \cdot 10^6$ RaK2 virionų. Taip pat reikšmingas ir nežymus pokytis yra stebimas veikiant RaK2 antiserumais, išskirtais prieš gp532 ($p \approx 0,00016$) ir gp533 ($p \approx 0,017$), kas atitinkamai gali būti susiję su kryžminiu antisero aktyvumu ir nespecifiniu RaK2 slopinimu.



25 pav. RaK2 infekcijos slopinimas antiserumais, išskirtais prieš atitinkamus RaK2 bakteriofago baltymus. Duomenys išreikšti reikšmių vidurkiais su $\pm$ SD ($n=4$), o infekcijos slopinimo reikšmingumas įvertintas „Stjudento“ t-testu (tarp kontrolės ir: *, $p < 1 \cdot 10^{-11}$; **, $p \approx 0,00016$; ***, $p \approx 0,017$).

Nustačius, kad gp531 ir gp098 užblokavimas virione ypač slopina RaK2 infekciją, buvo atliktas adsorbcijos slopinimo tyrimas (**26 pav.**), kuriuo siekta patvirtinti, kad pastarieji baltymai atsakingi už fago prisijungimą prie bakterijos.



26 pav. Rekombinantinių gp098C ir gp531 baltymų netiesioginė įtaka bakteriofago RaK2 adsorbcijai. Rodyklės su reikšmėmis žymi procentinį laisvo bakteriofago kiekio pokytį. ϕ – išgryninta RaK2 suspensija ($1,2 \cdot 10^6 \pm 11\%$ pfu). Duomenys pateikti reikšmių vidurkiais su $\pm$ SD ($n=6$), o poveikio reikšmingumas (užbrūkšniuota dalis) įvertintas „Stjudento“ t-testu.

Tyrimo metu, *Klebsiella* KV-3 bakterijos paveikiamos pastaraisiais rekombinantiniais baltymais ir vėliau bakteriofagu. Taigi, *Klebsiella* sp. KV-3 bakterijos buvo atskirai veikiamos gp098, gp531, ir jų mišiniu, o vėliau ir vienodu RaK2 kiekiu. Nustačius laisvo arba nesiadsorbavusio fago kiekį, buvo įvertinamas, baltymų poveikis RaK2 adsorbcijai, lyginant su kontrolėmis: (i) tyrimams panaudotas pirminis bakteriofago kiekis; (ii) po RaK2 adsorbcijos ant baltymais nepaveiktų bakterijų panaudoto pirminio kiekio likutis. Teoriškai, jei atitinkamas baltymas yra esminis vykdyti bakteriofago prisijungimą (adsorbciją) prie bakterijos, tai šiuo baltymu paveiktos bakterijos sumažintų bakteriofago prisijungimo galimybes, vadinasi – laisvo bakteriofago kiekis turėtų padidėti, lyginant su baltymu nepaveiktomis bakterijomis.

Tyrimo sąlygomis nustatyta, kad vidutiniškai 65% bakteriofago kiekio adsorbuojasi ant KV-3 bakterijų (**26 pav.**). Lyginant su kontrole, rekombinantiniu gp531 paveiktos bakterijos lemia apie du kartus (+38%) didesnį laisvo fago kiekį, kas rodo, kad gp531 dalyvauja pirminėje sąveikoje su KV-3 bakterija. Nors po bakterijų paveikimo tiek gp098C baltymu, tiek kartu su gp531 matomas neženklaus padidėjimas, tačiau abiem atvejais su gp098C susiję pokyčiai nėra statistiškai reikšmingi ($p \geq 0,2$).

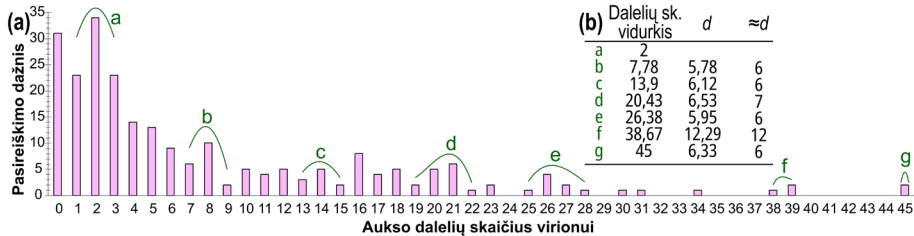
Darant prielaidą, kad rekombinantinis gp098C yra taisyklingai susisukęs ir veiklus, o taip pat RaK2 infekcija yra stipriai slopinama, blokuojant virusą anti-gp098 (**25 pav.**), tikėtina, kad fagas sąveikauja su bakterija per koordinuotą gp531 ir gp098 baltymų veikimą. Kadangi RaK2 adsorbcijos tyrimo metu nustatyta (**26 pav.**), kad gp098 netiesioginė įtaka yra nereikšminga, vadinasi, pirminis sąlytis su bakterija vyksta per gp531, kuri leidžia įvykti gp098 sąveikai ir bakterijų užkrėtimui.

3.5. RaK2 žymėjimas aukso nanodalelėmis ir mikroskopinės analizės

Siekiant įvertinti bakteriofago RaK2 tiriamųjų baltymų išsidėstymą viriono struktūroje, buvo atliktas imunologinio žymėjimo tyrimas ir TEM analizė. Fagas buvo žymimas auksu konjuguotais antikūnais, kurie sąveikauja su pirminiais antikūnais (antisėrumais), atitinkamai prijungtais prie RaK2 baltymų.

Siekiant įvertinti baltymų kopijų skaičių ilgosiose RaK2 uodegos ataugėlėse, buvo atlikta RaK2 virionų, žymėtų aukso (Au) nanodalelėmis su antisėrumu prieš gp531, TEM mikrografijų analizė. Iš viso, 238 mikrografijos buvo atrinktos analizei pagal du kriterijus: fago adsorbcijos kompleksas negali liestis su kitais virionais; mikrografijose virionai turi prisitvirtinusias ≤ 45 Au nanodaleles. Taigi, buvo apskaičiuojamas Au nanodalelių skaičiaus vidurkis iš jų dažnių pikų ($\bar{x} = 1/n \cdot \sum_i (x_i \cdot v_i)$, $i=1$, kur $\bar{x}$ – Au dalelių skaičiaus vidurkis; x – dalelių skaičius; v – dažnis, n – visų pike analizuotų nuotraukų skaičius). Vertinant imuno-žymėjimo tendenciją iš reikšmių vidurkių, aritmetinės progresijos sąlyga $[\bar{x}_n = \bar{x}_1 + (n-1) \cdot d]$ nustatyta (**27 a pav.**), kad jos skirtumas yra $d = 6$ (**27 b**

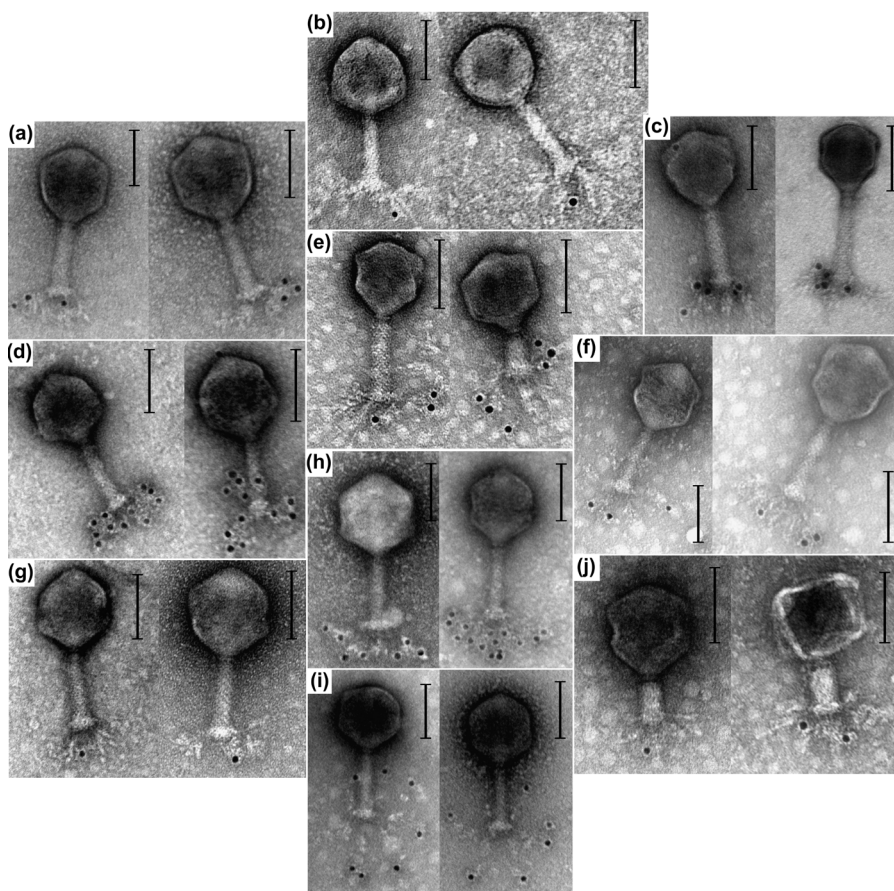
pav.), o tai atitinka RaK2 LTF skaičių adsorbcijos komplekse. Vadinas, aukso dalelių žymėjimas pasikartoja kas šešis vienetus, o tai reiškia, kad tik viena gp531 baltymo kopija yra vienoje RaK2 LTF, o Au dalelių skaičiaus kitimą papildomai lemia antiserume esančių polikloninių antikūnų skirtingų epitopų sąveika su tuo pačiu baltymu.



27 pav. RaK2 virionų su imuno-žymėtomis Au nanodalelėmis prieš gp531 TEM mikrografijų analizė: (a) 238 atrinktų mikrografijų aukso dalelių pasiskirstymo dažnis ant RaK2 virionų; (b) lentelė, kurioje pateikta Au žymėjimo tendencijos įvertinimas iš dalelių skaičiaus vidurkių pikuose ir apskaičiuotais aritmetinės progresijos skirtumais d .

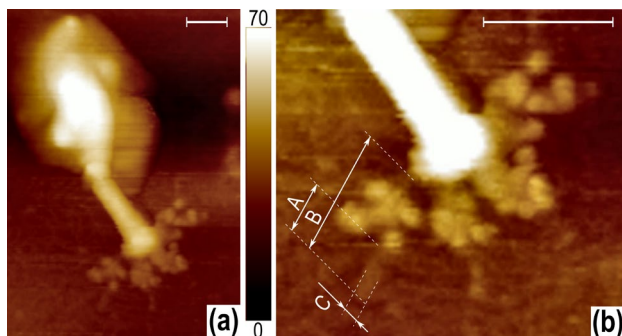
Atlikus RaK2 likusių baltymų imuno-žymėjimą Au nanodalelėmis, matomas gp526–534 išsidėstymo adsorbcijos komplekso šakotųjų ilgųjų uodegos ataugėlių srityje (28 a–i pav.). Kita vertus, gp098 buvo dažniausiai pažymėtas (28 j pav.) ant susitraukusią uodegėlę turinčių virionų, skirtingu atstumu nuo uodegos vamzdelio galo (8–46 nm; $n = 44$, 5P pav.), kas leidžia manyti, kad tai yra dinamiška struktūra, kurios pokyčiai lemia fago uodegėlės susitraukimą (tikėtina, kad antikūnų sąveikos su gp098 sukeltas poveikis panašus į viruso adsorbcijos metu įvykstantį). Atsižvelgiant į RaK2 adsorbcijos ir jo infekcijos slopinimo tyrimų rezultatus, tikėtina, kad gp098 yra atskiras bazinės plokštelės baltymas, neįeinantis į ilgosios ataugėlės struktūrą. Tuo tarpu, greta uodegos vamzdelio galo, proksimalinėje LTF dalyje, buvo matomas gp528 žymėjimas. Tai reiškia, kad gp528 yra pirmasis prisijungiantis prie RaK2 bakteriofago bazinės plokštelės baltymas, kuris tikriausiai veikia kaip platforma ilgosios ataugėlės susirinkimui.

TEM mikrografijose taip pat matoma, kad šakotosiose ilgosiose RaK2 uodegos ataugėlėse gp526, gp527 ir gp532 (28 a, b, g pav.) išsidėstę medialinėje LTF dalyje, gp530 ir gp531 (28 e, f pav.) – labiau distalinėse srityse, o gp529 ir gp533 (28 d, h pav.) išsidėstymas nėra aiškus, tačiau žymėjimas rodo mažesnę tendenciją proksimalinėje LTF srityje. Iš visų labiausiai nutolęs nuo bazinės plokštelės centro, per $82 \pm 8,1$ nm ($n=32$), terminalinis ataugėlės baltymas, buvo pažymėtas gp534 (28 i pav.).



28 pav. RaK2 virionų, imuno-pažymėtų su aukso nanodalelėmis (10 nm) prieš: (a) gp526, (b) gp527, (c) gp528, (d) gp529, (e) gp530, (f) gp531, (g) gp532, (h) gp533, (i) gp534 ir (j) gp098, TEM mikrografijos. Mastelis atitinka 100 nm.

Siekiant geriau įvertinti gp534 poziciją, buvo atlikta AFM analizė. Pirmiausia tai atskleidė (**29 pav.**), kad RaK2 šakotoji uodegos ataugėlė nėra tiesios struktūros ir baigiasi išsikišusia cilindro formos galūne (*protrusion*).



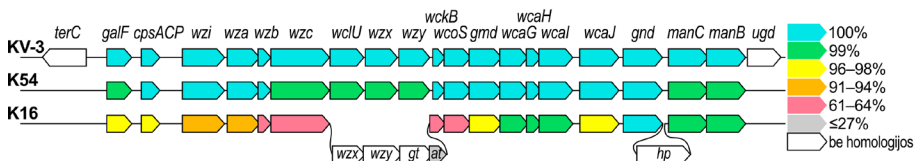
29 pav. RaK2 AFM analizė. Viriono (a) šakotosios uodegos ataugėlės išmatuoti dydžiai (b): 32 $\pm$ 5,1 nm (n=68) galūnė (A); 75 $\pm$ 6,5 nm (n=32) ataugėlė (B); 2 $\pm$ 0,3 nm (n=8) galūnės plotis (C). Mastelis atitinka 50 nm, o spalvos gradientas – struktūros aukštį (0–70 nm).

Išmatuotas šakotosios ataugėlės ilgis ($75 \pm 6,5$ nm, $n=32$) yra artimas auksu žymėto gp534 TEM analizės metu nustatytui atstumui ($82 \pm 8,1$ nm, $n=32$; **29 b pav.**), o AFM matomos galūnės ilgis ir plotis panašūs į sumodeliuoto gp534 dydžius: 38,6 ir 2,0–5,3 nm, kas rodo, kad galūnės struktūrą sudaro gp534.

3.6. *Klebsiella* sp. KV-3 K-serotipas ir jo polisacharido sudėtis

Klebsiella sp. KV-3 bakterijų *cps* genų sandara buvo analizuojama naudojant „Multigeneblast“ bioinformatinį įrankį, siekiant nustatyti bakterijų polisacharido serotipą ir įvertinti jo sandarą. Išskirtas ir žinomos sandaros polisacharidas papildomai leis tirti depolimerazinį specifiskumą RaK2 baltymuose. Iš NCBI duomenų bazės buvo paimtos visos 81-ą skirtingą *cps* regioną turinčios sekos, atitinkančios skirtingus *Klebsiella* spp. K-serotipus, kurių kapsulės polisacharidų struktūros (**2P lent.**) yra pateiktos „K-Pam“ duomenų bazėje. Pasirinktos kapsulės polisacharidų sintezės, *cps*, sritys buvo panaudotos kaip sekų palyginiai, siekiant išanalizuoti atitinkamą *Klebsiella* sp. KV-3 sritį.

„Multigeneblast“ analizė atskleidė, kad KV-3 bakterijų *cps* sritis yra artimiausia *K. pneumoniae* K54 serotipui: 99–100% sekų identiškumas tarp homologinių baltymų (**30 pav.**). Kitas artimas *cps* homologas yra *K. pneumoniae* K16 (61–100%), kuriame yra papildomi glikozilo ir acetilo transferazių genai, o koduojami Wzx ir Wzy baltymai neturi homologijos su K54 serotipu.

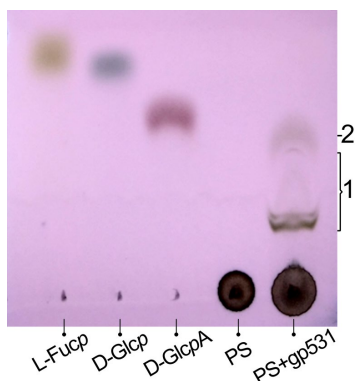


30 pav. *Klebsiella* sp. KV-3 *cps* genų sričių palyginimas su artimiausiais K54 ir K16 homologais. Koduojančios sekos pažymėtos rodyklėmis, kurių spalvos atitinka homologiškumo dydį pagal KV-3 serotipą. Santrumpos, *gt*, *at* ir *hp*, atitinkamai reiškia glikozilo, acetilo transferazių ir hipotetinio baltymo koduojančias sritis.

Papildomai *Klebsiella* sp. KV-3 serotipas buvo patvirtintas, naudojantis atvirojo kodo informatinius įrankius *K-Pam*⁸⁷ ir *Kaptive*²¹². Taigi, KV-3 bakterijos atitinka *Klebsiella* K54 serotipą, kurio kapsulės polisacharido struktūra buvo nustatyta ir validuota Nyderlandų karalystės mokslininkų^{233,234}. Šią struktūrą sudaro pasikartojantis vienetas (tetrasacharido liekana), susidedantis iš D-gliukurono rūgšties, L-fukozės, ir dviejų D-gliukozės liekanų. Polisacharidas papildomai turi acetilo grupės modifikacijas ant fukozės liekanos, kas antrą pasikartojančio vieneto žingsnį (**6P pav.**).

Siekiant įvertinti polisacharido sudėtį ir depolimerazinį aktyvumą, išskirtas KV-3 kapsulės polisacharidas buvo veikiamas išgrynintu RaK2 gp531 ir susidarę produktai analizuojami TLC ir HPLC-MS metodais. TLC analizė atskleidė, kad gp531 skaido polisacharidą, formuodamas keletą skirtingo poli-

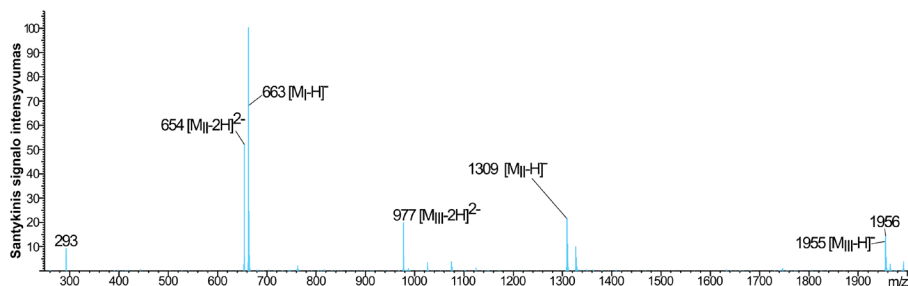
merizacijos laipsnio produktų, kas reiškia, kad tai yra endogeniškai polisacharidą skaidanti depolimerazė (**31 pav.**).



31 pav. Išskirto polisacharido (*Klebsiella* sp. KV-3) skaidymo RaK2 gp531 TLC analizė: **1** – didesnio polimerizacijos laipsnio oligosacharidai; **2** – galutinis reakcijos produktas, viengubą pasikartojantį vienetą atitinkantis oligosacharidas; L-Fucp – fukozė; D-Glcp – gliukozė; D-GlcpA – gliukurono r.; PS – išskirtas polisacharidas.

Naudota TLC judri fazė ir leidimo trukmė: 1-proOH: EtOAc: dH₂O (**6:1:3**) ir 20 min.

HPLC-MS analizės masių spektre (**32 pav.**) aptikti trys skirtingo intensyvumo pikai, atitinkantys 664, 1310, ir 1956 Da molekulinės masės junginius, kurie sutampa su K54 polisacharido hidrolizės produktais be acetilo grupių modifikacijos. Pagrindinis produktas (**4P lent.**) yra tetrasacharidas, polisacharido monomeras (M_I), o kiti yra dimeras ir trimeras, atitinkantys oktasacharidą (M_{II}) ir dodekasacharidą (M_{III}).

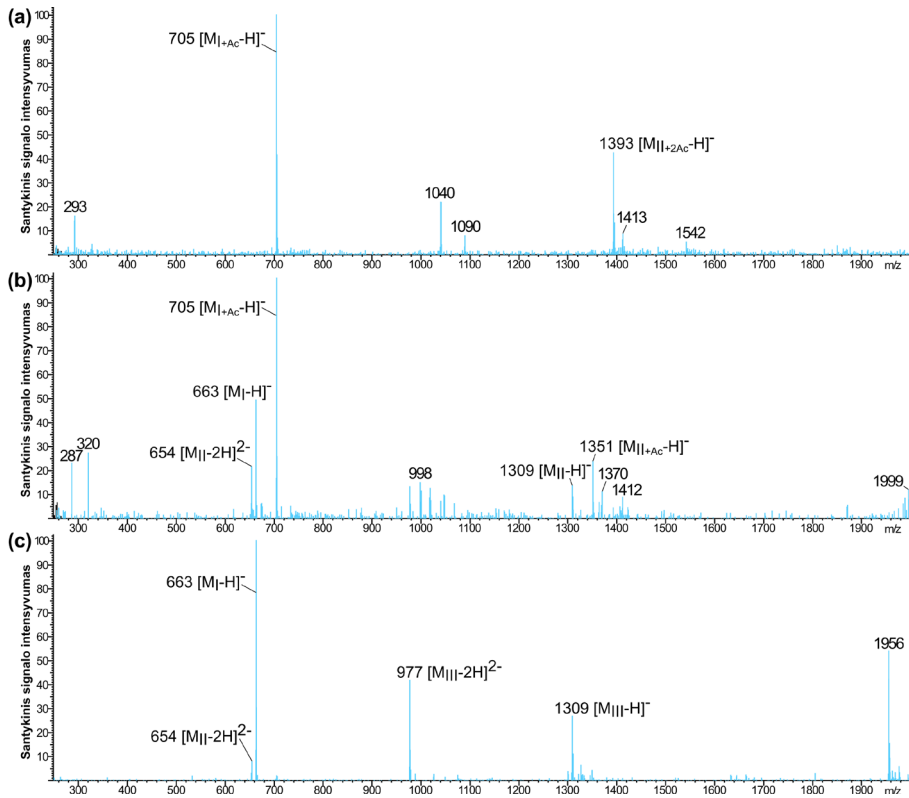


32 pav. *Klebsiella* sp. KV-3 polisacharido gp531 katalizuojamos hidrolizės produktų HPLC-MS masės spektras neigiamoje jonizacijoje (250–2 000 *m/z*).

Nors HPLC-MS analizės rezultatai rodo, kad gp531 yra KV-3 polisacharido hidrolazė, tačiau katalizės metu susidarę produktai neturėjo acetilo modifikacijos, kuri buvo nustatyta K54 serotipo polisacharide. Siekiant tai paaiškinti, polisacharido hidrolizė buvo vykdoma tiesiogiai veikiant KV-3 bakterijų biomasės, besiskiriančias auginimo trukme. Atlikus HPLC-MS analizę paaiškėjo (**33 a pav.**), kad šviežiai auginamos *Klebsiella* sp. KV-3 bakterijos (37°C, 190 min⁻¹, 2 val., OD₆₀₀ 2,5) sintetina pilnai acetilintą polisacharidą, nes masių spektre matomi 705 ir 1393 *m/z* signalai, atitinkantys pilnai acetilintus tetra- ir oktasacharidus.

Tuo tarpu bakterijų, augintų dvi paras be kratymo (37°C), wt polisacharidas buvo dalinai acetilintas (**33 b pav.**), nes nebuvo aptiktas 1393 *m/z* signalas. Vietoje jo, atsirado papildomi signalai, 1351 ir 1309 su 654 *m/z*, atitinkantys

monoacetilintą ir nemodifikuotą oktasacharidus. Šalia 705 m/z taip pat matomas ir neacetilinto tetrasacharido 663 m/z signalas. Galiausiai, po 11 parų inkubacijos, polisacharido struktūroje nebuvo aptiktas acetilinimas (**33 c pav.**), kas atitinko išskirto polisacharido analizės duomenis (**32 pav.**).



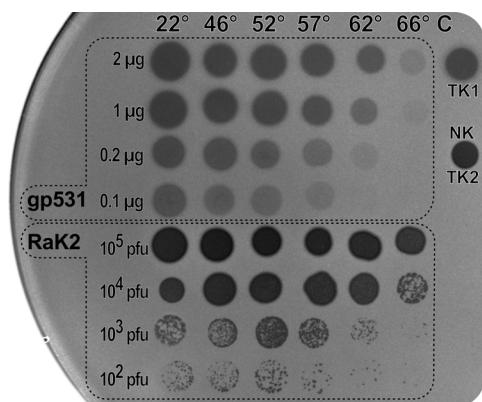
33 pav. *Klebsiella* sp. KV-3 kapsulinio polisacharido gp531 katalizuojamos hidrolizės produktų HPLC-MS analizės masės spektrai (250–2 000 m/z). Šviežiai užaugintos (**a**) ir inkubuotos 2 (**b**) ir 11 (**c**) paras/-ų be kratymo KV-3 bakterijų biomasės, naudotos kaip polisacharido šaltinis. Mėlynos linijos žymi santykinę neigiamai jonizuotų junginių masių signalų intensyvumą.

Taigi, *Klebsiella pneumoniae* KV-3 izoliato kapsulė sudaryta iš K54 serotipo polisacharido, kurio acetilinimas neturi slopinamojo poveikio RaK2 gp531 vykdomai hidrolizei. Taip pat susidarę produktai HPLC-MS analizės būdu yra aptinkami teigiamos jonizacijos spektre (**7P pav.**). Papildomai parodyta, kad polisacharidas bakterijose yra pirmiausia sintetinamas visiškai acetilintas, o deacetilinimas aptinkamas po bent dviejų parų bakterijų kultyvavimo.

3.7. RaK2 depolimerazių charakterizavimas

Išgryninti pilnos sekos RaK2 baltymai, gp526, gp529, gp531–533, buvo panaudoti skaidrių zonų teste, siekiant įvertinti jų depolimerazinį aktyvumą prieš *Klebsiella* KV-3 bakterijas. Iš tirtų rekombinantinių baltymų tikrai gp531 pasi-

žymėjo depolimeraziniu aktyvumu (**34 pav.**). Tikėtina, kad likę baltymai susiję su skirtingu depolimeraziniu specifiškumu, lemiančiu fago daugiavalentiškumą, todėl buvo atliktas skaidrių zonų testas kitoms *Klebsiella* sp. padermėms. Vis dėlto, *Klebsiella* KV-1, *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 ir *K. pneumoniae* 279 bakterijoms atliktas testas neparodė teigiamų rezultatų tiek rekombinantinių baltymų depolimeraziniam aktyvumui, tiek RaK2 infektyvumui.



34 pav. Depolimerazės gp531 aktyvumo ir išveiklinimo tyrimai skaidrių zonų testu ant *Klebsiella* KV-3 bakterijų sluoksniu. TK1 – pirmoji teigiama kontrolė, gp531 pradinis mėginys (4 µg); NK – neigiama kontrolė, LB terpė; TK2 – antroji teigiama kontrolė, pradinė RaK2 suspensija (10^6 pfu).

Papildomai buvo įvertintas gp531 išveiklinimas karščiu (**34 pav.**), kurio metu mėginys buvo veikiamas 15 min 46–66°C temperatūromis ir atliekamas skaidrių zonų testas, o išgryninto RaK2 suspensija naudojama kaip kontrolė. Susilpnėjęs gp531 depolimerazinis aktyvumas jau buvo matomas po 57°C poveikio, o esant 62°C (0,1 µg baltymo nėra veiklus). Panašus karščio poveikis matomas ir RaK2 gebėjimui infekuoti.

Nustačius, kad tik gp531 pasižymi depolimeraziniu aktyvumu, būtent, glikozilo hidrolazės (**3.7 sk.**), buvo tiriamas gp531 vykdomos hidrolizės taikiny – tikslinis glikozidinis ryšys. Pirmiausia, įsigyti 27 skirtingi chromogeniniai junginiai ir oligo/ polisacharidai (**3P lent.**) buvo tiriami kaip galimi substratai, tačiau gp531 nevykdė jiems hidrolizės.

Taigi, pasirinktas substratas gp531 baltymui buvo *Klebsiella* KV-3 išskirtas polisacharidas, kadangi yra žinoma (**3.7 sk.**), kad šio baltymo katalizuojamos reakcijos metu susidarantis produktas, 664 Da tetrasacharidas, yra aptinkamas TLC ir HPLC-MS analizėmis. Polisacharido hidrolizės metu, gp531 skaido tik vieną iš trijų (**35 pav.**) skirtingų glikozidinių ryšių, tačiau potencialiai gali susidaryti trys struktūriniai produkto izomerai su skirtinga monosacharido liekana redukuojančiame sacharido gale. Šią sritį galima chemiškai modifikuoti ir tokiu būdu pažymėti gp531 biokatalizės taikinį ir nustatyti fermentinį specifiškumą.

Taigi, buvo pritaikyti du cheminės modifikacijos metodai, leidžiantys pažymėti gp531 produkto tetrasacharido redukuojantį galą: vykdant redukciją NaBH_4 iki alkoholio arba derivatizuojant ANTS iki chromogeniško junginio.

KV-3 polisaccharidas

$\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glc}pA-(1 \rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Fuc}p-(1 \rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp}-(1 \rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glc}pA-(1 \rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Fuc}p-(1 \rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp}-(1 \rightarrow 4)$

+gp531

$\downarrow$

$\alpha\text{-D-Glc}pA-(1 \rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Fuc}p-(1 \rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp}-(1 \rightarrow 4)$

+NaBH₄/
+ANTS+NaCNBH₃

$\xrightarrow{\quad}$

$\alpha\text{-D-Glc}pA-(1 \rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Fuc}p-(1 \rightarrow 3)\text{-D-GlcOH}-\beta\text{-D-Glcp}-(1 \rightarrow 4)$

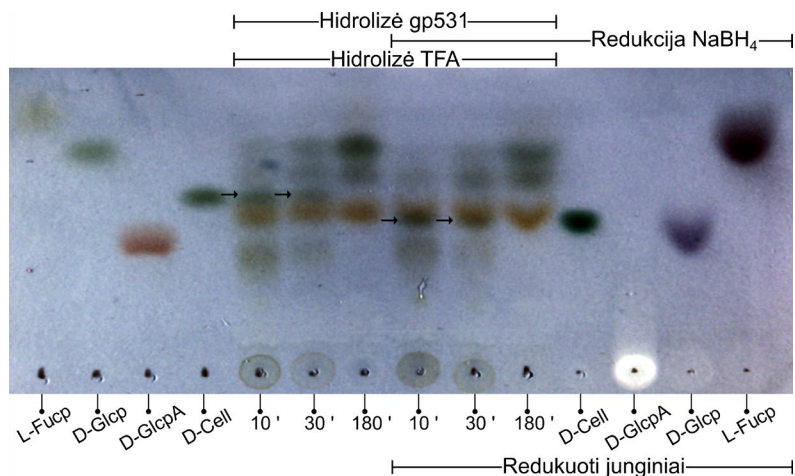
+TFA

$\downarrow$

TLC ir HPLC-MS analízis

Atskirai cheminės modifikacijos buvo atliktos ir komerciniams sacharidams (L-fukozei, D-gliukozei, D-gliukurono rūgščiai ir D-celobiozei), kurie buvo panaudoti kaip kontroliniai mėginiai TLC ir HPLC-MS analizėse.

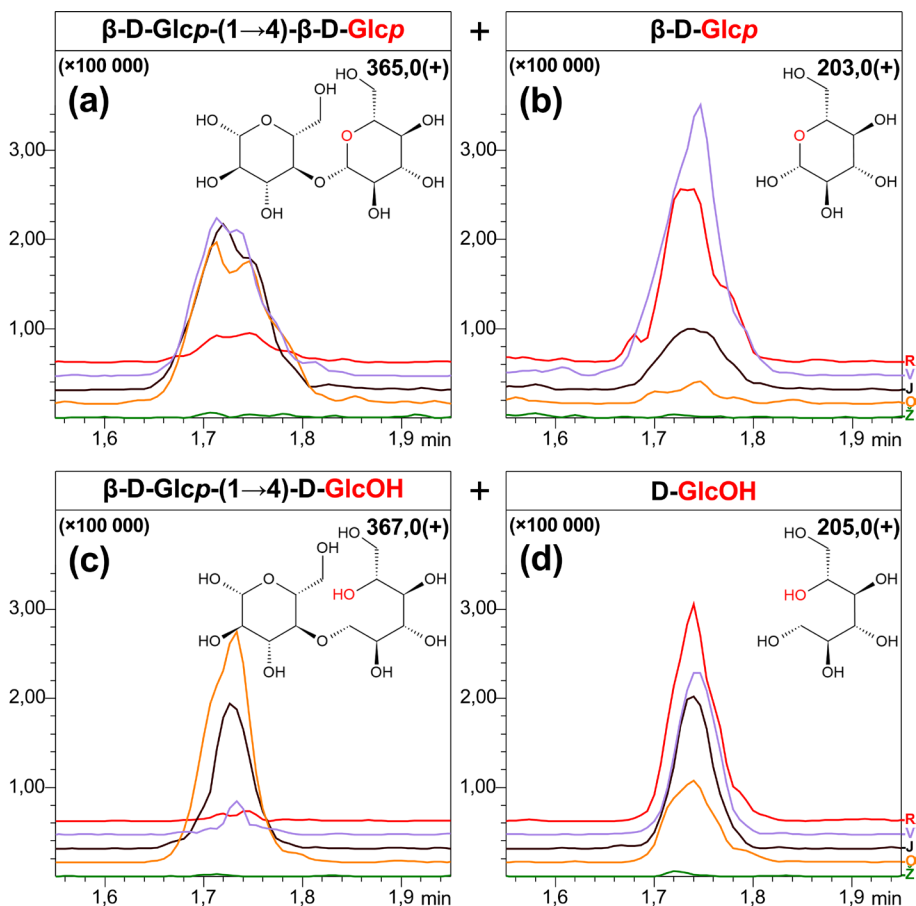
TLC būdu analizuojant neredukuotą tetrasachridą po nepilnos tetrasacharido hidrolizės TFA, nustatyta, kad susidarė disacharidas, atitinkantis celobiozę, β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glcp. Šis junginys išskirtinai aptinktas tik neredukuotuose mėginiuose, o redukuotuose – tikrai redukuotos celobiozės atitikmuo (**36 pav.**).



TFA vykdomos hidrolizės metu susidarę abiejų rūšių disacharidai palaipsniui išnyko, tačiau atsiradusios gliukozės intensyvumas pradėjo didėti. Taip pat analizuojamuose mėginiuose nebuvo aptikta fukozės ar gliukuroninės rūgšties.

požymių, kas tikriausiai susiję su šių abiejų junginių sudaromo disacharido didesniu cheminiu atsparumu TFA rūgščiai.

Kadangi redukuotą celobiozę atitinkančio junginio žymė yra matoma TLC analizėje, turėtų būti aptinkama ir redukuota gliukozė, tačiau redukuoti monosacharidai yra 10–15 kartų prasčiau aptinkami naudojant 4-anyžio aldehydą. Taigi, siekiant nustatyti susidariusius junginius, buvo atlikta ir HPLC-MS analizė (37 pav.).



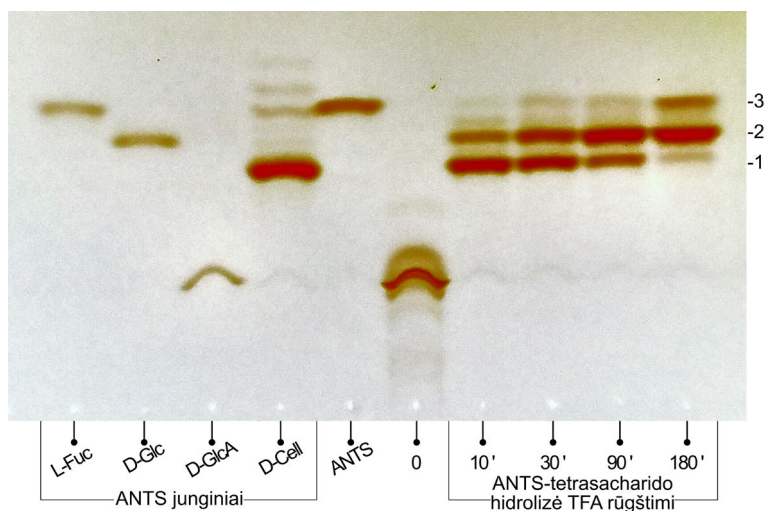
37 pav. Neredukuoto (a, b) ir redukuoto (c, d) tetrasacharidų TFA vykdomos hidrolizės metu susidariusių junginių HPLC-MS jonų masių chromatogramų palyginimas. Pateiktos chromatogramos yra validuotos empiriniais sacharidų matavimais: (a) celobiozės $[M+Na]^+ = 365 \text{ m/z}$, (c) redukuotos celobiozės $[M+Na]^+ = 367 \text{ m/z}$, (b) gliukozės $[M+Na]^+ = 203 \text{ m/z}$, (d) redukuotos gliukozės $[M+Na]^+ = 205 \text{ m/z}$. Žalia, oranžinė, juoda, violetinė ir raudona kreivės atitinkamai žymi prieš (Z) ir po 10 (O), 30 (J), 90 (V), 180 min (R) hidrolizės TFA r. paimtus mėginius. HPLC-MS analizėje naudotas gradientas buvo 0,1% HCOOH su ACN.

HPLC-MS analize nustatyta, kad prieš ir po redukcijos mėginiuose, tiksliai vykstant hidrolizei TFA rūgštinti, atitinkamai aptikta neredukuota, 365 m/z (37 a pav.), ir redukuota, 367 m/z (37 c pav.), celobiozės, kurių signalų intensyvumas

palaipsniui mažėjo hidrolizės eigoje. Atvirkščiai, neredukuotos ir redukuotos gliukozės signalų, atitinkančių 203 m/z (**37 b pav.**) ir 205 m/z (**37 d pav.**), intensyvumas palaipsniui didėjo. HPLC-MS duomenys patvirtina TLC rezultatus, rodančius, kad gp531 katalizuojamos hidrolizės reakcijos metu susidaro tetrasacharidas su gliukozės liekana redukuojančiame gale.

Kadangi angliavandeniai HPLC-MS analizės metu prastai jonizuojasi, nėra chromogeniški, lengvai sudaro įvairius aduktus, o NaBH_4 redukcijos metu susidariusių junginių molekulinė masė skiriasi nuo pradinių tik 2 Da, tai gali lemti klaidingai teigiamą rezultatų interpretavimą. Siekiant patvirtinti gp531 hidrolizuojamą ryšį, fermentinės reakcijos metu susidaręs produktas (tetrasacharidas) buvo derivatizuotas ANTS fluoroforu. Modifikacijos metu susidariusi Šifo bazė buvo redukuota NaCNBH_3 iki stabilaus ANTS-tetrasacharido junginio, o nesureagavęs reagento perteklius ir didelis druskų kiekis buvo atitinkamai pašalinti jonų mainų chromatografijos būdu ir gelfiltracija. Surinktose frakcijose ANTS-tetrasacharido grynumas buvo įvertintas TLC analizėmis (**8P pav.**).

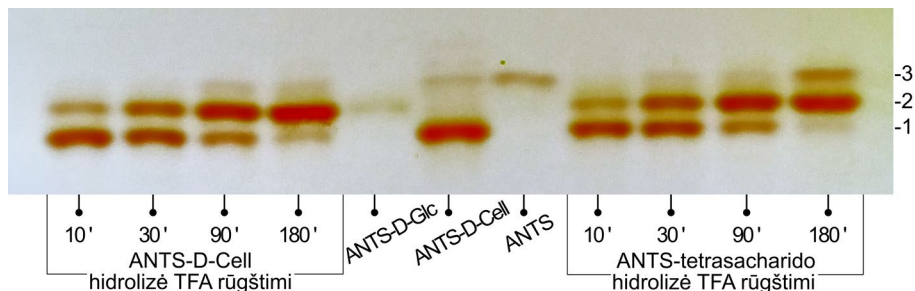
Išgrynintas ANTS-tetrasacharidas buvo 10–180 min hidrolizuojamas TFA rūgštimi ir vėliau atlikta TLC analizė kartu su kontroliniais mėginiais – ANTS derivatizuotais sacharidais (**38 pav.**).



38 pav. ANTS-tetrasacharido prieš (0) ir po 10–180 min hidrolizės TFA rūgštimi TLC analizė. Junginiai, rodantys panašią migraciją į: ANTS-celobiozę (**1**); ANTS-gliukozę (**2**); ANTS arba ANTS-fukozę (**3**). TLC judrioji fazė: 1-butOH: EtOH: dH_2O (5:3:2), leidimo trukmė: 2×20 min.

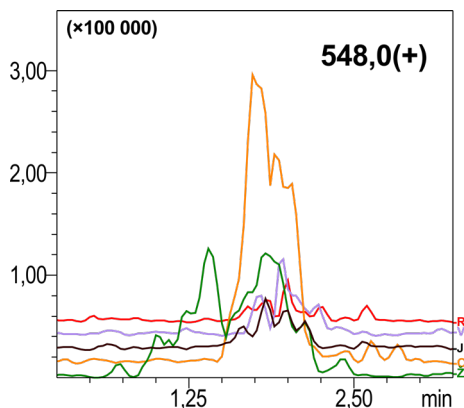
TLC analizė atskleidė, kad TFA vykdomos hidrolizės metu ANTS-tetrasacharidas palaipsniui skilo į tris ryškiai matomus junginius (**38 pav.**), kurių migracija atitiko ANTS derivatizuotus: celobiozę (1), gliukozę (2) ir fukozę arba laisvą ANTS (3). Siekiant patvirtinti, kad junginys (3) atitinka ANTS-gliukozės skilimo produktą, o ne pačią ANTS-fukozę, buvo atlikta ANTS-celobiozės hi-

drolizė TFA. Susidariusių junginių migracijos profiliai buvo palyginti su ANTS-tetrasacharido hidrolizatais. TLC analizė parodė (39 pav.) panašius abiejų junginių hidrolizės TFA rūgštini produktų migracijos profilius, kas rodo ANTS-gliukozės papildomą skilimą. O taip pat gp531 katalizės metu susidariusio produkto redukuojančiame gale yra gliukozės liekana.



39 pav. Derivatizuotų ANTS oligosacharidų, D-celobiozės ir gp531 produkto tetrasacharido po 10–180 min hidrolizės TFA r. TLC analizė. Junginiai, rodantys panašią migraciją į: ANTS-celobiozę (1); ANTS-gliukozę (2); ANTS arba šalutinis produktas (3). Judrioji TLC fazė ir leidimo trukmė: 1-butOH: EtOH: dH₂O (5:3:2) ir 2×20 min.

Siekiant nustatyti po hidrolizės TFA susidariusius junginius ir patvirtinti, kad trečiasis junginys yra būtent ANTS-gliukozės skilimo produktas, buvo papildomai atlikta HPLC-MS analizė. Panaudojant ANTS derivatizuotus sacharidus (L-Fucp, D-Glcp, D-GlcpA, D-Cell), empiriškai buvo įvertintos junginių jonizacijos masės, kuriomis remiantis buvo analizuojami TFA hidrolizuoti mėginiai. Nustatytas vienintelis reikšmingai intensyvus 548 *m/z* signalas (40 ir 9P pav.), atitinkantis ANTS-gliukozę. Taip pat, jo signalo intensyvumas yra sumažėjęs rūgštinės hidrolizės laike tarp 10 min ir 30–180 min, kas rodo, kad ANTS-gliukozė yra papildomai degraduojama į chromogenišką (39 pav.) junginį (3).

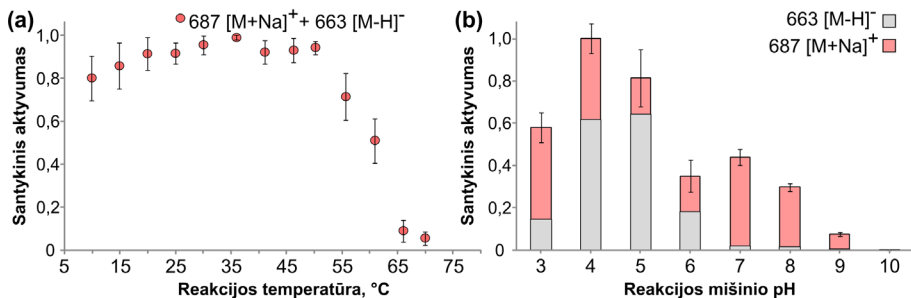


40 pav. ANTS-tetrasacharido hidrolizės TFA rūgštini HPLC-MS analizės ANTS-gliukozės $[M+H]^+=548$ chromatogramas: žalia, oranžinė, juoda, violetinė ir raudona kreivės atitinkamai žymi mėginius prieš (Ž) ir po 10 (O), 30 (J), 90 (V), 180 (R) min hidrolizės(-ės). Naudotas HPLC-MS gradientas buvo 10 mM (NH₄)₂CO₃ su ACN.

Nustačius gp531 fermentinį specifiškumą, buvo nustatomas jo aktyvumas skirtingomis sąlygomis, 10–70°C ir pH 3–10, naudojant išskirtą *Klebsiella* sp. KV-3 izoliato K54 serotipo polisacharidą ir analizuojant TLC bei HPLC-MS

metodais. TLC analizė leido kokybiškai įvertinti fermentinį aktyvumą (**10P pav.**), kuris pasireiškė 10–60°C ir pH 3–8 sąlygomis.

HPLC-MS analizė leido kiekybiškai nustatyti gp531 aktyvumą skirtingomis sąlygomis – iš hidrolizės produktų (masių spektruose aptinkamų kaip 663 ir 687 m/z jonų intensyvumo signalai) buvo apskaičiuojamas santykinis fermento aktyvumo vidurkis.



41 pav. Santykinio gp531 aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros (a) ir pH (b). Remiantis produkto-tetrasacharido jonų molekulių masių signalų ([M-H]⁻=663 ir [M+Na]⁺=687) intensyvumų bendru plotu, 2–4 min ribose iš HPLC-MS analizės duomenų (n=4) apskaičiuotas gp531 aktyvumo vidurkis su $\pm$ SD.

Nustatyta, kad $92 \pm 6\%$ aktyvumas išlieka 25–50°C, o optimali gp531 veikimo temperatūra yra 36°C (**41 a pav.**), tačiau jo vykdoma hidrolizė sparčiai mažėja 50–66°C ribose. Taip pat gp531 yra aktyvesnis rūgštiniuose tirpaluose (pH 3–5), kai optimalus pH yra 4, tačiau 30–44% aktyvumas matomas ir pH 6–8 ribose (**41 b pav.**). Verta paminėti, kad žemose temperatūrose gp531 veikimas beveik nėra slopinamas.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Bioinformatinė RaK2 baltymų analizė

RaK2 baltymams, gp098 ir gp526–534, buvo sugeneruoti struktūriniai mono- ir trimeriniai modeliai bei įvertintas jų patikimumas „AlphaFold2“ įrankiu. Tuo tarpu struktūrinė ir aminorūgščių sekos homologijos išanalizuotos „Dali“ ir „Hhpred“ įrankiais.

Nors tipiniams TSP didžiausią panašumą rodo gp527, gp529 ir gp530 (A grupė), pastarieji taip pat skiriasi struktūriniais elementais: skirtingu NTD skaičiumi; gp530 turi CTD endosaperoną, būdingą T5 fago L-formos uodegos ataugėlėje²²¹ ar netipinės struktūros TSP su sialidazės aktyvumu²³⁵. Depolimerazės trigubos β -spiralinės sritis, būdinga tipiniams *amforos* struktūros TSP^{21,65}, taip pat buvo nustatyta gp527–528 ir gp531–533 baltymuose (B grupė), tačiau šie baltymai tarpusavyje pasižymi mažu panašumu, ypač N galo srityse. Struktūrai savitumo suteikia papildomi „galvos“ domenai, homologiški CBA120

D1,2 ir XD2,3, kurie sudaryti iš β -klostinių trimerinių struktūrų ir D su XD sąveika lemia CBA120 fago ataugėlės šakotumą¹⁶⁶.

Įdomu tai, kad ataugėlės pagrindą sudaro didžiausias TSP4 baltymas, turintis daugiausiai XD domenų ir AD, atsakingą už TSP4 prijungimą prie bazinės plokštelės²¹. Panašiomis savybėmis pasižymi ir RaK2 gp528 baltymas, kuriam nustatyta penki XD domenai, tačiau gp528 nerodo struktūrinės homologijos su CBA120 TSP4 AD, bet gp528 srities seka (1–105 aa) yra itin konservatyvi tarp *Alcyoneusvirus* fagų. Vadinas, ši gp528 sritis, kaip ir TSP4 AD, veikiausiai prijungia ataugėlę prie šiai genčiai būdingų fagų bazinės plokštelės.

Į TSP panašių gp527–533 baltymų, išskyrus gp530, paskutinytis CTD įprastai formuojamas iš atskirų β -sumuštininių, kurie dažniausiai asocijuojasi į trimerinę trikampę struktūrą, skirtingai nuo NTD, kur atskiri β -sumuštiniai, suformuoja trimerinę „trilapio dobilo“ struktūrą. Nors TSP CTD ir gretimų domenų funkcija yra mažai ištirta, tačiau numatyta, kad gp528 ir gp531 CTD pasižymi struktūrine homologija baltymams, sąveikaujantiems su polimerais.

Sumodeliuotų baltymų gp098, gp526 ir gp534 struktūros neturėjo depolimerazės domeno. Nors gp526 modelis turi TSP būdingų struktūrinių elementų, kaip NTD, homologišką CBA120 TSP1 D1 domenui, jo „kūno“ sritis, kuri sudaryta iš β -klosčių, neformuoja trigubos β -spiralės, bet sudaro tris atskirus domenus.

CBA120 TSP3 D2 homologiškas domenas buvo nustatytas ir gp534 NTD, tačiau likusi baltymo dalis yra visiškai nepanaši į TSP. Gp534 sudaro stiebo struktūrą, suformuotą iš persipynusių atskirų polipeptidų, kuri baigiasi sferine (*knob*) struktūra²²⁶. Iš visų baltymų mažiausia struktūrine homologija ir modelio patikimumu pasižymi gp098, išskyrus CTD, kuriame yra sferinė struktūra, sudaryta iš β -sumuštininių. Abiejų baltymų, gp534 ir gp098, CTD sritys rodo didesnę homologiją ataugėlių domenams, prisijungiantiems giminingumo sąveikomis, kas rodo mažesnę panašumą TSP baltymams²²⁷.

Taigi, gp526–533 panašūs į depolimeraziniu aktyvumu pasižyminčius TSP, išskyrus gp526, kuris panašus tik dydžiu ir NTD homologija, bet neturi katalitinio domeno – trigubos β -spiralės regiono. Likę, gp098 ir gp534, yra artimi fagų ataugėlėms arba panašiomis savybėmis pasižymintiems baltymams.

4.2. Adsorbcijos komplekso tyrimai

RaK2 adsorbcijos komplekso tyrimo metu genų inžinerijos ir Ni^{2+} giminingumo chromatografijos būdais buvo atitinkamai kuriami ir gryninami RaK2 rekombinantiniai baltymai, gp098, gp526–534. Pilną aminorūgščių seką turinčių baltymų indukcijos sąlygų optimizavimo ir gryninimo metu tikrai gp526, gp529 ir gp531–533 baltymai buvo išgryninti tirpūs, o likusieji (gp098, gp527, gp528, gp530 ir gp534) buvo sintetinami netirpūs. Tai nėra nuostabu, nes žinoma, kad įprastai TSP baltymų:

(i) atskiro subvieneto N galas gali būti labilus dėl jame esančių hidrofobinių sričių²³⁶, per kurias vyksta kitų TSP prijungimas, ir kurios bendrai lemia lėtesnį baltymo susisukimo procesą. Vis dėlto, indukcijos metu susidaręs didelis polipeptido kiekis ir nevykstanti heteromerizacija skatina baltymo molekulių agregaciją – klaidingą polipeptidų susisukimą ir tarpusavio asociaciją²³⁷;

(ii) C galas įprastai skatina baltymo subvienetų trimerizaciją²³⁸. Kai kuriais unikaliais atvejais, kaip fagų sialidazėse, K1F endoNF²³⁹ ir K1E endoNE²⁴⁰, yra aptinkamas C-galinis endošaperonas, užtikrinantis stabilią susisukusio baltymo struktūrą;

todėl siekiant pagerinti gp098, gp527, gp528, gp530 ir gp534 tirpumą, buvo sukurti nepilnos, atitinkančios polipeptido N arba C galą, aminorūgščių sekos rekombinantiniai baltymai ir pakartotas biosintezės optimizavimas. Tokiu būdu išgryninti tik gp098C ir gp528N, nepilnos sekos baltymai, o netirpūs gp527C, gp530C ir gp534C – ištirpinant denatūruojančiomis sąlygomis, 6 M karbamidu praturtintuose tirpaluose.

Išgrynintų rekombinantinių baltymų SDS-PAGE analizė parodė, kad gp530C baltymas buvo dalinai proteolitiškai hidrolizuotas dėl jame esančios nustatytos endošaperono struktūros, nes kartu išgrynintas ir ≈ 13 kDa oligopeptidas. Kita vertus, tyrimai su T5 ilgosiosios L-formos uodegos ataugėlės pb1 rodo, kad endošaperonas savaime vykdo proteolizę ir jo nebėra galutinėje baltymo struktūroje²²¹. Tikėtina, kad dalinė gp534C hidrolizė susijusi su baltymo agregacija ir gryninimu denatūruojančiomis sąlygomis.

Išgrynintais rekombinantiniais baltymais buvo atlikta triušių imunizacija ir įvertintas išskirtų atitinkamų antiserumų aktyvumas „Western blot“ analize, kuri įrodė jų reaktyvumą prieš savo antigenus. Tuo tarpu, vertinant antiserumų veiklumą prieš RaK2, nebuvo nustatyta sąveika tik su gp527, gp530 ir gp534, net ir panaudojant dešimčia kartų didesnius mėginių kiekius. Šis neveiklumas gali būti susijęs su atitinkamų rekombinantinių baltymų klaidingu susisukimu ir vykstančios agregacijos, kas skatina erdvinius epitopus atpažįstančių antikūnų susidarymą imunizacijos metu. RaK2 baltymų struktūra denatūruojama vykdant SDS-PAGE ir antiserumuose esantys antikūnai nesąveikauja su atitinkamais baltymais „Western blot“ analizėje. Panašus antikūnų reaktyvumo nebuvimas prieš denatūruojančiomis sąlygomis išgrynintą baltymą buvo matomas fago SPP1 gp21 ir bakterinio baltymo YueB sąveikos tyrimuose²⁴¹.

Įdomu, kad antiserumas prieš gp534C savo antigeno mėginyje reaguoja su dviem ≈ 28 ir 56–58 kDa baltymais, atitinkančiais gp534C monomero ir dimero molekulinės masės. Tikėtina, tai yra susiję su baltymo struktūros stabilumu, nes bakteriofagų TSP tyrimose, būtent su P22 gp9 ir Sf6 p14, buvo aptiktas dalinis atsparumas SDS sukeliamai denatūracijai²⁴². Taip pat RaK2 suspensijos mėginyje matoma anti-gp534C sąveika su ≈ 150 kDa baltymu, kuris atitinka pilnos sekos gp534 dimerą (141,6 kDa), tačiau tam patvirtinti reikėtų atlikti papildo-

mus tyrimus. Taip pat aptiktas potencialus kryžminis antikūnų aktyvumas, kuris pasireiškė sąveika tarp anti-gp532 su gp531 ir anti-gp531 su gp532, kuri tikriausiai lemia tarp baltymų N galų 41% identiškumas. Norint patvirtinti šią hipotezę, reikia atlikti papildomus tyrimus, kadangi „Proteintech“ ir „Abcam“ įmonių teigimu, kryžminis reaktyvumas pasiekiamas, kai yra bent 60–85% sekų identiškumas tarp polipeptidų, o tyrimai su žinduolių albumino baltymais rodo, kad tam pasiekti reikia 80% identiškumo tarp aminorūgščių sekų²⁴³.

Baltymų biosintezės tyrimų metu nustatyta, kad RaK2 struktūrinių baltymų gp098, gp526, gp528, gp529 ir gp531–533 biosintezė jau vyksta 30–40 min po infekcijos bakteriofagu. Kadangi ankstyvieji promotoriai yra aktyvūs pirmosiomis infekcijos minutėmis, tai reiškia, kad RaK2 tiriamųjų baltymų genai yra nurašomi nuo vėlyvųjų promotorių, o tai yra būdinga fago morfogenezės baltymams²⁴⁴, ką patvirtina ir tyrimai su Tuc2009 fagu²⁴⁵.

Naudojant išskirtus antiserumus RaK2 infekcijos slopinimo tyrime, nustatytas reikšmingas baltymų gp098 ir gp531 vaidmuo, nulemiantis *Klebsiella* KV-3 bakterijų užkrėtimą. Infekcija nuslopinama $>4 \cdot 10^5$ kartų, blokuojant bet kurį iš abiejų baltymų. Papildomas nežymus, tačiau statistiškai reikšmingas slopinimas buvo matomas ir blokuojant gp532 ir gp533 baltymus. Atitinkamai tai gali būti susiję su anti-gp532 kryžminiu aktyvumu prieš gp531 ir anti-gp533 sąveikos su gp533 netiesioginiu RaK2 slopinimu, kadangi gp531 ar gp098 baltymai yra erdviškai kliudomi. Likusių RaK2 baltymų (gp526–530 ir gp532–533) blokavimas atitinkamais antiserumais neturėjo įtakos infekcijai, kas veikiausiai susiję su fago daugiavalentiškumu.

Nustačius, kad RaK2 baltymai gp098 ir gp531 yra svarbūs *Klebsiella* KV-3 užkrėtimo procese, buvo netiesiogiai tiriamas jų poveikis fago vykdomai infekcijai. Tyrimo sąlygomis, gp531 paveiktos bakterijos pasižymėjo apie 38% mažesne fago adsorbcija, skirtingai nuo gp098C poveikio, kuris buvo nereikšmingas, nepriklausomai nuo to ar ląstelės buvo paveiktos atskirai gp098C, ar kartu su gp531. Nors bakterijos paveiktos gp098C neturi įtakos fago adsorbcijai, tačiau anti-gp098C poveikis slopina RaK2, o tai rodo gp098 svarbą infekcijoje – abu baltymai greičiausiai veikia koordinuotai. Tikėtina, kad gp531 veikia pirmas, formuodamas tunelį kapsulėje iki bakterijos išorinės membranos, kur gp098 sąveika skatina tolimesnę infekcijos eigą. Šis veikimo modelis leidžia paaiškinti: (i) paveiktos gp098 baltymu KV-3 ląstelės neturi įtakos RaK2 adsorbcijai, kadangi gp098 negali prasiskverbti pro kapsulę iki membranos; (ii) abejais baltymais paveiktos KV-3 bakterijos neturi reikšmingo poveikio RaK2 adsorbcijai, nes didesnė tikimybė yra paties RaK2 sąveikai su kapsule per jo gp531 (tai veikiausiai yra ir fago varomoji jėga), nei jo difuzijai link gp098 prisijungimo srities pro atsitiktinai rekombinantinio gp531 apskaidytą kapsulę; arba (iii) RaK2 adsorbcijai ir gp098 veikimui sukelti būtina pirminė gp531

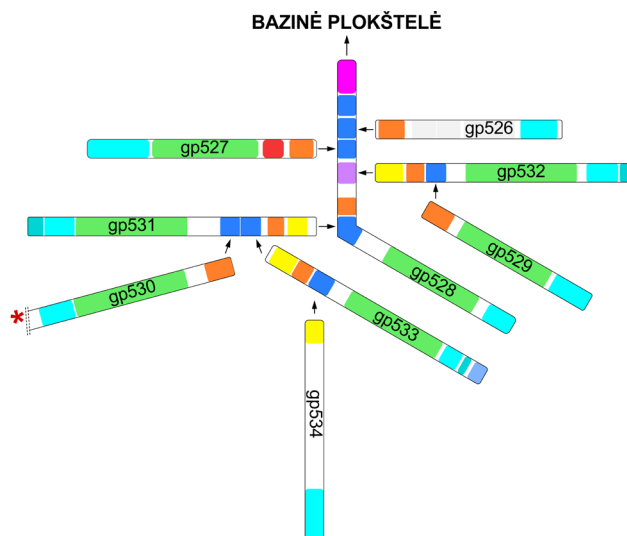
sąveika su KV-3, panašiai kaip ir T4 bakteriofago adsorbcijos metu, todėl KV-3 bakterijos nebus užkrečiamos fagu, net jei bakterijos neturėtų kapsulės.

Struktūrinis gp098 modeliavimas neparodė tipiškos TF struktūros, kuria būtų galima tvirtai pagrįsti bakteriofago adsorbcijos dvikomponentinį mechanizmą. Įdomu tai, kad gp098 vienas iš C-galinių („Hhpred“ analizė: 509–595 aa, 91% tikimybė, 27% identiškumas, 0,348 panašumas) homologų buvo fago AP22 baltymo gp53 C galas²⁴⁶. Šio homologo tyrimai rodo, kad jis turi TF savybių ir veikiausiai prisijungia prie bakterinių polisacharidų. Tuo tarpu, fago AP22 adsorbcijos tyrimų su gp53C rezultatai buvo tokie pat kaip ir RaK2 gp098C atveju, tikėtina, dėl to ir gp098 yra viruso trumpoji uodegos ataugėlė.

Atlikus imuno-Au-žymėtų prieš RaK2 gp098 ir gp526–534 TEM analizę, nustatyta, kad visi tiriamieji baltymai buvo matomi, išsidėstę adsorbcijos komplekso srityje. Kita vertus, dėl žymėjimo ir mėginių paruošimo metodų jautrumo, nanostruktūrų labilumą ir atsižvelgiant į pirminių antikūnų heterogeniškumą, buvo sunku nustatyti tikslią atitinkamo RaK2 baltymo vietą. Su tokiais pat sunkumais susidūrė ir mokslininkai, vykdę panašius tyrimus bakteriofagams Tuc2009²⁴⁵ ir A511²⁴⁷.

Kita vertus, RaK2 baltymams gp528 ir gp534 nustatytos gana tikslios vietos atitinkančios proksimalinę ir terminalinę šakotųjų LTF sritys. Likusiųjų baltymų atveju, buvo matomos tik išsidėstymo tendencijos: gp526, gp527 ir gp532 aptikti medialinės LTF srityse, o gp530 ir gp531 – distalinėse. Tuo tarpu gp529 ir gp533 padėtis nebuvo aiški, kas reiškia, kad pastarieji baltymai, tikėtina, yra prisijungę prie ypač labilių ataugėlės dalių. Galiausiai, nustatyta gp098 išsidėstymo tendencija ant virionų su sutraukta uodega leidžia manyti, kad tai yra labiau bazinės plokštelės baltymas nei LTF. Visgi, nepaisant metodinių sunkumų, su kuriais buvo susidurta tiriant RaK2 šakotąsias LTF ir atsižvelgiant į literatūroje aprašytus bei panaudotus našesnesnius metodus kaip krio-EM, kuriais nepavyko nustatyti tikslią didžiųjų fagų adsorbcijos komplekso architektūrą, sudarytą iš labilių nanostruktūrų (φKp24⁶⁹ tyrimai), visgi remdamiesi bioinformatikos, imuno-žymėjimo, AFM, fago slopinimo tyrimų duomenimis pasiūlėme tikėtiną RaK2 ataugėlės struktūros ir susirinkimo modelį (**42 pav.**).

Imuno-žymėjimo, RaK2 infekcijos blokavimo ir adsorbcijos tyrimų rezultatai leidžia manyti, kad gp098 yra atskiras, prie bazinės plokštelės prisijungęs, bet neįeinantis į bendrą LTF struktūrą, baltymas, kuris funkcionuoja kaip fago ataugėlė, panašiai kaip T4 gp12⁵⁰. Taip pat gp098 bioinformatinė analizė nenumatė jokio homologiško domeno, atsakingo už baltymo-baltymo prisijungimą, kas yra matoma šakotąsias ataugėles formuojančiose faguose kaip CBA120¹⁴¹.



42 pav. Siūlomas RaK2 šakotosios ilgosios uodegos ataugėlės architektūros modelis ir galimas gp526–534 baltymų išsidėstymas. Spalvomis pažymėti domenai: „inkaro“ AD (**rožinė**); „šakojimosi“ XD2 (**mėlyna**) ir XD3 (**violetinė**), homologiški T4 gp10 D2 ir D3; prisijungimo D1 (**oranžinė**), D2 (**geltona**) ir D3' (**raudona**), homologiški CBA120 savitiems TSP1–4 N galo domenams; katalitinis, CD (**žalsva**); C galo CTD (**žydra** ir **melsva**); sritys (**balta**), homologiškos kitiems fagų kilmės baltymams. Raudona žvaigždutė (*) žymi gp530 be endošaperono.

Kita vertus, likusiems devyniems RaK2 baltymams numatyti N-galiniai baltymus jungiantys ir (ar) šakojimosi domenai, kas rodo jų galimą tarpusavio sąveiką. O septyniuose iš jų aptikti TSP katalitiniai domenai:^{21,23,169,35,37,136,141,165–168} (fermentinis aktyvumas parodytas tik gp531, **4.3 sk.**), kas rodo panašumą su CBA120 fago LTF¹⁴¹ architektūros savybėmis.

Taigi, pirminis baltymas, veikiantis kaip platforma kitiems RaK2 baltymams susirinkti į bendrą LTF, pasižymi proksimaliniu imuno-žymėjimo išsidėstymu ir didžiausia molekuline mase, kuria pasižymi ir atitinkami fagų ϕ Kp24⁶⁹ gp306 ir CBA120¹⁴¹ TSP4 baltymai-platformos pateiktuose LTF modeliuose; taip pat turintis penkis šakojimosi domenų (XD2–3), homologiškus T4 gp10 D2–3, yra gp528. Kadangi AFM parodė neužimtą proksimalinę LTF sritį, pirmasis gp528 XD, iš penkių numatytų, nėra prisijungęs jokio kito baltymo ir, tikėtina, panašiai veikia kaip fago CBA120 baltymo TSP4 XD1¹⁴¹, kurio trimerizacijos ašis sutampa su AD domenu, kas pastarąjį papildomai stabilizuoja. Prie likusiųjų 2–5 XD nuosekliai prisijungia, kiti RaK2 baltymai (aptikti skirtingose LTF dalyse imuno-žymėjimo metu): gp526, gp527, gp532 (medialinėse) ir gp531 (distalinėje). Gp532 ir gp531, turi šakojimosi domenų (XD2), prie kurių prisijungia gp529 ir gp533. Pastarieji du neprijungia daugiau kitų baltymų, todėl jų struktūrinis labilumas yra didesnis ir matomas Au nanodalelių išsidėstymas nėra apibrėžtas. Panašiai prie gp531 antrojo XD2 prisijungia gp530, tačiau jo struktūri-

nis labilumas nėra matomas, nes gp530 žymėjimas turi apibrėžtą tendenciją distalinėje LTF dalyje. Tikėtina, taip yra dėl mažesnio gp530 dydžio, kuris susidaro atskilus endošaperonui. Prie gp533, turinčio labiausiai nutolusį XD domeną, prisijungia terminalinis LTF baltymas gp534, kuris AFM analizės metu matomas kaip LTF galūnė. Tokiu būdu iš devynių baltymų susirenka RaK2 šakotoji LTF, kurioje potencialiai yra septynios TSP-depolimerazės (CD domenai), veikiausiai skaidančios skirtingus polisacharidus.

4.3. RaK2 depolimerazės charakterizavimas

RaK2 išgrynintų pilnos aminorūgščių sekos gp526, gp529, gp531–533 baltymų įvertinimas skaidrių zonų testu parodė, kad tik gp531 yra depolimerazė, kuri veikia tik prieš *Klebsiella* KV-3 bakterijų padermę. Likusieji, gp526, gp529, gp532 ir gp533, neparodė depolimerazinio aktyvumo prieš visas tirtas *Klebsiella* spp. padermes: KV-1, KV-3, ATCC 8724, ATCC BAA-1705 ir 279. Įdomu tai, kad skaidrių zonų, susidariusių dėl gp531 lašinimo, intensyvumas palaipsniui mažėja priklausomai nuo baltymo kiekio ir temperatūros. Nors depolimerazė nevykdo ląstelių lizės, jos poveikis tikriausiai slopina bakterijų auginimą. Fago SP6¹⁵⁶ krio-EM tyrimai parodė, kad LPS O-antigeną skaidanti depolimerazė priartėjusi prie ląstelės paviršiaus taip pat sąveikauja su lipidu A, kuris gyvybiškai svarbus ląstelės integralumui. Tikėtina, kad panašiai veikia ir gp531, papildomai prisijungiantis prie bakterijos išorinės membranos komponento, kurį slopina ir priklausomai nuo aktyvaus gp531 kiekio nulemia ląstelių žūtį, pasi-reiškančią „liziniu“ poveikiu.

Kita vertus, nėra nuostabu, kad tirti RaK2 baltymai ir kitose *Klebsiella* padermėse nerodo depolimerazinio aktyvumo, nes įprastai bakteriofaguose esantys skirtingi TSP sąlygoja platesnį bakteriofago šeimininkų ratą, ką rodo tyrimai su 0507-KN2-1²⁴⁸, phiK64-1⁶³, K5³² ar IME200²⁴⁹ fagais. Kadangi fagai dėl jų mažo genomo patiria stiprią evoliucinę atranką, o vystymasis glaudžiai susijęs su šeimininkės-bakterijos transkripcijos/ transliacijos sistemomis ir ypač jautriai atranka vyksta per RBP pokyčius, todėl dviejų to paties geno kopijų turėjimas yra evoliuciškai nenaudingas^{250,251}.

Siekiant nustatyti gp531 fermentinį specifiškumą, pirmiausia buvo išbandyti 27 potencialūs susbtratai (įvairūs sacharidai ir chromogeniški junginiai), tačiau prieš juos gp531 aktyvumas nebuvo aptiktas. Tai nenuostabu, nes fagų depolimerazėms būdingas didelis specifiškumas, kadangi jų trimerizacijos metu, tvarkingai asocijuojantis β -spiralėms, baltyme susiformuoja plyšys su aktyviuoju centru, kuriame bent vienas polisacharido pasikartojantis vienetas yra tikslingai koordinuojamas katalizės vykdymui^{38,165}. HK620 p57 ir EP75 gp167²⁰⁴ depolimerazių ankstesni tyrimai parodė, kad netgi skirtingi glikozilo pakaitai polisacharido sandaroje ir kartu su aktyvaus centro struktūra gali papildomai apriboti katalizuojamų reakcijų skaičių.

Siekiant toliau ištirti gp531 fermentinį specifiskumą, kaip substratas buvo panaudotas *Klebsiella* KV-3 bakterijų kapsulinis polisacharidas. Jo tipas buvo nustatytas atliekant *Klebsiella* KV-3 *cps* genų sancaupos bioinformatinę analizę, kurios metu nustatyta, kad KV-3 bakterijos priklauso K54 serotipui, kurio kapsulės polisacharido struktūra ir sudėtis buvo nustatyta ir aprašyta anksčiau^{233,234}. *Klebsiella* sp. KV-3 kapsulės tyrimo metu papildomai buvo nustatyta, kad priklausomai nuo bakterijų kultivavimo trukmės, palaipsniui vyksta K54 polisacharido deacetilinimas, tačiau tai neturi įtakos fermentiniam gp531 aktyvumui. Nustatyta, kad acetilinimas neturi įtakos aktyvumui ir bakteriofago K F34 depolimerazei, veikiančiai kaip fukozidazė prieš *E. coli* K27 ir *K. aerogenes* K54 polisacharidus²⁵².

Paties polisacharido acetilinimas yra glaudžiai susijęs su acetyl-KoA metabolismu²⁵³, skatina bakterijų prisitvirtinimą prie eukariotinių ląstelių ir padidina polisacharido struktūros stabilumą, tačiau padidėja jo imunogeniskumas^{91,254}. Taip pat ištirta, kad ne- (i) ir acetilinti (ii) K54 tipo polisacharidai pasižymi skirtingomis struktūrinėmis savybėmis: (i) dvigrandės spiralės konformacija, kurioje aštuonios sacharido liekanos išsidėsto per tris spirales kilpas ir kuri esant dideliam polisacharido arba druskų kiekiui pasikeičia į gelinę formą; (ii) atskiros spiralės, sudarančios laisvus tarpgrandinius ryšius^{255,256}.

Tiriant HPLC-MS metodu *Klebsiella* KV-3 K-tipą, parodyta, kad gp531 skaido K54 polisacharidą į skirtingo dydžio produktus: tetra-, okta- ir dodekasacharidą, kas rodo glikozilo endohidrolazės aktyvumą. Taip pat endohidrolazinis aktyvumas buvo aptiktas *A. baumannii* APK faguose³⁰ ir *K. pneumoniae* KpV79 ir KpV767 virusuose⁷⁰, o pastarųjų abiejų polisacharidų hidrolizės produktai yra monomerai ir dimerai. Įdomu tai, kad vykstant K54 polisacharido hidrolizei, veikiant ląstelių biomasę gp531, ir reakcijos mėginius analizuojant HPLC-MS, buvo aptinkti skirtingo dydžio susidariusių acetilintų oligosacharidų populiacijos, o masių spektruose šie junginiai taip pat buvo matomi kaip nepraradę protonų vandens molekulės aduktai (**7P pav.**). Šis reiškiny, kai kovalentinis ryšys susidaro iš dvigubojo karbonilo grupės ryšio sąveikos su vandens radikalo katijonu H_2O^{+} yra gerai žinomas mikroskysčių chemijoje²⁵⁷.

RaK2 gp531 skaidomas polisacharido K54 glikozidinis ryšys, dėl analitinių metodų trūkumų, buvo nustatomas dviem skirtingais būdais. Fermentinės reakcijos metu susidariusio produkto, tetrasacharido, redukuojantis galas buvo modifikuojamas vykstant redukciją $NaBH_4$ arba derivatizaciją ANTS fluoroforu. Po modifikacijos įvykdoma mėginių hidrolizė TFA ir susidarę junginiai analizuojami TLC ir HPLC-MS. Verta paminėti, kad redukuoto tetrasacharido TLC analizės metu nebuvo detektuotas joks redukuotas monosacharidas ar atskilusi fukozė arba gliukurono rūgštis. Kita vertus, visuose mėginiuose, tiek prieš ir po redukcijos, buvo matomas tas pats oranžinės spalvos junginys. Tikėtina, kad tai yra disacharidas, sudarytas iš fukozės ir gliukurono r., α -D-GlcA-(1→3)- α -L-

Fucp²⁵⁸, nes ankstesni tyrimai rodo prastą glikuroninių sacharidų hidrolizę TFA rūgštimi^{258–260}. Galiausiai, HPLC-MS analizė patvirtino redukuotos gliukozės signalo didėjimą vykstant redukuoto tetrasacharido hidrolizei TFA. Kita vertus, tyrimai su ANTS derivatizuotu tetrasacharidu parodė, kad hidrolizės TFA metu aptiktas intensyviausias HPLC-MS signalas, atitiko ANTS-gliukozę, kuris taip pat palaipsniui mažėjo. Tai reiškia, kad ANTS-gliukozė papildomai TFA degraduojama iki TLC analizės aptinkamo junginio. Įdomu tai, kad ANTS-gliukozę atitinkantis signalas buvo matomas ir prieš TFA hidrolizę, kas galimai susiję su junginio fragmentacija HPLC-MS jonizacijos metu²⁶¹.

Abiejų metodų rezultatai vienas kitą papildė ir buvo sėkmingai identifikuotas gp531 fermentinis specifiškumas – K54 serotipo polisacharido β -(1→4)-endo-gliukozidazė – pirmasis literatūroje aprašytas baltymas su žinoma aminorūgščių seka, tokiu specifiškumu ir substratu. Anksčiau atrasti bakteriofagai, ϕ 54²³³ ir ϕ 31²⁵⁸, pasižymėjo identišku gp531 aktyvumu, tačiau jų depolimerazių genai nėra žinomi. Įdomu tai, kad bakteriofagas F32 turi fukozidazę, hidrolizuojančią ne tik *Klebsiella aerogenes* K54, bet ir *E. coli* K27 (E56b) polisacharidą. Struktūriškai abu polisacharidai išsiskiria tik šoniniu monosacharido pakaitu: K27 turi β -D-galaktozę vietoj gliukozės^{252,262–264}. Tai reiškia, kad K27 polisacharidas gali būti potencialiai panaudotas kaip dar vienas gp531 substratas.

Galiausiai, pritaikant HPLC-MS analizę ir atliekant susidariusių produktų jonų masių intensyvumo matavimus įvertintas gp531 fermentinis aktyvumas skirtingomis pH ir temperatūrų sąlygomis. Nustatyta, kad gp531 yra aktyviausias rūgštiniuose (pH 3–5) buferiniuose tirpaluose, esant 25–50°C temperatūrai. Panašus aktyvumo pobūdis nustatytas ir *Klebsiella* fago KP36 depolimerazei gp50, ypač aktyviai pH 4–7 riboje, o esant 55°C praranda 30% savo veiklumą²⁶⁵. Kita vertus, gp531 optimalios katalizės pH sutampa su *Erwinia amylovora* fago ϕ -Ea1h²⁶⁶ depolimeraze, kurios pH veikimo optimumas yra 4 arba 5.

Atlikti RaK2 tyrimai suteikia papildomų žinių apie *Alcyoneusvirus* didžiųjų bakteriofagų adsorbcijos komplekso savybes: šakotųjų ilgųjų uodegos ataugėlių (LTF) galimą architektūrą; tikėtiną dvikomponentinį infekcijos mechanizmą; LTF sandarą, kurią sudaro depolimeraziniu aktyvumu pasižymintys baltymai; LTF esančių depolimerazių ypač savitą fermentinį specifiškumą (tik vienam glikozidiniam ryšiui iš visų esančių bakterijos kapsuliniame polisacharide) ir jų stabilumą plačiose temperatūrų ir pH sąlygų ribose. Šie atradimai prisideda ne vien fundamentaliomis žiniomis apie *jumbo* fagus, tačiau ir apie jų baltymų galimą pritaikymą, vykdant cheminių sintezių biokatalizes fiziologinėmis sąlygomis įvairiose srityse: medicinoje, maisto ar sacharidų pramonėje.

IŠVADOS

1. RaK2 gp098 ir gp526–534 baltymų bioinformatinė analizė parodė, kad domenai, atsakingi už baltymų prisijungimą (D, XD), depolimerazinį aktyvumą (CD) taip pat aptinkami *jumbo* faguose, o tai rodo didelį šių domenų struktūrinį konservatyvumą.

2. Nustatyta, kad šakotąsias ilgąsias uodegos ataugėles turintys bakteriofagai (RaK2) gali atpažinti bakterijas (*Klebsiella* sp. KV-3) naudodami du baltymus (gp531 ir gp098).

3. Empiriškai parodyta, kad RaK2 šakotąją ilgąją uodegos ataugelę sudaro gp526–534. Remiantis tyrimo duomenimis pasiūlytas galimas ir pirmasis ataugėlės architektūros modelis *Alcyoneusvirus* genties virusams.

4. Genotipuojant *Klebsiella* sp. KV-3 *cps* sritį, nustatytas kapsulės K-serotipas yra K54. Parodyta, kad jos polisacharido acetilinimo lygis priklauso nuo bakterijų augimo fazės.

5. *K. pneumoniae* K54 serotipo kapsulės polisacharido hidrolizės, katalizuojamos RaK2 gp531, produkto cheminės modifikacijos ir HPLC-MS metodu nustatytas fermentinis specifiskumas – rūgštinė β -(1→4)-D-endogliukozidazė – tai pirmoji charakterizuota depolimerazė, veikianti būtent šį polisacharidą kaip substratą.

INFORMACIJOS ŠALTINIAI

1. Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K. & Carattoli, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 252–275 (2017).
2. Seiffert, S. N. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *Int. J. Antimicrob. Agents* **44**, 260–262 (2014).
3. Effah, C. Y., Sun, T., Liu, S. & Wu, Y. *Klebsiella pneumoniae*: An increasing threat to public health. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **19**, 1–9 (2020).
4. Xu, Y. Phage and phage lysins : New era of bio-preservatives and food safety agents. *J. Food Sci.* 3349–3373 (2021) doi:10.1111/1750-3841.15843.
5. Lin, D. M., Koskella, B. & Lin, H. C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **8**, 162 (2017).
6. Llor, C. & Bjerrum, L. Antimicrobial resistance: Risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther. Adv. Drug Saf.* **5**, 229–241 (2014).
7. Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E. & Okoh, A. *Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications. Molecules* vol. 23 (2018).
8. Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V. & Heaphy, S. Phages in nature. *Bacteriophage* **1**, 31–45 (2011).
9. Ackermann, H.-W. Bacteriophage Classification. in *Bacteriophages: Biology and Applications* (eds. Kutter, E. & Sulakvelidze, A.) 67–90 (CRC Press, 2004). doi:10.1201/9780203491751.ch4.
10. Ge, H. *et al.* The “fighting wisdom and bravery” of tailed phage and host in the process of adsorption. *Microbiol. Res.* **230**, 1–7 (2020).
11. Jamal, M., Hussain, T., Rajanna Das, C. & Andleeb, S. Characterization of siphoviridae phage Z and studying its efficacy against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* planktonic cells and biofilm. *J. Med. Microbiol.* **64**, 454–462 (2015).
12. Gordillo Altamirano, F. L. & Barr, J. J. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, 1–25 (2019).
13. Marongiu, L., Burkard, M., Lauer, U. M., Hoelzle, L. E. & Venturelli, S. Reassessment of Historical Clinical Trials Supports the Effectiveness of Phage Therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* **35**, 1–31 (2022).
14. Palma, M. & Qi, B. Advancing Phage Therapy: A Comprehensive Review of the Safety, Efficacy, and Future Prospects for the Targeted Treatment of Bacterial Infections. *Infect. Dis. Rep.* **16**, 1127–1181 (2024).
15. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. & Morris, J. G. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 649–659 (2001).
16. Khorshidtalab, M. *et al.* Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages from Wastewater with Phage Therapy Potentials Against Gram-Negative Bacteria. *Eurasian J. Med.* **54**, 157–164 (2022).
17. Artawinata, P. C., Lorraine, S. & Waturangi, D. E. Isolation and characterization of bacteriophages from soil against food spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Sci. Rep.* **13**, 1–10 (2023).
18. Dion, M. B., Oechslin, F. & Moineau, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 125–138 (2020).
19. Stone, E., Campbell, K., Grant, I. & McAuliffe, O. Understanding and exploiting phage–host interactions. *Viruses* **11**, 1–26 (2019).
20. Broeker, N. K. *et al.* Single amino acid exchange in bacteriophage HK620 tailspike protein results in thousand-fold increase of its oligosaccharide affinity. *Glycobiology* **23**, 59–68 (2013).
21. Plattner, M. *et al.* Structure and Function of the Branched Receptor-Binding Complex of Bacteriophage CBA120. *J. Mol. Biol.* **431**, 3718–3739 (2019).
22. Schwarzer, D. *et al.* Structure and biochemical characterization of bacteriophage phi92

- endosialidase. *Virology* **477**, 133–143 (2015).
23. Broecker, N. K. *et al.* Time-resolved DNA release from an O-antigen-specific *Salmonella* bacteriophage with a contractile tail. *J. Biol. Chem.* **294**, 11751–11761 (2019).
 24. Gebhart, D., Williams, S. R. & Scholl, D. Bacteriophage SP6 encodes a second tailspike protein that recognizes *Salmonella enterica* serogroups C2 and C3. *Virology* **507**, 263–266 (2017).
 25. Kanegasaki, S. & Wright, A. Studies on the mechanism of phage adsorption: Interaction between phage ϵ 15 and its cellular receptor. *Virology* **52**, 160–173 (1973).
 26. Steinbacher, S. *et al.* Crystal structure of phage P22 tailspike protein complexed with *Salmonella* sp. O-antigen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10584–10588 (1996).
 27. Wollin, R., Eriksson, U. & Lindberg, A. A. *Salmonella* Bacteriophage Glycanases: Endorhamnosidase Activity of Bacteriophages P27, 9NA, and KB1. *J. Virol.* **38**, 1025–1033 (1981).
 28. Kasimova, A. A. *et al.* The K26 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* KZ-1098: Structure and cleavage by a specific phage depolymerase. *Int. J. Biol. Macromol.* **191**, 182–191 (2021).
 29. Knirel, Y. A. *et al.* Mechanisms of *Acinetobacter baumannii* Capsular Polysaccharide Cleavage by Phage Depolymerases. *Biochem.* **85**, 567–574 (2020).
 30. Popova, A. V. *et al.* Specific Interaction of Novel Friunavirus Phages Encoding Tailspike Depolymerases with Corresponding *Acinetobacter baumannii* Capsular Types. *J. Virol.* **95**, 1–23 (2021).
 31. Shchurova, A. S. *et al.* Novel acinetobacter baumannii myovirus tapaz encoding two tailspike depolymerases: Characterization and host-recognition strategy. *Viruses* **13**, (2021).
 32. Hsieh, P. F., Lin, H. H., Lin, T. L., Chen, Y. Y. & Wang, J. T. Two T7-like Bacteriophages, K5-2 and K5-4, Each Encodes Two Capsule Depolymerases: Isolation and Functional Characterization. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
 33. Pan, Y. J. *et al.* Identification of three podoviruses infecting *Klebsiella* encoding capsule depolymerases that digest specific capsular types. *Microb. Biotechnol.* **12**, 472–486 (2019).
 34. Wang, C. *et al.* Protective and therapeutic application of the depolymerase derived from a novel KN1 genotype of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in mice. *Res. Microbiol.* **170**, 156–164 (2019).
 35. Thompson, J. E. *et al.* The K5 lyase KflA combines a viral tail spike structure with a bacterial polysaccharide lyase mechanism. *J. Biol. Chem.* **285**, 23963–23969 (2010).
 36. Scholl, D. *et al.* Genomic Analysis of Bacteriophages SP6 and K1-5, an Estranged Subgroup of the T7 Supergroup. *J. Mol. Biol.* **335**, 1151–1171 (2004).
 37. Olszak, T. *et al.* The O-specific polysaccharide lyase from the phage LKA1 tailspike reduces *Pseudomonas* virulence. *Sci. Rep.* **7**, 1–14 (2017).
 38. Tu, I. F. *et al.* Structural and biological insights into *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharide degradation by a bacteriophage K1 lyase: implications for clinical use. *J. Biomed. Sci.* **29**, 1–17 (2022).
 39. Kimura, K. & Itoh, Y. Characterization of poly- γ -glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: Possible role in phage infection of bacillus subtilis encapsulated with poly- γ -glutamate. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2491–2497 (2003).
 40. Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D. R., Sillankorva, S. & Azeredo, J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 2141–2151 (2016).
 41. Totté, J. E. E., van Doorn, M. B. & Pasmans, S. G. M. A. Successful Treatment of Chronic *Staphylococcus aureus*-Related Dermatoses with the Topical Endolysin Staphfect SA.100: A Report of 3 Cases. *Case Rep. Dermatol.* **9**, 19–25 (2017).
 42. Ye, T. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* K2 capsular polysaccharide degradation by a bacteriophage depolymerase does not require trimer formation. *Am. Soc. Microbiol.* **0**, 1–16 (2024).
 43. Hershey, A. & Chase, M. Independent Functions of Viral Protein and Nucleic acid in Growth of Bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* **36**, 39–56 (1958).
 44. Brenner, S., Jacob, F. & Meselson, M. An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis. *Nature* **190**, 576–581 (1961).

45. Arber, W. & Dussoix, D. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: I. Host controlled modification of bacteriophage λ . *J. Mol. Biol.* **5**, 18–36 (1962).
46. Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. a & Horvath, P. CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes. *Science (80-.)*. **315**, 1709–1712 (2007).
47. Cuervo, A., Chagoyen, M., Pulido-Cid, M., Camacho, A. & Carrascosa, J. L. Structural characterization of T7 tail machinery reveals a conserved tubular structure among other Podoviridae family members and suggests a common mechanism for DNA delivery . *Bacteriophage* **3**, e27011 (2013).
48. Nováček, J. *et al.* Structure and genome release of Twort-like Myoviridae phage with a double-layered baseplate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 9351–9356 (2016).
49. Xiang, Y. *et al.* Crystal and cryoEM structural studies of a cell wall degrading enzyme in the bacteriophage ϕ 29 tail. (2008) doi:10.1073/pnas.0803787105.
50. Yap, M. L. *et al.* Role of bacteriophage T4 baseplate in regulating assembly and infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 2654–2659 (2016).
51. Hrebik, D. *et al.* Structure and genome ejection mechanism of *Staphylococcus aureus* phage P68. *Sci. Adv.* **5**, 1–15 (2019).
52. Rajagopala, S. V., Casjens, S. & Uetz, P. The protein interaction map of bacteriophage lambda. *BMC Microbiol.* **11**, 213 (2011).
53. Linares, R. *et al.* Structural basis of bacteriophage T5 infection trigger and *E. coli* cell wall perforation. *Sci. Adv.* **9**, 1–12 (2023).
54. Noirclerc-Savoye, M. *et al.* Tail proteins of phage T5: Investigation of the effect of the His6-tag position, from expression to crystallisation. *Protein Expr. Purif.* **109**, 70–78 (2015).
55. Taylor, N. M. I. *et al.* Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. *Nature* **533**, 346–352 (2016).
56. Guerrero-Ferreira, R. C. *et al.* Structure and transformation of bacteriophage A511 baseplate and tail upon infection of *Listeria* cells . *EMBO J.* **38**, 1–20 (2019).
57. Effantin, G. *et al.* Cryo-electron microscopy three-dimensional structure of the jumbo phage Φ rSL1 infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Structure* **21**, 298–305 (2013).
58. Wagemans, J. *et al.* Structural Analysis of Jumbo Coliphage ϕ APEC6. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–13 (2020).
59. Yuan, Y. & Gao, M. Jumbo bacteriophages: An overview. *Front. Microbiol.* **8**, 1–9 (2017).
60. Hendrix, R. W. Jumbo bacteriophages. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **328**, 229–240 (2009).
61. Effantin, G. *et al.* Cryo-Electron Microscopy Three-Dimensional Structure of the Jumbo Phage Φ rSL1 infecting the Phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Structure* **21**, 298–305 (2013).
62. Hua, J. *et al.* Capsids and genomes of jumbo-sized bacteriophages reveal the evolutionary reach of the HK97 fold. *MBio* **8**, 1–15 (2017).
63. Pan, Y. *et al.* *Klebsiella* Phage Φ K64-1 Encodes Multiple Depolymerases for Multiple Host Capsular Types. *ASM J. Virol.* **91**, 1–16 (2017).
64. Bonilla, E. *et al.* Genomic characterization of four novel bacteriophages infecting the clinical pathogen *Klebsiella pneumoniae*. *DNA Res.* **28**, 1–11 (2021).
65. Seul, A. *et al.* Bacteriophage P22 tailspike: Structure of the complete protein and function of the interdomain linker. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **70**, 1336–1345 (2014).
66. Hoyles, L. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*-bacteriophage combination from the caecal effluent of a healthy woman. *PeerJ* **2015**, (2015).
67. Majkowska-Skrobek, G. *et al.* Phage-borne depolymerases decrease *Klebsiella pneumoniae* resistance to innate defense mechanisms. *Front. Microbiol.* **9**, 1–12 (2018).
68. Kutter, E. Phage host range and efficiency of plating. in *Bacteriophages* vol. 501 141–149 (2009).
69. Ouyang, R. *et al.* High-resolution reconstruction of a Jumbo-bacteriophage infecting capsulated bacteria using hyperbranched tail fibers. *Nat. Commun.* **13**, 1–16 (2022).
70. V. Volozhantsev, N. *et al.* Characterization and therapeutic potential of bacteriophage-encoded polysaccharide depolymerases with β galactosidase activity against *Klebsiella pneumoniae* K57 capsular type. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **9**, 1–16 (2020).
71. Bertozzi Silva, J., Storms, Z. & Sauvageau, D. Host receptors for bacteriophage adsorption.

- FEMS Microbiol. Lett.* **363**, 1–11 (2016).
72. Fernandes, S. & São-José, C. Enzymes and mechanisms employed by tailed bacteriophages to breach the bacterial cell barriers. *Viruses* **10**, 1–22 (2018).
 73. Stromberg, L. R. *et al.* Membrane insertion for the detection of lipopolysaccharides: Exploring the dynamics of amphiphile-in-lipid assays. *PLoS ONE* vol. 11 1–20 (2016).
 74. Kubler-Kielb, J. *et al.* The capsular polysaccharide and lipopolysaccharide structures of two carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak isolates. *Carbohydr. Res.* **369**, 6–9 (2013).
 75. Tu, I.-F. *et al.* Structural and biological insights into *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharide degradation by a bacteriophage K1 lyase: implications for clinical use. *J. Biomed. Sci.* **29**, 1–17 (2022).
 76. Opoku-Temeng, C., Kobayashi, S. D. & DeLeo, F. R. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **17**, 1360–1366 (2019).
 77. Podschun, R. & Ullmann, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 589–603 (1998).
 78. Follador, R. *et al.* The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb. genomics* **2**, 1–15 (2016).
 79. Patro, L. P. P. & Rathinavelan, T. Targeting the Sugary Armor of *Klebsiella* Species. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 1–23 (2019).
 80. Paczosa, M. K. & Mecsas, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 629–661 (2016).
 81. Gao, S. *et al.* Bacterial capsules: Occurrence, mechanism, and function. *npj Biofilms Microbiomes* **10**, 1–15 (2024).
 82. Pendleton, J. N., Gorman, S. P. & Gilmore, B. F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **11**, 297–308 (2013).
 83. Russo, T. A. & Marr, C. M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Am. Soc. Microbiol.* **32**, 1–42 (2019).
 84. Shao, C., Xin, L., Mi, P., Jiang, M. & Wu, H. Phenotypic and Molecular Characterization of K54-ST29 Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Causing Multi-System Infection in a Patient With Diabetes. *Front. Microbiol.* **13**, 1–9 (2022).
 85. Shi, Y. F. *et al.* Metastatic infection caused by hypervirulent *Klebsiella pneumonia* and co-infection with *Cryptococcus meningitis*: A case report. *World J. Clin. Cases* **7**, 3812–3820 (2019).
 86. Pan, Y. J. *et al.* Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci. Rep.* **5**, 1–10 (2015).
 87. Patro, L. P. P., Sudhakar, K. U. & Rathinavelan, T. K-PAM: a unified platform to distinguish *Klebsiella* species K- and O-antigen types, model antigen structures and identify hypervirulent strains. *Sci. Rep.* **10**, 1–15 (2020).
 88. Bellich, B. *et al.* Determination of the capsular polysaccharide structure of the *Klebsiella pneumoniae* ST512 representative strain KPB-1 and assignments of the glycosyltransferases functions. *Int. J. Biol. Macromol.* **155**, 315–323 (2020).
 89. Barbirz, S. *et al.* Crystal structure of *Escherichia coli* phage HK620 tailspike: Podoviral tailspike endoglycosidase modules are evolutionarily related. *Mol. Microbiol.* **69**, 303–316 (2008).
 90. Timoshina, O. Y. *et al.* Novel acinetobacter baumannii bacteriophage aristophanes encoding structural polysaccharide deacetylase. *Viruses* **13**, 1–15 (2021).
 91. Fiebig, T. *et al.* Structural and mechanistic basis of capsule O-acetylation in *Neisseria meningitidis* serogroup A. *Nat. Commun.* **11**, 1–12 (2020).
 92. Hager, F. F., Sützl, L., Stefanović, C., Blaukopf, M. & Schäffer, C. Pyruvate substitutions on glycoconjugates. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–37 (2019).
 93. Farr, R., Choi, D. S. & Lee, S. W. Phage-based nanomaterials for biomedical applications. *Acta Biomater.* **10**, 1741–1750 (2014).
 94. Taslem Mouroi, J. *et al.* Understanding Bacteriophage Tail Fiber Interaction with Host Surface

- Receptor: The Key “Blueprint” for Reprogramming Phage Host Range. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1–19 (2022).
95. Wang, L., Lin, H., Zhang, J. & Wang, J. Phage long tail fiber protein-immobilized magnetic nanoparticles for rapid and ultrasensitive detection of *Salmonella*. *Talanta* **248**, 1–9 (2022).
 96. Souza, T. *et al.* Biotechnological Production of Oligosaccharides — Applications in the Food Industry. *Food Prod. Ind.* **2**, 25–78 (2015).
 97. Osanya, A. *et al.* Pathogen-derived oligosaccharides improve innate immune response to intracellular parasite infection. *Am. J. Pathol.* **179**, 1329–1337 (2011).
 98. Chen, X. *et al.* Phage-Derived Depolymerase as an Antibiotic Adjuvant against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *bioRxiv* 1–28 (2021).
 99. Deng, X., Wang, L., You, X., Dai, P. & Zeng, Y. Advances in the T7 phage display system (Review). *Mol. Med. Rep.* **17**, 714–720 (2018).
 100. Šimoliunas, E. *et al.* *Klebsiella* Phage vB_KleM-RaK2 - A Giant Singleton Virus of the Family Myoviridae. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).
 101. Šimoliunas, E. *et al.* *Klebsiella* Phage vB_KleM-RaK2 - A Giant Singleton Virus of the Family Myoviridae. *PLoS One* **8**, (2013).
 102. Zigterman, J. W. J. *et al.* Immunogenic properties of octasaccharide-protein conjugates derived from *Klebsiella* serotype 11 capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* **47**, 421–428 (1985).
 103. Li, M. *et al.* Identification of a phage-derived depolymerase specific for KL47 capsule of *Klebsiella pneumoniae* and its therapeutic potential in mice. *Virol. Sin.* **37**, 538–546 (2022).
 104. Sharma, R. *et al.* Polymyxin B in combination with meropenem against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: pharmacodynamics and morphological changes. *Int. J. Antimicrob. Agents* **49**, 224–232 (2017).
 105. Reid, C. B., Steele, L., Pasquill, K., Parfitt, E. C. & Laupland, K. B. Occurrence and determinants of *Klebsiella* species bloodstream infection in the western interior of British Columbia, Canada. *BMC Infect. Dis.* **19**, 1–7 (2019).
 106. Struve, C. & Krogfelt, K. A. Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: Lack of correlation between in vitro and in vivo studies. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**, 149–154 (2003).
 107. Chrystle, M., Vishak, A., Sindhu, K. & Jane, M. Primary lung abscess due to multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *BMJ Case Rep.* **14**, 1–4 (2021).
 108. Alsaif, H. S., Venkatesh, S. K., Chan, D. S. G. & Archuleta, S. CT appearance of pyogenic liver abscesses caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Radiology* **260**, 129–138 (2011).
 109. Hwang, J.-A., Her, C. & Kim, Y.-W. Endocarditis Caused by Community-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Infection - A Case Report -. *Korean J. Crit. Care Med.* **28**, 41 (2013).
 110. Sundaram, V. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* brain abscess in neonates: A report of 2 cases. *J. Child Neurol.* **25**, 379–382 (2010).
 111. Xu, L., Sun, X. & Ma, X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **16**, 1–12 (2017).
 112. Farida, H. *et al.* Nasopharyngeal Carriage of *Klebsiella pneumoniae* and Other Gram-Negative Bacilli in Pneumonia-Prone Age Groups in Semarang, Indonesia. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1614–1616 (2013).
 113. Cortés, G. *et al.* Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect. Immun.* **70**, 2583–2590 (2002).
 114. Tarkkanen, A. M., Westerlund-Wikström, B., Erkkilä, L. & Korhonen, T. K. Immunohistological localization of the MrkD adhesin in the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **66**, 2356–2361 (1998).
 115. Lenchenko, E., Blumenkrants, D., Sachivkina, N., Shadrova, N. & Ibragimova, A. Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Vet. World* **13**, 197–200 (2020).
 116. Arato, V., Raso, M. M., Gasperini, G., Scorza, F. B. & Micoli, F. Prophylaxis and treatment against *Klebsiella pneumoniae*: Current insights on this emerging anti-microbial resistant global threat. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 117. Miethke, M. & Marahiel, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control.

- Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 413–451 (2007).
118. Vinogradov, E. *et al.* Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*: Elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains. *J. Biol. Chem.* **277**, 25070–25081 (2002).
 119. Buffet, A., Rocha, E. P. C. & Rendueles, O. Nutrient conditions are primary drivers of bacterial capsule maintenance in *Klebsiella*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **288**, 1–10 (2021).
 120. Cress, B. F. *et al.* Masquerading microbial pathogens: Capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 660–697 (2014).
 121. Gencay, Y. E., Sørensen, M. C. H., Wenzel, C. Q., Szymanski, C. M. & Brøndsted, L. Phase variable expression of a single phage receptor in *Campylobacter jejuni* NCTC12662 influences sensitivity toward several diverse CPS-dependent phages. *Front. Microbiol.* **9**, 1–13 (2018).
 122. Stephens, Z., Wilson, L. F. L. & Zimmer, J. Diverse mechanisms of polysaccharide biosynthesis, assembly and secretion across kingdoms. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **79**, 1–9 (2023).
 123. Collins, R. F. *et al.* The 3D structure of a periplasm-spanning platform required for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 2390–2395 (2007).
 124. Yang, Y. *et al.* The molecular basis of regulation of bacterial capsule assembly by Wzc. *Nat. Commun.* **12**, 1–13 (2021).
 125. Rendueles, O. Deciphering the role of the capsule of *Klebsiella pneumoniae* during pathogenesis: A cautionary tale. *Mol. Microbiol.* **113**, 883–888 (2020).
 126. Bellich, B. *et al.* Structure of the capsular polysaccharide of the KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strain KK207-2 and assignment of the glycosyltransferases functions. *Int. J. Biol. Macromol.* **130**, 536–544 (2019).
 127. AL-Busaidi, B. *et al.* Hypervirulent Capsular Serotypes K1 and K2 *Klebsiella pneumoniae* Strains Demonstrate Resistance to Serum Bactericidal Activity and Galleria mellonella Lethality. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 1–20 (2024).
 128. Fontenot, C. R. & Ding, H. Ferric uptake regulator (Fur) binds a [2Fe-2S] cluster to regulate intracellular iron homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **299**, 104748 (2023).
 129. Cheng, H. Y. *et al.* RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J. Bacteriol.* **192**, 3144–3158 (2010).
 130. Yeh, K. M. *et al.* Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 466–471 (2007).
 131. Yang, F. L. *et al.* Structure and immunological characterization of the capsular polysaccharide of a pyrogenic liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae*: Activation of macrophages through toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* **286**, 21041–21051 (2011).
 132. Peirano, G., Chen, L., Kreiswirth, B. N. & Pitout, J. D. D. Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella pneumoniae* Clones ST307 and ST147. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, 1–14 (2020).
 133. Braga, L. P. P. *et al.* Viruses direct carbon cycling in lake sediments under global change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**, 1–12 (2022).
 134. White, H. E. *et al.* Capsid Structure and Its Stability at the Late Stages of Bacteriophage SPP1 Assembly. *J. Virol.* **86**, 6768–6777 (2012).
 135. Ackermann, H.-W. & Eisenstark, A. The Present State of Phage Taxonomy. *Intervirology* **3**, 201–219 (1974).
 136. Nobrega, F. L. *et al.* Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 760–773 (2018).
 137. Turner, D. *et al.* Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Arch. Virol.* **168**, 1–9 (2023).
 138. Latka, A., Maciejewska, B., Majkowska-Skrobek, G., Briers, Y. & Drulis-Kawa, Z. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 3103–3119 (2017).
 139. Islam, M. Z. *et al.* Molecular Anatomy of the Receptor Binding Module of a Bacteriophage

- Long Tail Fiber. *PLoS Pathog.* **15**, (2019).
140. Leiman, P. G. *et al.* Structure of bacteriophage T4 gene product 11, the interface between the baseplate and short tail fibers. *J. Mol. Biol.* **301**, 975–985 (2000).
 141. Chao, K. L. *et al.* Structure of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage CBA120 tailspike protein 4 baseplate anchor and tailspike assembly domains (TSP4-N). *Sci. Rep.* **12**, 1–18 (2022).
 142. Weigele, P. R., Scanlon, E. & King, J. Homotrimeric, β -stranded viral adhesins and tail proteins. *J. Bacteriol.* **185**, 4022–4030 (2003).
 143. Goulet, A., Spinelli, S., Mahony, J. & Cambillau, C. Conserved and diverse traits of adhesion devices from siphoviridae recognizing proteinaceous or saccharidic receptors. *Viruses* **12**, 1–21 (2020).
 144. Vybiral, D. *et al.* Complete nucleotide sequence and molecular characterization of two lytic *Staphylococcus aureus* phages: 44AHJD and P68. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**, 275–283 (2003).
 145. Ajuebor, J. *et al.* Comparison of *Staphylococcus* phage K with close phage relatives commonly employed in phage therapeutics. *Antibiotics* **7**, 1–14 (2018).
 146. Miller, E. S. *et al.* Bacteriophage T4 Genome †. **67**, 86–156 (2003).
 147. Shigehisa, R. *et al.* Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage KPP21 belonging to family Podoviridae genus N4-like viruses isolated in Japan. *Microbiol. Immunol.* **60**, 64–67 (2016).
 148. Wang, C. *et al.* Protective and therapeutic application of the depolymerase derived from a novel KN1 genotype of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in mice. *Res. Microbiol.* **170**, 156–164 (2019).
 149. Kutter, E. M. *et al.* Characterization of a Vil-like phage specific to *Escherichia coli* O157:H7. *Virol. J.* **8**, 1–14 (2011).
 150. Yang, C. *et al.* Characterization and Genomic Analysis of SFPH2, a Novel T7 virus Infecting *Shigella*. *Front. Microbiol.* **9**, 1–9 (2018).
 151. Topka, G. *et al.* Characterization of bacteriophage vB-EcoS-95, isolated from urban sewage and revealing extremely rapid lytic development. *Front. Microbiol.* **10**, 1–15 (2019).
 152. Lavelle, K. *et al.* A decade of *Streptococcus thermophilus* phage evolution in an Irish dairy plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, 1–17 (2018).
 153. Chaturongakul, S. & Ounjai, P. Phage-host interplay: Examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* **5**, 1–8 (2014).
 154. Dunne, M., Hupfeld, M., Klumpp, J. & Loessner, M. J. Molecular basis of bacterial host interactions by gram-positive targeting bacteriophages. *Viruses* **10**, (2018).
 155. Gerbino, K. R. *et al.* Bacteriophage Φ 21's receptor-binding protein evolves new functions through destabilizing mutations that generate non-genetic phenotypic heterogeneity. *Virus Evol.* **10**, 1–10 (2024).
 156. Tu, J. *et al.* Dual host specificity of phage SP6 is facilitated by tailspike rotation. *Virology* **507**, 206–215 (2017).
 157. Bhardwaj, A., Olia, A. S. & Cingolani, G. Architecture of viral genome-delivery molecular machines. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **25**, 1–8 (2014).
 158. Plisson, C. *et al.* Structure of bacteriophage SPP1 tail reveals trigger for DNA ejection. *EMBO J.* **26**, 3720–3728 (2007).
 159. Wang, Z. *et al.* Structure of the Marine Siphovirus TW1: Evolution of Capsid-Stabilizing Proteins and Tail Spikes. *Structure* **26**, 238–248 (2018).
 160. Wang, C. *et al.* Architecture of the bacteriophage lambda tail. *Structure* 1–7 (2023) doi:10.1016/j.str.2023.10.006.
 161. Leiman, P. G. *et al.* Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. *Virol. J.* **7**, 355 (2010).
 162. Leiman, P. G., Chipman, P. R., Kostyuchenko, V. A., Mesyanzhinov, V. V. & Rossmann, M. G. Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. *Cell* **118**, 419–429 (2004).
 163. Hu, B., Margolin, W., Molineux, I. J. & Liu, J. Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E4919–E4928 (2015).
 164. Dunne, M. *et al.* *Salmonella* Phage S16 Tail Fiber Adhesin Features a Rare Polyglycine Rich

- Domain for Host Recognition. *Structure* **26**, 1573-1582.e4 (2018).
165. Dunstan, R. A. *et al.* Mechanistic Insights into the Capsule-Targeting Depolymerase from a *Klebsiella pneumoniae* Bacteriophage. *Microbiol. Spectr.* **9**, (2021).
 166. Greenfield, J. *et al.* Structure and function of bacteriophage CBA120 ORF211 (TSP2), the determinant of phage specificity towards *E. coli* O157:H7. *Sci. Rep.* **10**, 1–14 (2020).
 167. Latka, A., Leiman, P. G., Drulis-Kawa, Z. & Briers, Y. Modeling the Architecture of Depolymerase-Containing Receptor Binding Proteins in *Klebsiella* Phages. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
 168. Müller, J. J. *et al.* An Intersubunit Active Site between Supercoiled Parallel β Helices in the Trimeric Tailspike Endorhamnosidase of *Shigella flexneri* Phage Sf6. *Structure* **16**, 766–775 (2008).
 169. Squeglia, F. *et al.* Structural and Functional Studies of a *Klebsiella* Phage Capsule Depolymerase Tailspike: Mechanistic Insights into Capsular Degradation. *Structure* **28**, 613–624 (2020).
 170. Schulz, E. C. *et al.* Structural Basis for the Recognition and Cleavage of Polysialic Acid by the Bacteriophage K1F Tailspike Protein EndoNF. *J. Mol. Biol.* **397**, 341–351 (2010).
 171. Legrand, P. *et al.* The Atomic Structure of the Phage Tuc2009 Baseplate Tripod Suggests. *Am. Soc. Microbiol.* **7**, 1–11 (2016).
 172. Taylor, N. M. I., Raaij, M. J. van & Leiman, P. G. Contractile injection systems of bacteriophages and related systems. *Mol. Microbiol.* **108**, 6–15 (2018).
 173. Kryshtafovych, A. *et al.* Challenging the state of the art in protein structure prediction: Highlights of experimental target structures for the 10th critical assessment of techniques for protein structure prediction experiment CASP10. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **82**, 26–42 (2014).
 174. Kizziah, J. L., Manning, K. A., Dearborn, A. D. & Dokland, T. Structure of the host cell recognition and penetration machinery of a *Staphylococcus aureus* bacteriophage. *PLoS Pathog.* **16**, (2020).
 175. Koç, C. *et al.* Structure of the host-recognition device of *Staphylococcus aureus* phage Φ 11. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
 176. Garcia-Doval, C. & Van Raaij, M. J. Structure of the receptor-binding carboxy-terminal domain of bacteriophage T7 tail fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 9390–9395 (2012).
 177. Smith, N. L. *et al.* Structure of a group A streptococcal phage-encoded virulence factor reveals a catalytically active triple-stranded β -helix. *PNAS* **102**, 17652–17657 (2005).
 178. Miernikiewicz, P. *et al.* T4 phage tail Adhesin Gp12 counteracts LPS-induced inflammation In Vivo. *Front. Microbiol.* **7**, 1–8 (2016).
 179. Yap, M. L. & Rossmann, M. G. Structure and function of bacteriophage T4. *Future Microbiol.* **9**, 1319–1337 (2014).
 180. Dunne, M. *et al.* Reprogramming Bacteriophage Host Range through Structure-Guided Design of Chimeric Receptor Binding Proteins. *Cell Rep.* **29**, 1336-1350.e4 (2019).
 181. Taylor, N. M. I. *et al.* Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. *Nature* **533**, 346–352 (2016).
 182. Sørensen, A. N., Woudstra, C., Sørensen, M. C. H. & Brøndsted, L. Subtypes of tail spike proteins predicts the host range of Ackermannviridae phages. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **19**, 4854–4867 (2021).
 183. Prokhorov, N. S. *et al.* Function of bacteriophage G7C esterase tailspike in host cell adsorption. *Mol. Microbiol.* **105**, 385–398 (2017).
 184. Zhu, J., Wang, T., Chen, L. & Du, H. Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* **12**, 1–14 (2021).
 185. Liu, Y. *et al.* Identification of Two Depolymerases From Phage IME205 and Their Antiviral Functions on K47 Capsule of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* **11**, 1–11 (2020).
 186. Liu, D., Tang, W., Yin, J.-Y., Nie, S.-P. & Xie, M.-Y. Monosaccharide composition analysis of polysaccharides from natural sources: Hydrolysis condition and detection method development. *Food Hydrocoll.* 127–156 (2021) doi:10.1007/978-3-030-77791-3_6.
 187. Mischnick, P. *et al.* Analysis of the Heterogeneities of First and Second Order of Cellulose Derivatives: A Complex Challenge. *Polysaccharides* **2**, 843–865 (2021).

188. Stummeyer, K. *et al.* Evolution of bacteriophages infecting encapsulated bacteria: Lessons from *Escherichia coli* K1-specific phages. *Mol. Microbiol.* **60**, 1123–1135 (2006).
189. Stummeyer, K., Dickmanns, A., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R. & Ficner, R. Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 90–96 (2005).
190. Scholl, D., Rogers, S., Adhya, S. & Merrill, C. R. Bacteriophage K1-5 Encodes Two Different Tail Fiber Proteins, Allowing It To Infect and Replicate on both K1 and K5 Strains of *Escherichia coli*. *J. Virol.* **75**, 2509–2515 (2001).
191. Kabanova, A. P. *et al.* Host specificity of the *Dickeya* bacteriophage PP35 is directed by a tail spike interaction with bacterial o-antigen, enabling the infection of alternative non-pathogenic bacterial host. *Front. Microbiol.* **10**, 1–11 (2019).
192. Ozaki, T., Abe, N., Kimura, K., Suzuki, A. & Kaneko, J. Genomic analysis of *Bacillus subtilis* lytic bacteriophage ΦnIT1 capable of obstructing natto fermentation carrying genes for the capsule-lytic soluble enzymes poly-γ-glutamate hydrolase and levanase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**, 135–146 (2017).
193. Kunstmann, S. *et al.* Bacteriophage Sf6 tailspike protein for detection of shigella flexneri pathogens. *Viruses* **10**, (2018).
194. Volozhantsev, N. V *et al.* Characterization and Therapeutic Potential of Bacteriophage-Encoded Polysaccharide Depolymerases with β Galactosidase Activity against *Klebsiella pneumoniae* K57 Capsular Type. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **9**, 1–16 (2020).
195. Adriaenssens, E. M. *et al.* A suggested new bacteriophage genus: ‘Viunalikevirus’. *Arch. Virol.* **157**, 2035–2046 (2012).
196. Nixon Anderson, A., Parolis, H., Dutton, G. G. S. & Leek, D. M. *Klebsiella* serotype K39: Structure of an unusual capsular antigen deduced by use of a viral endoglucosidase. *Carbohydr. Res.* **167**, 279–290 (1987).
197. Ravenscroft, N., Parolis, L. A. S. & Parolis, H. Bacteriophage degradation of *Klebsiella* K30 capsular polysaccharide. An NMR investigation of the 3,4-pyruvated galactose-containing repeating oligosaccharide. *Carbohydr. Res.* **254**, 333–340 (1994).
198. Thurow, H., Niemann, H., Rudolph, C. & Stirm, S. Host capsule depolymerase activity of bacteriophage particles active on *Klebsiella* K20 and K24 strains. *Virology* **58**, 306–309 (1974).
199. Annisson, G., Dutton, G. G. & PK, M. Bacteriophage degradation of the capsular polysaccharide of *Klebsiella* K24 and determination of the position of O-acetyl group. *Carbohydr. Res.* **177**, 278–284 (1988).
200. Davies, G. & Henrissat, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853–859 (1995).
201. Sobala, L. F. *et al.* An Epoxide Intermediate in Glycosidase Catalysis. *ACS Cent. Sci.* **6**, 760–770 (2020).
202. Coines, J., Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Planas, A. & Rovira, C. Oxazoline or Oxazolinium Ion? The Protonation State and Conformation of the Reaction Intermediate of Chitinase Enzymes Revisited. *Chem. - A Eur. J.* **24**, 19258–19265 (2018).
203. Knecht, L. E., Veljkovic, M. & Fieseler, L. Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases. *Front. Microbiol.* **10**, 1–16 (2020).
204. Witte, S. *et al.* Structural and functional characterization of the receptor binding proteins of *Escherichia coli* O157 phages EP75 and EP335. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **19**, 3416–3426 (2021).
205. Jongkees, S. A. & Withers, S. G. Unusual enzymatic glycoside cleavage mechanisms. *Acc. Chem. Res.* **47**, 226–235 (2014).
206. Donelli, G., Dore, E., Frontali, C. & Grandolfo, M. E. Structure and physico-chemical properties of bacteriophage G. III. A homogeneous DNA of molecular weight 5×10^8 . *J. Mol. Biol.* **94**, 555–565 (1975).
207. Fokine, A. *et al.* Cryo-EM Study of the *Pseudomonas* Bacteriophage φKZ. *Structure* **15**, 1099–1104 (2007).
208. Lewis, R. *et al.* Isolation of a Novel Jumbo Bacteriophage Effective Against *Klebsiella aerogenes*. *Front. Med.* **7**, (2020).
209. Blundell-Hunter, G. *et al.* Characterisation of Bacteriophage-Encoded Depolymerases Selective for Key *Klebsiella pneumoniae* Capsular Exopolysaccharides. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*

- 11, 1–16 (2021).
210. Martin, C. *et al.* Complete Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Myophage Muenster. *Microbiol Resour Announc* **10**, 1–3 (2021).
211. Mora, D. *et al.* Complete Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Jumbo Phage Miami. *Microbiol. Resour. Announc.* **10**, 1–2 (2021).
212. Wick, R. R., Heinz, E., Holt, K. E. & Wyres, K. L. Kaptive web: User-Friendly capsule and lipopolysaccharide serotype prediction for *Klebsiella* genomes. *J. Clin. Microbiol.* **56**, 1–10 (2018).
213. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular cloning : a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory, 2001).
214. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
215. Lane, D. Antibodies : a laboratory manual. in *Antibodies : a laboratory manual* 92–114 (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).
216. Jensen, E. C. The Basics of Western Blotting. *Anat. Rec.* **295**, 369–371 (2012).
217. Bales, P. M., Renke, E. M., May, S. L., Shen, Y. & Nelson, D. C. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. *PLoS One* **8**, 1–8 (2013).
218. Wu, Y. *et al.* A Novel Polysaccharide Depolymerase Encoded by the Phage SH-KP152226 Confers Specific Activity Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* via Biofilm Degradation. *Front. Microbiol.* **10**, 1–15 (2019).
219. Chen, C. *et al.* Crystal structure of ORF210 from *E. coli* O157:H1 phage CBA120 (TSP1), a putative tailspike protein. *PLoS One* **9**, (2014).
220. Greenfield, J. *et al.* Structure and tailspike glycosidase machinery of ORF212 from *E. coli* O157:H7 phage CBA120 (TSP3). *Sci. Rep.* **9**, 1–11 (2019).
221. Garciadoval, C. *et al.* Structure of the receptor-binding carboxy-terminal domain of the bacteriophage T5 L-shaped tail fibre with and without its intra-molecular chaperone. *Viruses* **7**, 6424–6440 (2015).
222. Kurochkina, L. P. *et al.* Structure, stability, and biological activity of bacteriophage T4 gene product 9 probed with mutagenesis and monoclonal antibodies. *J. Struct. Biol.* **154**, 122–129 (2006).
223. Xiang, Y. *et al.* Crystallographic Insights into the Autocatalytic Assembly Mechanism of a Bacteriophage Tail Spike. *Mol. Cell* **34**, 375–386 (2009).
224. Wilson, J. J., Matsushita, O., Okabe, A. & Sakon, J. A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation. *EMBO J.* **22**, 1743–1752 (2003).
225. Chen, Y. N. P. *et al.* Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature* **535**, 148–152 (2016).
226. Hymowitz, S. G. *et al.* The Crystal Structures of EDA-A1 and EDA-A2: Splice Variants with Distinct Receptor Specificity. *Structure* **11**, 1513–1520 (2003).
227. Buth, S. A., Shneider, M. M., Scholl, D. & Leiman, P. G. Structure and analysis of R1 and R2 pyocin receptor-binding fibers. *Viruses* **10**, (2018).
228. Imscher, T. *et al.* *Pantoea stewartii* WceF is a glycan biofilm-modifying enzyme with a bacteriophage tailspike-like fold. *J. Biol. Chem.* **296**, 1–10 (2021).
229. Lee, I. M. *et al.* Structural basis for fragmenting the exopolysaccharide of *Acinetobacter baumannii* by bacteriophage ΦAB6 tailspike protein. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
230. Salazar, A. J., Sherekar, M., Tsai, J. & Sacchettini, J. C. R pyocin tail fiber structure reveals a receptor-binding domain with a lectin fold. *PLoS One* **14**, 1–22 (2019).
231. Schwarzer, D., Stummeyer, K., Gerardy-Schahn, R. & Mühlenhoff, M. Characterization of a novel intramolecular chaperone domain conserved in endosialidases and other bacteriophage tail spike and fiber proteins. *J. Biol. Chem.* **282**, 2821–2831 (2007).
232. Gage, M. J., Lefebvre, B. G. & Robinson, A. S. Determinants of Protein Folding and Aggregation in P22 Tailspike Protein. in *Misbehaving Proteins: Protein (Mis)Folding, Aggregation, and Stability* (eds. Murphy, R. M. & Tsai, A. M.) 247–264 (Springer US, 2006). doi:10.1007/978-0-387-36063-8_11.
233. Dell, A. *et al.* Absence of O-formyl groups in *Klebsiella* polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **122**,

- 340–343 (1983).
234. Dutton, G. G. S. & Merrifield, E. H. The capsular polysaccharide from *Klebsiella* serotype K54; location of the O-acyl groups, and a revised structure. *Carbohydr. Res.* **105**, 189–203 (1982).
 235. Schulz, E. C. *et al.* Crystal structure of an intramolecular chaperone mediating triple- β -helix folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 210–215 (2010).
 236. Palmer, C. *et al.* Stem Mutants in the N-terminal Domain of the Phage P22 Tailspike Protein. *Am. J. Microbiol. Res.* **2**, 1–7 (2013).
 237. Ferenczy, G. G. & Kellermayer, M. Contribution of hydrophobic interactions to protein mechanical stability. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **20**, 1946–1956 (2022).
 238. Webber, T. *et al.* The C-terminus of the P22 tailspike protein acts as an independent oligomerization domain for monomeric proteins. *Biochem. J.* **419**, 595–602 (2009).
 239. Schwarzer, D. *et al.* Proteolytic release of the intramolecular chaperone domain confers processivity to endosialidase F. *J. Biol. Chem.* **284**, 9465–9474 (2009).
 240. Mühlenhoff, M., Stummeyer, K., Grove, M., Sauerborn, M. & Gerardy-Schahn, R. Proteolytic processing and oligomerization of bacteriophage-derived endosialidases. *J. Biol. Chem.* **278**, 12634–12644 (2003).
 241. Vinga, I. *et al.* Role of bacteriophage SPP1 tail spike protein gp21 on host cell receptor binding and trigger of phage DNA ejection. *Mol. Microbiol.* **83**, 289–303 (2012).
 242. Freiberg, A. *et al.* The tailspike protein of Shigella phage Sf6: A structural homolog of *Salmonella* phage P22 tailspike protein without sequence similarity in the β -helix domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 1542–1548 (2003).
 243. Restani, P., Beretta, B., Fiocchi, A., Ballabio, C. & Galli, C. L. Cross-reactivity between mammalian proteins. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **89**, 11–15 (2002).
 244. Doron, S. *et al.* Transcriptome dynamics of a broad host-range cyanophage and its hosts. *ISME J.* **10**, 1437–1455 (2016).
 245. Mc Grath, S. *et al.* Anatomy of a lactococcal phage tail. *J. Bacteriol.* **188**, 3972–3982 (2006).
 246. Sycheva, L. V. *et al.* Crystal Structure of the putative tail fiber protein gp53 from the *Acinetobacter baumannii* bacteriophage AP22. *bioRxiv* **518761**, (2019).
 247. Habann, M. *et al.* Listeria phage A511, a model for the contractile tail machineries of SPO1-related bacteriophages. *Mol. Microbiol.* **92**, 84–99 (2014).
 248. Hsu, C. R., Lin, T. L., Pan, Y. J., Hsieh, P. F. & Wang, J. T. Isolation of a Bacteriophage Specific for a New Capsular Type of *Klebsiella pneumoniae* and Characterization of Its Polysaccharide Depolymerase. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).
 249. Liu, Y. *et al.* Identification and characterization of capsule depolymerase Dpo48 from *Acinetobacter baumannii* phage IME200. *PeerJ* **2019**, 1–23 (2019).
 250. Abdelsattar, A. *et al.* How to Train Your Phage: The Recent Efforts in Phage Training. *Biologics* **1**, 70–88 (2021).
 251. de Leeuw, M., Baron, M., David, O. Ben & Kushmaro, A. Molecular insights into bacteriophage evolution toward its host. *Viruses* **12**, 1–15 (2020).
 252. Sutherland, I. W., Jann, K. & Jann, B. The Isolation of O-Acetylated Fragments from the K Antigen of *Escherichia coli* 08:K27(A):H by the Action of Phage-Induced Enzymes from *Klebsiella aerogenes*. *Eur. J. Biochem.* **12**, 285–288 (1970).
 253. Echlin, H. *et al.* Pyruvate Oxidase as a Critical Link between Metabolism and Capsule Biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* **12**, 1–28 (2016).
 254. Hsu, C., Liao, C., Lin, T., Yang, H. & Yang, F. Identification of a capsular variant and characterization of capsular acetylation in *Klebsiella pneumoniae* PLA-associated type. *Nat. Publ. Gr.* 1–13 (2016) doi:10.1038/srep31946.
 255. Atkins, E. D. T. *et al.* Effect of acetylation on the molecular interactions and gelling properties of a bacterial polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.* **9**, 115–117 (1987).
 256. Guetta, O., Milas, M. & Rinaudo, M. Structure and properties of a bacterial polysaccharide from a *Klebsiella* strain (ATCC 12657). *Biomacromolecules* **4**, 1372–1379 (2003).
 257. Qiu, L., Morato, N. M., Huang, K. & Cooks, R. G. Spontaneous Water Radical Cation Oxidation at Double Bonds in Microdroplets. **10**, 1–12 (2022).
 258. O'Neill, M. A., Morris, V. J. & Selvendran, R. R. Structure of the extracellular gelling polysaccharide produced by *Enterobacter* (NCIB 11870) species. *Carbohydr. Res.* **148**, 63–69

- (1986).
259. De Ruiter, G. A., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. & Rombouts, F. M. Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. *Anal. Biochem.* **207**, 176–185 (1992).
 260. Emaga, T. H., Rabetafika, N., Blecker, C. S. & Paquot, M. Kinetics of the hydrolysis of polysaccharide galacturonic acid and neutral sugars chains from flaxseed mucilage. *BASE* **16**, 139–147 (2012).
 261. Harvey, D. J. Electrospray mass spectrometry and fragmentation of N-linked carbohydrates derivatized at the reducing terminus. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, 900–915 (2000).
 262. Sutherland, I. W. & Wilkinson, J. Depolymerases for bacterial exopolysaccharides obtained from phage-infected bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **39**, 373–383 (1965).
 263. Sutherland, I. W. Phage-induced fucosidases hydrolysing the exopolysaccharide of *Klebsiella aerogenes* type 54 [A3(S1)]. *Biochem. J.* **104**, 278–285 (1967).
 264. Sutherland, I. W. & Wilkinson, J. The Exopolysaccharide of *Klebsiella aerogenes* A3 (SI) (Type 54). *Biochem. J.* **4**, 749–754 (1968).
 265. Majkowska-Skrobek, G. *et al.* Capsule-targeting depolymerase, derived from *Klebsiella* KP36 phage, as a tool for the development of anti-virulent strategy. *Viruses* **8**, 1–7 (2016).
 266. Kim, W. S. & Geider, K. Characterization of a viral EPS-depolymerase, a potential tool for control of fire blight. *Am. Phytopathol. Soc.* **90**, 1263–1268 (2000).
 267. Dutton, G. G. & Merrifield, E. H. The capsular polysaccharide from *Klebsiella* serotype K54; location of the O-acyl groups, and a revised structure. *Carbohydr. Res.* **105**, 189–203 (1982).

PRIEDAI

Priedas Nr. 1. RaK2 baltymų, gp098, gp526–534, domenų „Dali“ ir „Hhpred“ analizių rezultatai.

gp098 (595 aa)			
N-galas	Centrinė sritis	C-galas	
	136–352	372–483	CTD (493–595)
Dali didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampančioje struktūroje, Z-reikšmė, RMSD Å/ sulygiavimas Cα	E. coli fago T4 LTF gp37 (2XGF, 216 aa) 1–216 Z=4, 4, RMSD=3, 6/107 -----	E. coli fago T4 LTF gp34 (4UXE, 396 aa) 39–165 Z=7, 3, RMSD=2, 4/103	P. aeruginosa R2 piocino uodegos ataugėlė PAO620 (6CT8; 273 aa) 151–249 Z=12, 1, RMSD=2, 4/96
Hhpred didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampančioje struktūroje, tikimybė %, e-vertė	-----	E. coli fago P2 gpV (3QR8; 211 aa) 100–184 91, 74%, 3, 7	P. aeruginosa R2 piocino uodegos ataugėlė PAO620 (6CL6; 372 aa) 285–372 94, 32%, 0, 89

gp526 (580 aa)				
Galvos sritis	Kūno sritis		C-galas	
NTD (9–91)	BD1 (113–189)	BD2 (190–263)	BD3 (274–432)	CTD (449–580)
Dali didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampančioje struktūroje, Z-reikšmė, RMSD Å/ sulygiavimas Ca	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP1 (4OJ6; 753 aa) 1–83 (D1) Z=12, RMSD=1,9/80	<i>Bacillus subtilis</i> K'/H' antiporterio subvienetas KhtT (7AGV; 163 aa) 1–55 Z=4,7, RMSD=2,6/54 <i>E. coli</i> fago T4 gp34 (5NXH; 546 aa) 402–496 Z=3,1, RMSD=2,9/54	<i>Pantoea stewartii</i> glikozidazės WceF (6TGF; 673 aa) 456–621 Z=10,6, RMSD=3,6/129	<i>Acinetobacter baumannii</i> fago phiAB6 TSP gp40 (5JSE; 548) 438–547 Z=6,7, RMSD=2,7/81
Hhpred didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampančioje struktūroje, tikimybė %, e-vertė	<i>E. coli</i> fago G7C TFP gp63.1 (4QNL; 859) 1–75 (D1) 80,49%, 4,9			<i>E. coli</i> fago SU10 tariama uodegos ataugėlė gp12 (7Z4A, 786 aa) 652–784 99,87%, 2.4e-21

gp527 (715 aa)				
	Galvos sritis		Kūno sritis	C-galas
	NTD (11–86)	NTD2 (103–169)		CTD (520–715)
Dali didž. įvertis ** (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampančioje struktūroje, Z-reikšmė, RMSD Å/ sulygiavimas Cα	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP1 (4OJ6; 753 aa) 1–79 (D1) Z=11,7, RMSD=1,2 /73	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP2 (5W6P; 676 aa) 19–90 (D3) Z=9,2, RMSD=1,8/66	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (5W6H; 697 aa) 233–551 (D3) Z=25,4, RMSD=2,5/290	<i>Rhodothermus marinus</i> ksilanazė (2Y6H; 167 aa) 1–167 (CBM4-2) Z=14,2, RMSD=2,6/148 <i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (5W6H; 697 aa) 541–697 (D4) Z=12,1, RMSD=3,1/149
HHpred didž. įvertis ** (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampančioje struktūroje, tikimybė %, e-vertė	<i>E. coli</i> fago vB_EcoP_G7C gp63.1 (4QNL; 859 aa) 1–83 (D1) 76,84%, 14	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP2 (5W6S; 680 aa) 23–100 (D3) 99,17%, 7e-10	<i>Acinetobacter</i> fago AP22 gp54 (4Y9V; 625 aa) 56–432 (ED) 99,83%, 3.3e-17	<i>Paenibacillus barcinonensis</i> endo-1,4-β-ksilanazė C (4XUP; 334 aa) 203–333 98,07%, 5,0e-4 <i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (5W6H; 697 aa) 590–694 (D4) 94,38%, 1,6

gp528 (1113 aa)	Galvos sritis					Kūno sritis			C-galas	
	NTD (1–105)	NTD2 (109–174)	NTD3 (180–244)	NTD4 (247–306)	NTD5 (317–384)	BD1 (426–481)	BD2 (485–552)	CD (650–970)	CTD (1006–1113)	
Dali didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampancioje struktūroje, Z-reikšmė, RMSD Å/ sulygiavimas Ca	<i>E. coli</i> fago T4 gp34 (5NXH; 546 aa) 360–496 (P5) Z=7,5, RMSD=2,3/100	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFV; 241 aa) 178–241 (XD2) Z=10,5, RMSD=1,3/64	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFV; 241 aa) 178–241 (XD2) Z=10,7, RMSD=1,2/64	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFO; 330 aa) 188–247 (XD2) Z=9,0, RMSD=1,4/60	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFO; 330 aa) 260–330 (XD3) Z=8,4, RMSD=1,8/64	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (5W6H; 697 aa) 5–85 (D1) Z=5,2, RMSD=2,4/57	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFV; 241 aa) 178–241 (XD2) Z=10,1, RMSD=1,3/64	<i>E. coli</i> fago phi29 TSP gp12 (3GQ8; 604 aa) 32–446 Z=22,2, RMSD=3,2/300	<i>Clostridium histolyticum</i> I klasės kolagenazė (1NQD; 114 aa) 1–111 Z=6,4, RMSD=2,9/91 <i>E. coli</i> fago phiX174 kapsidės baltymas (2BPA; 426 aa) 13–157 Z=5,2, RMSD=3,4/103	
		<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFV; 250 aa) 199–249 (XD2) 97,79%, 1,2e-4	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFV; 250 aa) 199–248 (XD2) 97,54%, 4,5e-4	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFV; 250 aa) 191–248 (XD2) 97,26%, 1,3e-3	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFV; 250 aa) 191–248 (XD2) 97,32%, 1,1e-3		<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFV; 250 aa) 193–248 (XD2) 97,11%, 2e-3	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (5W6H; 697 aa) 198–520 (D3) 91,6%, 16		
Hhpred didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampancioje struktūroje, tikimybė %, e-vertė	<i>E. coli</i> fago T4 gp10 (5HX2; 602 aa) 157–236 (XD2) 84,55%, 4,9	<i>E. coli</i> fago T4 gp10 (5HX2; 602 aa) 303–385 (XD3) 82,11%, 5,5	<i>E. coli</i> fago T4 gp10 (5HX2; 602 aa) 303–382 (XD3) 75,19%, 12	<i>E. coli</i> fago T4 gp10 (5HX2; 602 aa) 303–385 (XD3) 70,89%, 19			<i>E. coli</i> fago T4 gp10 (5HX2; 602 aa) 303–392 (XD3) 64,55%, 28			

gp529 (584 aa)			
	Galvos sritis NTD (1–92)	Kūno sritis CD (126–440)	C-galas CTD (455–584)
Dali didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampančioje struktūroje, Z-reikšmė, RMSD A/ sulygiavimas Cα	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP1 (4OJ6; 676 aa) 1–79 (D1) Z=11,3, RMSD=1,6/77	<i>Azotobacter vinelandii</i> alginato C5 epimerazė 6 AlgE6 (5LW3; 381 aa) 13–373 Z=28,1, RMSD=2,7/289 <i>E. coli</i> fago CBA120 TSP2 (5W6S; 676 aa) 99–652 (D3) Z=26,9, RMSD=2,7/288	<i>E. coli</i> fago T4 gp9 (1QEX; 288 aa) 171–281 (CTD) Z=9,2, RMSD=2,9/102
Hhpred didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampančioje struktūroje, tikimybė %, e-vertė	-----	<i>Azotobacter vinelandii</i> alginato C5 epimerazė 6 AlgE6 (5LW3; 381) 16–293 99,9%, 8,7e-20 <i>E. coli</i> fago CBA120 TSP3 (6NW9; 633 aa) 215–581 (D3) 99,89%, 1,6e-19	-----

gp530 (779 aa)			
	Galvos sritis	Kūno sritis	C-galas
	NTD (1–88)	CD (151–508)	CTD (512–619) CTD2 (665–779)
Dali didž. įvertis ** (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampančioje struktūroje, Z-reikšmė, RMSD Å/ sulygiavimas Ca	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (5E6C; 697 aa) 1–81 (D1) Z=10,6, RMSD=1,775	<i>Shigella Flexneri</i> fago SF6 endorhamnosidazė (2VBM; 509 aa) 68–393 Z=29,7, RMSD=2,8/285	<i>E. coli</i> fago T5 L-formos TFP pb1 (4UW8; 427 aa) 183–427 Z=14,5, RMSD=2,6/192
HHpred didž. įvertis ** (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampančioje struktūroje, tikimybė %, e-vertė	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (5W6H; 697 aa) 3–83 (D1) 94,71%, E=0,13	<i>Fusarium</i> moniliforme endopoli- galakturonazė (1HG8; 349 aa) 5–336 99,9%, 9,3e-21 <i>Acinetobacter</i> fago AP22 TSP gp54 (4Y9V; 625 aa) 56–434 99,88%, 3.1e-19	<i>E. coli</i> fago T5 L-formos TFP pb1 (4UW8; 427 aa) 269–427 98,92%, 5,9e-7

gp531 (895 aa)	Galvos sritis		Kūno sritis		C-galas	
	NTD (29-91)	NTD2 (101-153)	NTD3 (165-229)	NTD4 (238-300)	CTD1 (751-845)	CTD2 (848-895)
Dali didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampantiųje struktūroje, Z-reikšmė, RMSD Å/ sulygiavimas Ca	E. coli fago CBA120 TSP1 (4OJP; 756 aa) 95-155 (D2) Z=6,9, RMSD=3,3/57	E. coli fago CBA120 TSP4 (5W6H; 697 aa) 5-66 (D1) Z=4,9, RMSD=2,0/51	E. coli fago CBA120 TSP4 (7RFV; 241 aa) 178-241 (XD2) Z=10,0, RMSD=1,3/64	E. coli fago CBA120 TSP4 (7RFV; 241 aa) 178-238 (XD2) Z=9,4, RMSD=1,3/61	Acinetobacter baumannii proteazė CpaA (6O38; 573) 1-94 Z=10,3, RMSD=2,3/87	E. coli fago CBA120 TSP3 (6NW9; 616 aa) 570-616 (D4) Z=8,7, RMSD=1,3/47
	E. coli fago G7C TFP gp63.1 (4QNL; 859) 90-166 (D2) 96,2%, 2,6e-2	-----	E. coli fago T4 gp10 (5HX2; 602 aa) 303-392 (XD3) 79,13%, 12	Arthrobacter chlorophenolicus difruktozės anhidrido hidrolazė A6 DFA-IIIazė (5ZL5; 445) 19-378 99,78%, 3,8e-15	E. coli metaloпротеазė StcE (4DNY; 126) 67-123 73,99%, 5,8	E. coli fago CBA120 TSP3 (6NW9; 633 aa) 584-627 (D4) 98,94%, 1,9e-9

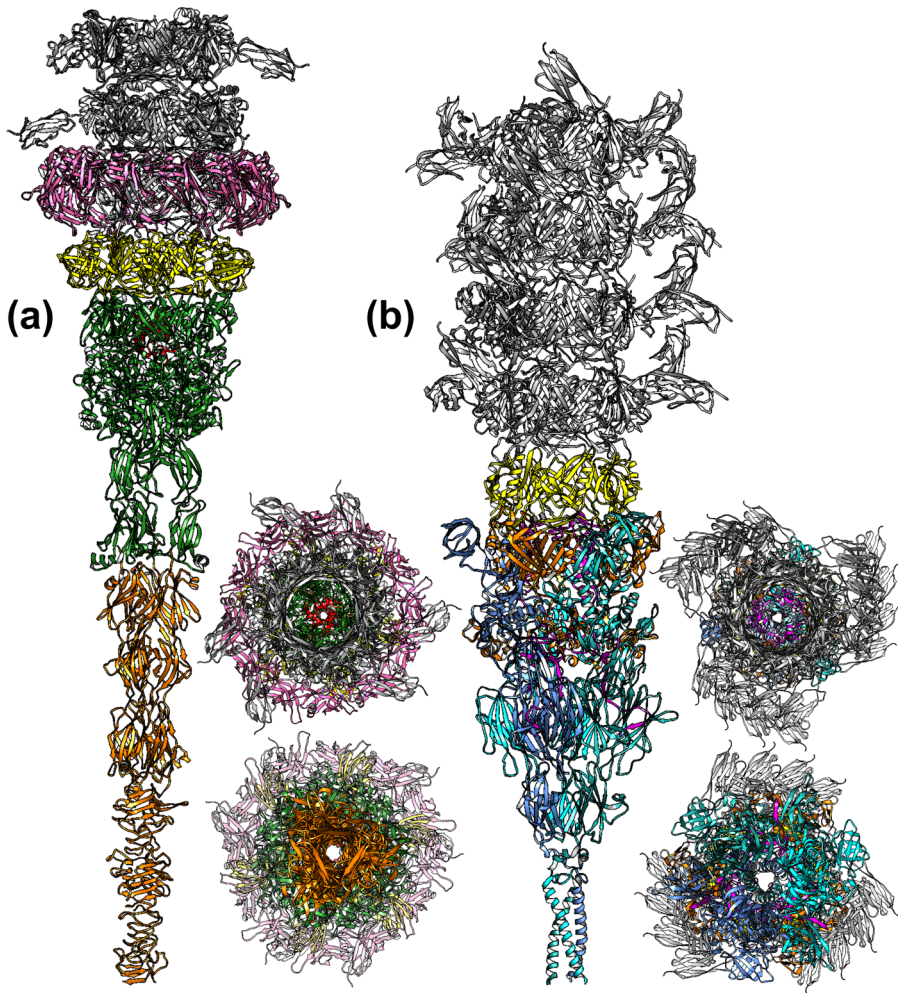
gp532 (806 aa)		Galvos sritis		Kūno sritis		C-galas	
		NTD (1–88)	NTD2 (97–154)	NTD3 (158–222)	CD (281–627)	CTD (656–755)	CTD2 (759–806)
Dali didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampancioje struktūroje, Z-reikšmė, RMSD Å/ sulygiavimas Cα		<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP1 (4OJ6; 758 aa) 70–168 (D2) Z=8,6, RMSD=3,6/79	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (5W6H; 697 aa) 6–74 (D1) Z=4,9, RMSD=2,4/52	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFV; 250 aa) 178–247 (XD2) Z=10,1, RMSD=1,3/64	<i>A. vinelandii</i> alginato C5 epimerazė 6 AlgE6 (5LW3; 381) 16–370 Z=29,6, RMSD=2,9/313	<i>Acinetobacter</i> išskiriama proteazė <i>CpaA</i> (6O38; 514) 46–132 Z=5,7, RMSD=3,4/86	Tirozino fosfatazė SHP2 (5EHR; 485) 107–148 Z=3,0, RMSD=2,3/39
		<i>E. coli</i> fago G7C TFP gp63.1 (4QNL; 859) 93–166 (D2) 95,33%, 0,17			<i>E. coli</i> fago phi29 TSP gp12 (3SUC; 767) 32–431 Z=28,6, RMSD=2,8/308	<i>E. coli</i> fago T4 gp9 (1QEX; 288 aa) 74–167 (D2) Z=4,0, RMSD=3,9/73	
Hhpred didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampancioje struktūroje, tikimybė %, e-vertė		<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFV; 250 aa) 191–248 (XD2) 97,15%, 2e-03		<i>E. coli</i> fago T4 gp10 (5HX2; 602 aa) 303–401 (xd3) 84,26%, 6,8	<i>Talaromyces</i> <i>leycectianus</i> endopoli- galakturonazė (6KVH; 344 aa) 15–328 99,66%, 3,1e-13		
					<i>E. coli</i> fago HK620 TSP gp9 (4XOT; 597) 60–412 99,55%, 9,23e-12		

gp533 (767 aa)	C-galas				
	Galvos sritis	Kūno sritis		CTD	
	NTD (14–91)	NTD2 (95–149)	NTD3 (155–224)	CD (284–610)	CTD2 (690–713) CTD3 (725–763)
Dali didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampnčioje struktūroje, Z-reikšmė, RMSD Å/ sulygiavimas Ca	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP3 (5W6F; 616 aa) 94–167 (D2) Z=9,1, RMSD=3,3/68	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (5W6H; 697 aa) 340–413 (D1) Z=4,9, RMSD=2,9/56	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFV; 241 aa) 178–241 (XD2) Z=9,9, RMSD=1,1/64	<i>A. vinelandii</i> alginatė C5 epimerazė 6 AlgE6 (5LW3; 381 aa) 18–376 Z=31,5, RMSD=2,4/294	<i>Salmonella</i> fago P22 TSP gp9 (2XC1; 661 aa) 544–617 Z=5,2, RMSD=2,4/57
				<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP2 (5W6S; 676 aa) 104–438 (D3) Z=31,1, RMSD=2,3/294	<i>E. coli</i> fago phi92 kolanidazė TSP gp150 (6E0W; 626) 470–506 Z=2,8, RMSD=2,4/37
Hhpred didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampnčioje struktūroje, tikimybė %, e-vertė	<i>E. coli</i> fago G7C TFP gp63.1 (4QNL; 859) 102–166 (D2) 98,76%, 2.2e-8	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (5E6C; 697 aa) 1–81 (D1) Z=10,6, RMSD=1,7/75	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP4 (7RFV; 250 aa) 178–248 (XD2) 96,97%, 3.5e-3 <i>E. coli</i> fago T4 gp10 (5HX2; 602 aa) 303–385 (XD3) 84,94%, 4,0	<i>Klebsiella</i> fago KP32 depolimerazė gp38 (6TKU; 584) 36–304 99,76%, 6,8e-16,	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP2 (6W4Q; 972 aa) 641–707 (D3 - D4) 98,34%, 5.5e-7 <i>E. coli</i> fago CBA120 TSP2 (6W4Q; 972 aa) 703–747 (D4) 98,2%, 1e-6 <i>E. coli</i> fago CBA120 TSP2 (6W4Q; 972 aa) 745–790 (D4) 98,32%, 4.5e-7

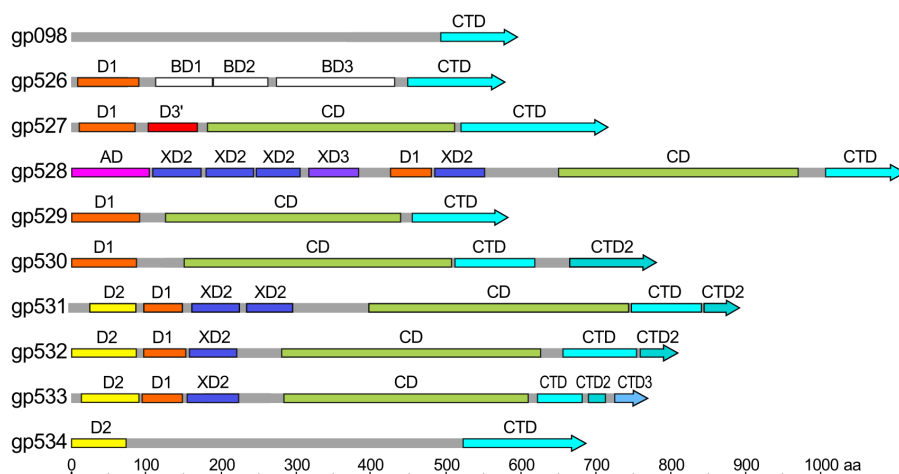
gp534 (688 aa)	N-galas	Centrinė sritis	C-galas
	NTD (1–74)	115–188	CTD (523–688)
Dali didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampančioje struktūroje, Z-reikšmė, RMSD Å/ sulygiavimas Cα	<i>E. coli</i> fago CBA120 TSP3 (5W6F; 616 aa) 73–150 (D2) Z=6,8, RMSD=2,8/68	<i>E. coli</i> fago Mu TFP gp49 (5YVQ; 358 aa) 55–137 Z=3,7, RMSD=1,9/66	<i>P. aeruginosa</i> R2 plocino membraną praduriantis smaigalys (4S37; 172 aa) 90–142 Z=6,0, RMSD=2,0/52
	<i>E. coli</i> fago G7C TFP gp63.1 (4QNL; 859) 102–153 (D2) 54,54%, 27		<i>E. coli</i> fago Mu TFP gp49 (5YVQ; 358 aa) 247–320 Z=2,5, RMSD=2,6/50
Hhpred didž. įvertis* (PDB ID, a.l. sk.) sulygiuota sritis (domenas) sutampančioje struktūroje, tikimybė %, e-vertė			<i>E. coli</i> fago T4 trumpoji uodegos ataugėlė gp12 (5LYE; 322) 255–318 63,83%, 5,7
*/*** – pateikiamas ir sutampantis struktūrinis variantas, esantis faguose, nors geriausias yra bakterinės kilmės. Spalvose nurodo: mėlyna – N-galo arba galvos sritis, žalia – centrinė arba kūno sritis, raudona – išskirta C-galo sritis.			

*/** – pateikiamas ir sutampančias struktūrinis variantas, esantis faguose, nors geriausias yra bakterinės kilmės. Spalvose nurodo: mėlyna – N-galo arba galvos sritis, žalia – centrinė arba kūno sritis, raudona – išskirta C-galo sritis.

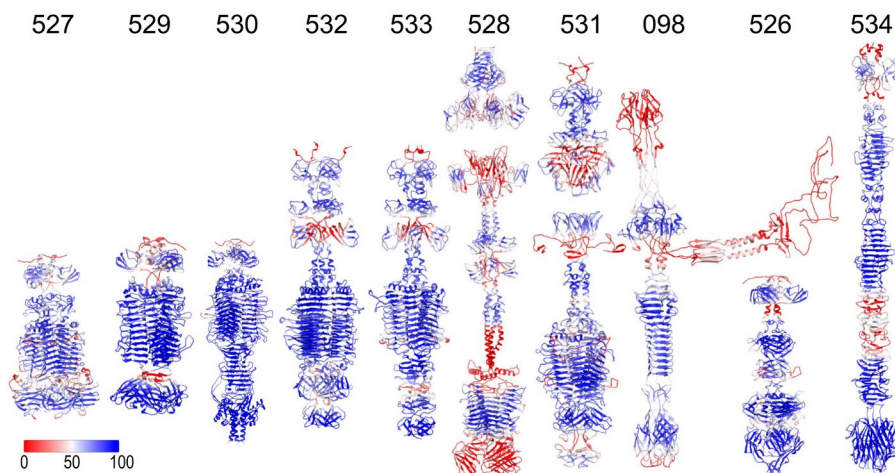
Paveikslai



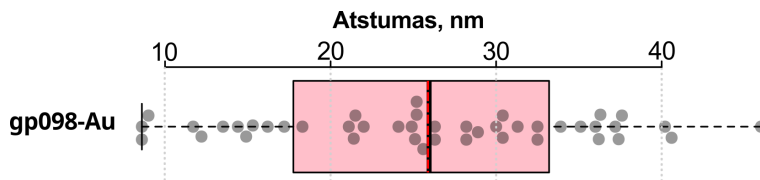
1P pav. T5 (**a**, 7ZQB) ir lambda (**b**, 8IYK) bakteriofagų uodegos dalis su pradūrimo įtaiso sandara. Spalvos žymi: **pilka** – uodegos vamzdelio baltymą; **rožinė** – L-formos uodegos ataugėlės b. (**a**) ir galiuko surišimo b. (**b**); **geltona** – distalinius uodegos b.; **žalia** – „įvorės“ b.; **raudona** – uodegos ilgio matavimo b. galinę dalį; **oranžinė** – centrinės tiesiosios ataugėlės b. (**a**) ir galiuko b. (**b**); **mėlynos** sp. atspalviai – trimerinį galiuko b. Nėra pateikto receptorių atpažįstančio baltymo, pb5. Galiniuose vaizduose spalvų ryškumo silpnėjimas žymi nutolimą.



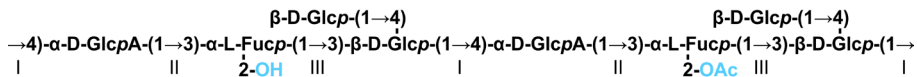
2P pav. Apibendrintas numatytų struktūrinių domenų išsidėstymas RaK2 tirtuose baltymuose. Atitinkamos spalvos žymi šiuos domenų arba sritis: **rožinė** – „inkaro“ (AD), atsakingas už ataugėlės prijungimą prie bazinės plokštelės; **mėlyna** ir **violetinė** – XD2 ir XD3, homologinius CBA120 TSP2,4 arba T4 gp10 D2 ir D3; **oranžinė**, **geltona** ir **raudona** – homologiniai CBA120 fago savitiems N galo D1, D2 ir D3'; **žalsva** – CD, depolimerazių katalitiniai, sudaryti iš β -spiralių; **žydra** ir **melsva** – C galo, CTD; **balta** – homologinės sr. BD1–3, būdingos kitiems bakteriofagų kilmės baltymams. Žemiau pateiktas mastelis nurodo baltymų aminorūgščių sekų ir atitinkamai domenų dydį.



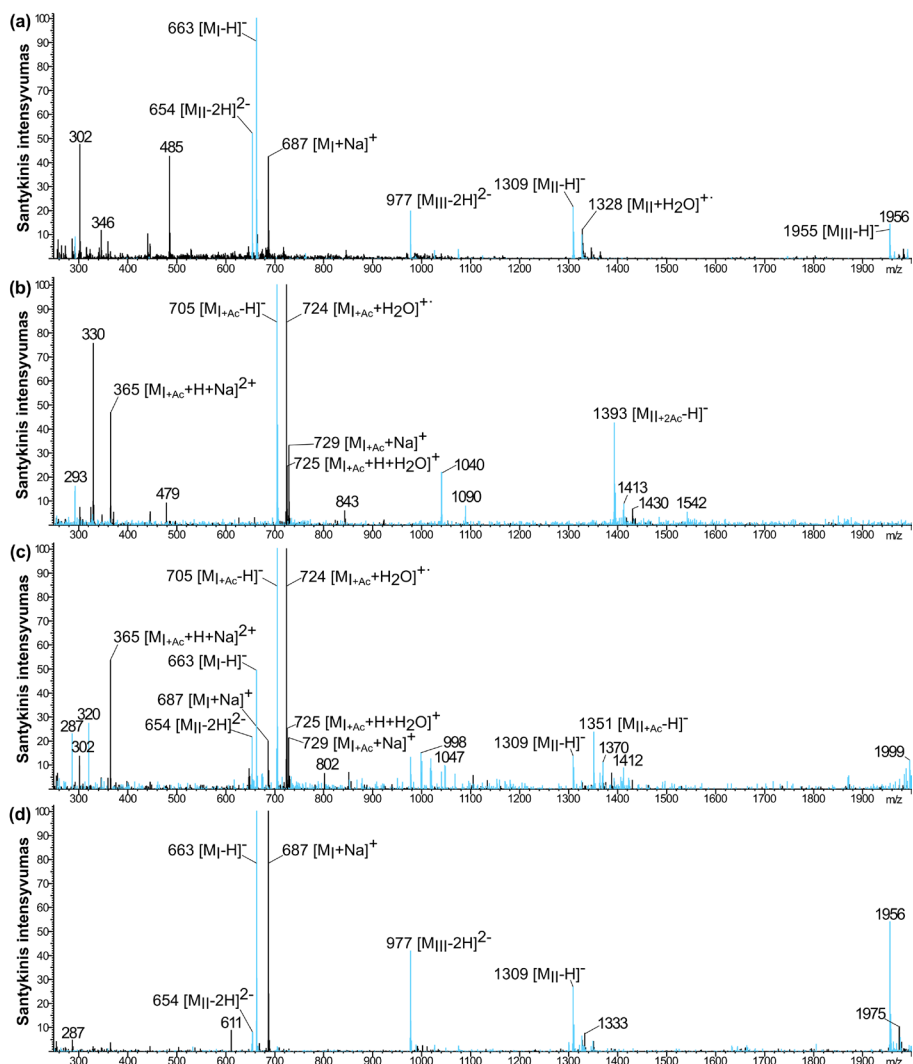
3P pav. RaK2 baltymų trimerinių struktūrų modelių patikimumo sritys pagal pLDDT skalę (0–100). Polipeptidai pateikti „kaspininio“ vaizdavimu.



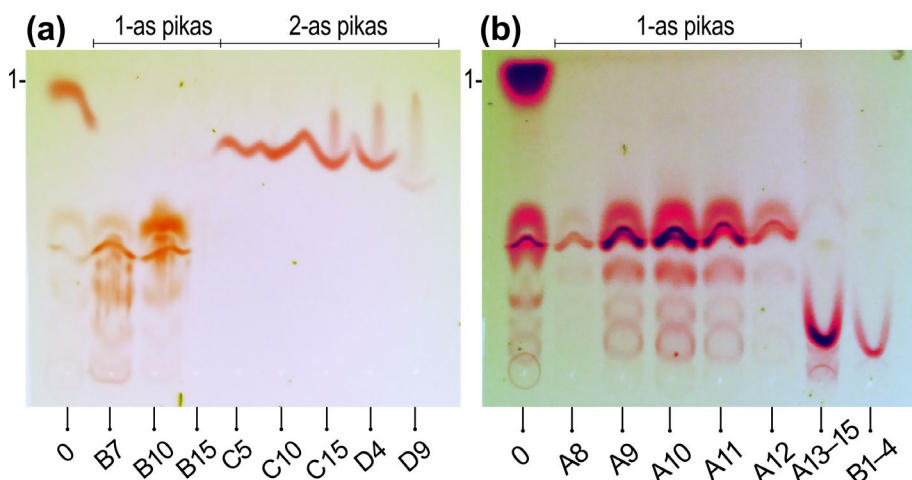
5P pav. Gp098 imuno-žymėjimo auksu RaK2 virionuose atstumo duomenys, rodantys platų jų pasiskirstymą ir didelį SD ($\pm 9,6$ nm) nuo matavimų vidurkio (25,8 nm).



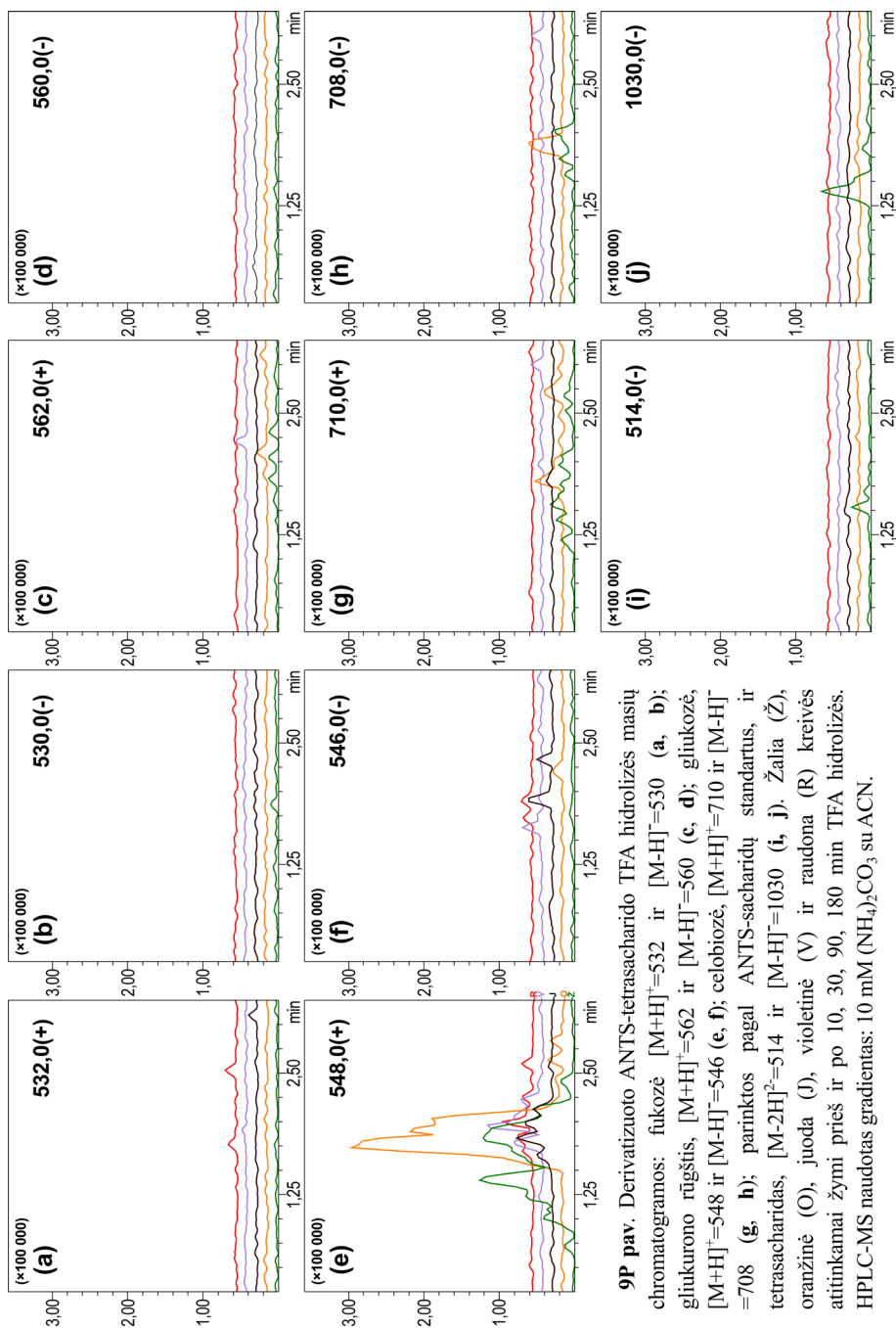
6P pav. *Klebsiella pneumoniae* K54 serotipo polisacharido struktūra pavaizduota kaip dvigubas pasikartojantis vienetas^{233,234}. Romėniški skaitmenys žymi skirtingus glikozidinius ryšius, o žydra spalva – acetilinimo vietą.



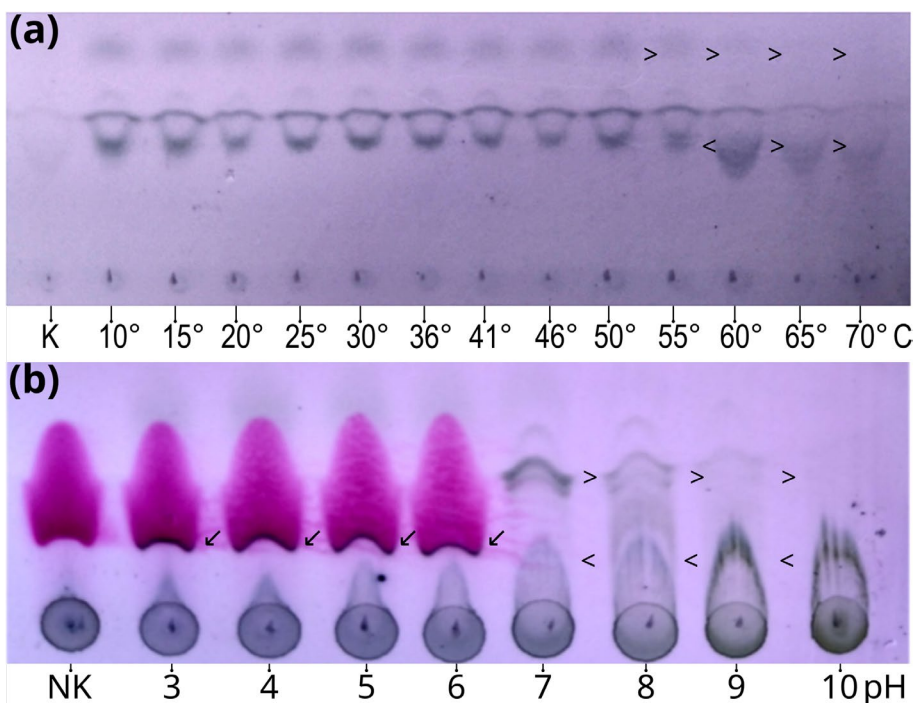
7P pav. HPLC-MS analizių masės spektrai, gp531 katalizuojamos hidrolizės produktų, kai substratas buvo: išskirtas polisacharidas **(a)** arba KV-3 bakterijų biomasė, 37°C auginta: 190 min⁻¹, 2 val. **(b)**, 0 min⁻¹, 2 **(c)** ir 0 min⁻¹, 11 **(d)** parų. Neigiami ir teigiami pikai pažymėti atitinkamai mėlyna ir juoda spalvomis.



8P pav. ANTS-tetrasacharido gryninimo frakcijų TLC analizės, po: DEAE (a) ir nudruskinimo SG10 (b) kolonėlių. Apačioje raidės su skaičiais žymi 1 ir 2 gryninimo pikų frakcijas, matuojant 365 nm šviesos bangos sugertį; 0 – mėginys prieš gryninimą; 1 – nesureagavęs ANTS. TLC judrioji fazė: 1-proOH: EtOAc: dH₂O (6:1:3), leidimo trukmė: 25 min (a) ir 2×20 min (b).



9P pav. Derivatizuoto ANTS-tetrasacharido TFA hidrolizės masių chromatogramos: fukozė $[M+H]^+=532$ ir $[M-H]^-=530$ (a, b); gliukurono rūgštis, $[M+H]^+=562$ ir $[M-H]^-=560$ (c, d); gliukozė, $[M+H]^+=548$ ir $[M-H]^-=546$ (e, f); celobiozė, $[M+H]^+=710$ ir $[M-H]^-=708$ (g, h); parinktos pagal ANTS-sacharidų standartus, ir tetrasacharidas, $[M-2H]^-2=514$ ir $[M-H]^-=1030$ (i, j). Žalia (Ž), oranžinė (O), juoda (J), violetinė (V) ir raudona (R) kreivės atitinkamai žymi prieš ir po 10, 30, 90, 180 min TFA hidrolizės. HPLC-MS naudotas gradientas: 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ su ACN.



10P pav. Rekombinantinio gp531 aktyvumo skirtingose temperatūrose (a) ir pH (b) sąlygose TLC kokybinė analizė. Kontrolė ir neigiama kontrolė atitinka mėginius: su išveiklintu gp531, kai kitose reakcijose temperatūra pasiekė nustatytą reikšmę (K); citratinis buferinis tirpalas (pH 3) be gp531 (NK). Simboliai, √, > ir <, atitinkamai žymi junginių kaupimąsi bei jų didėjimo ir mažėjimo tendencijas tarp skirtingų mėginių. Judrioji TLC fazė: 1-proOH:EtOAc:dH₂O (6:1:3); TLC vykdyta 20 min.

Lentelės

1P lentelė. Bakteriofagų uodegaspyglių prijungimo domenai ir funkcijos.

Fagas	TSP	Domen.	PDB	II-ė baltymo	Sritis			Prijungimo
			Nr.	struktūra	a ₁	a _n	Δa	funkcija
T4	gp10	D1	5HX2	α,β7	1	155	154	save su BP
T4	gp10	D2	5HX2	α,β2	156	251	95	gp12
T4	gp10	D3	5HX2	β3,α,β	252	395	143	gp11
T4	gp10	D4	5HX2	α,β2,α,β2,α2,β	396	602	206	save su BP
T4	gp9	ND	1S2E	α3	1	60	59	save su BP
T4	gp9	MD	1S2E	β7	61	167	106	
T4	gp9	CD	1S2E	β8	168	288	120	LTF per gp34
CBA120	TSP1	D1	4OJ6	α,β6,α	13	96	83	save su TSP4
CBA120	TSP1	D2	4OJ6	β5,α, β	97	154	57	
CBA120	TSP3	D1	6NW9	α,β6,α	13	96	83	save su TSP2
CBA120	TSP3	D2	6NW9	β6	97	154	57	
CBA120	TSP2	D1	6W4Q	α,β6	167	247	80	
CBA120	TSP2	XD2	6W4Q	β8	1	86	85	save su TSP4
CBA120	TSP2	XD3	6W4Q	β4,α,β	89	160	71	TSP3
CBA120	TSP2	D3'	5W6S	α,β4,α	269	340	71	
CBA120	TSP4	AD	7RFV		7	42	35	save su BP
CBA120	TSP4	D1	5W6H	α,β6	356	412	56	
CBA120	TSP4	D2	5W6H	α,β4,α,β4	413	480	67	
CBA120	TSP4	XD1	7RFV	β9	80	178	98	
CBA120	TSP4	XD2	7RFV	β4,α,β4	189	253	64	TSP2
CBA120	TSP4	XD3	7REJ	β,α,β7	265	335	70	TSP1
CBA120	TSP4	D3'	5W6H	α,β4,α	503	570	67	
G7C	gp66	AD?	n/a		1	139	138	?
G7C	gp66	D2+D3	n/a		138	294	156	gp63.1
G7C	gp63.1	D1	4QNL	α,β6	1	88	87	save su gp66?
G7C	gp63.1	D2	4QNL	α,β6	89	160	71	
G7C	gp63.1	D3'	4QNL	β,α,β2,α,β3,α	170	250	80	

TSP – uodegaspyglis; a₁, a_n ir Δa – atitinkamai yra pirmoji, paskutinioji aminorūgštis ir jų skirtumas; BP – fago bazinė plokštelė; ? – nėra žinoma, arba spėjama.

2P lentelė. *Klebsiella* K-serotipai ir jų *cps* sąrašas.

K-tipas	NCBI Nr.	<i>Klebsiella</i> sp.			
K01	AB924547	<i>K. pneumoniae</i>	K40	AB924577	<i>K. pneumoniae</i>
K02	AB371296	<i>K. pneumoniae</i>	K41	AB924578	<i>K. michiganensis</i>
K03	FQ311478	porūšis: rhinoscleromatis	K42	AB924579	<i>K. pneumoniae</i>
K04	AB924548	porūšis: ozaenae	K43	AB924580	<i>K. pneumoniae</i>
K05	AB371292	porūšis: ozaenae	K44	AB924581	<i>K. ornithinolytica</i>
K06	AB924549	porūšis: ozaenae	K45	AB924582	<i>K. pneumoniae</i>
K07	AB924550	<i>K. pneumoniae</i>	K46	AB924583	<i>K. pneumoniae</i>
K08	AB924551	<i>K. pneumoniae</i>	K47	AB924584	<i>K. pneumoniae</i>
K09	AB371293	<i>K. pneumoniae</i>	K48	AB924585	<i>K. variicola</i>
K10	AB924552	<i>K. pneumoniae</i>	K49	AB924586	<i>K. variicola</i>
K11	AB924553	<i>K. pneumoniae</i>	K50	AB924587	<i>K. pneumoniae</i>
K12	AB924554	<i>K. pneumoniae</i>	K51	AB924588	<i>K. pneumoniae</i>
K13	AB924555	<i>K. pneumoniae</i>	K52	AB924589	n/a
K14	AB371294	<i>K. pneumoniae</i>	K53	AB924590	<i>K. variicola</i>
K15	AB924556	<i>K. pneumoniae</i>	K54	AB924591	<i>K. variicola</i>
K16	AB742228	<i>K. pneumoniae</i>	K55	AB924592	<i>K. pneumoniae</i>
K17	AB924557	<i>K. pneumoniae</i>	K56	AB924593	<i>K. variicola</i>
K18	AB924558	<i>K. pneumoniae</i>	K57	AB924594	<i>K. variicola</i>
K19	AB924559	<i>K. pneumoniae</i>	K58	AB924595	<i>K. variicola</i>
K20	AB371289	<i>K. pneumoniae</i>	K59	AB924596	<i>K. michiganensis</i>
K207-2	HE866752	<i>K. pneumoniae</i>	K60	AB924597	<i>K. pneumoniae</i>
K21	AB924560	<i>K. pneumoniae</i>	K61	AB924598	<i>K. pneumoniae</i>
K22	AB819893	<i>K. pneumoniae</i>	K62	AB371295	<i>K. pneumoniae</i>
K23	AB924561	<i>K. pneumoniae</i>	K63	AB924599	<i>K. pneumoniae</i>
K24	AB924562	<i>K. pneumoniae</i>	K64	AB924600	<i>K. pneumoniae</i>
K25	AB924563	<i>K. pneumoniae</i>	K65	AB924601	<i>K. terrigena</i>
K26	AB924564	<i>K. oxytoca</i>	K66	AB924602	<i>K. michiganensis</i>
K27	AB924565	<i>K. pneumoniae</i>	K67	AB924603	<i>K. terrigena</i>
K28	AB924566	<i>K. pneumoniae</i>	K68	AB924604	<i>K. terrigena</i>
K29	AB924567	<i>K. oxytoca</i>	K69	AB924605	<i>K. terrigena</i>
K30	AB924568	<i>K. pneumoniae</i>	K70	AB924606	<i>K. michiganensis</i>
K31	AB924569	<i>K. pneumoniae</i>	K71	AB924607	<i>K. variicola</i>
K32	AB924570	<i>K. ornithinolytica</i>	K72	AB924608	<i>K. ornithinolytica</i>
K33	AB924571	<i>K. pneumoniae</i>	K74	AB924609	<i>K. oxytoca</i>
K34	AB924572	<i>K. pneumoniae</i>	K79	AB924610	<i>K. planticola</i>
K35	AB924573	<i>K. planticola</i>	K80	AB924611	<i>K. pneumoniae</i>
K36	AB924574	<i>K. pneumoniae</i>	K81	AB924612	<i>K. pneumoniae</i>
K37	AB924575	<i>K. pneumoniae</i>	K82	AB924613	<i>K. pneumoniae</i>
K38	AB924576	<i>K. pneumoniae</i>	KN1	AB924614	<i>K. pneumoniae</i>
K39	AB742230	<i>K. pneumoniae</i>	KN2	AB371290	<i>K. pneumoniae</i>
			KPB-1	HE866751	<i>K. pneumoniae</i>

3P lentelė. Komerciniai junginiai, panaudoti gp531 fermentiniam specifiškumui tirti.

Nr.	Junginio pavadinimas	Gamintojas	Junginys	Metodas*
1	4-NP stearatas	Sigma-Aldrich		A, 405 nm
2	4-NP acetatas	Sigma-Aldrich		A, 405 nm
3	4-NP butiratas	Sigma-Aldrich	Nitro fenilo ir riebalų r.	A, 405 nm
4	4-NP dekanatas	Sigma-Aldrich		A, 405 nm
5	4-NP palmitatas	Sigma-Aldrich		A, 405 nm
6	4-NP valeratas	Sigma-Aldrich		A, 405 nm
7	4-NP-β-D-gliukuronidas	Sigma-Aldrich		A, 405 nm
8	4-NP-α-D-ksilopiranozidas	Sigma-Aldrich		A, 405 nm
9	4-NP-α-L-arabinofuranozidas	Sigma-Aldrich		A, 405 nm
10	4-NP-α-L-arabinopiranozidas	Sigma-Aldrich	Nitro fenilo ir sacharido	A, 405 nm
11	4-NP-β-D-ksilopiranozidas	Sigma-Aldrich		A, 405 nm
12	4-NP-β-L-arabinopiranozidas	Sigma-Aldrich		A, 405 nm
13	4-NP-α-L-fukopiranozidas	Carbosynth		A, 405 nm
14	2-chloro-4-NP-β-D-maltoriozidas	Fluka		A, 405 nm
15	4-nitroacetanilidas	Sigma-Aldrich		A, 405 nm
16	4'-nitrobenzanilidas	Combi-Blocks		A, 405 nm
17	X-Gal	Thermo Fisher Scientific	5-Br-4-Cl- -3-indolilo ir sacharido	A, 615 nm
18	X-Glc	Carbosynth		A, 615 nm
19	X-GlcU	Carbosynth		A, 615 nm
20	Kraskmolas (iš bulvių)	Sigma-Aldrich		TLC
21	Karboksimetil celiuliozė	Sigma-Aldrich	Polisacharidas	TLC
22	Amilozė (iš bulvių)	Sigma-Aldrich		TLC
23	Pektinas (iš citrusinių vaisių)	Sigma-Aldrich		TLC
24	β-D-celobiozė	Fluka Analytical		TLC
25	Laktozė	-	Disacharidas	TLC
26	D (+)-melibiozė	Fluka Biochemica		TLC
27	D (+)-rafozė	Sigma-Aldrich	Trisacharidas	TLC

*aktyvumo nustatymas atliekamas, matuojant chromogeninių junginių absorbciją (A), esant 405 arba 615 nm šviesos bangos ilgiui, arba vykdant TLC analizę, kurios metu plokštelė dažoma anyžio aldehido dažu.

4P lentelė. Gp531 katalizuojamos hidrolizės produktų molekulinės masės, pagrįstos HPLC-MS masių spektrais.

Produktas	Modifikacija	Žymuo	Formulė	M, Da	Signalas, <i>m/z</i>	Jonas/ Aduktas
Tetrasacharidas	nėra	M _I	C ₂₄ H ₄₀ O ₂₁	664	663 687	[M-H] ⁻ [M+Na] ⁺
Tetrasacharidas	acetilo gr.	M _{I+Ac}	C ₂₆ H ₄₂ O ₂₂	706	705 724 725 729 365	[M-H] ⁻ [M+H ₂ O] ⁺ [M+H+H ₂ O] ⁺ [M+Na] ⁺ [M+H+Na] ²⁺
Oktasacharidas	nėra	M _{II}	C ₄₈ H ₇₈ O ₄₁	1310	1309 1328 654	[M-H] ⁻ [M+H ₂ O] ⁺ [M-2H] ²⁻
Oktasacharidas	acetilo gr.	M _{II+Ac}	C ₅₀ H ₈₀ O ₄₂	1352	1351	[M-H] ⁻
Oktasacharidas	2× acetilo gr.	M _{II+2Ac}	C ₅₂ H ₈₂ O ₄₃	1394	1393	[M-H] ⁻
Dodekasacharidas	nėra	M _{III}	C ₇₂ H ₁₁₆ O ₆₁	1956	977 1955	[M-2H] ²⁻ [M-H] ⁻

PUBLIKACIJOS IR KITA MOKSLINĖ VEIKLA

Publikuoti straipsniai

- ⊗ Noreika A, Stankevičiūtė J, Rutkienė R, Meškys R, Kalinienė L. Exploring the enzymatic activity of depolymerase gp531 from *Klebsiella pneumoniae* jumbo phage RaK2. *Virus Res.* 2023; 336: 199225. Doi: **10.1016/j.virusres.2023.199225**.
- ⊗ Noreika A, Rutkienė R, Dumalakienė I, Vilienė R, Laurynėnas A, Povilonienė S, Skapas M, Meškys R, Kaliniene L. Insights into the Alcycovirus Adsorption Complex. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(11): 9320. Doi: **10.3390/ijms24119320**.

Su disertacijų tyrimais nesusiję moksliniai straipsniai

- ⊗ Noreika A, Meškys R, Lazutka J, Kaliniene L. Complete genome sequence of *Buttiauxella* phage vB_ButM_GuL6. *Arch Virol.* 2020; 165(11): 2685-7. Doi: 10.1007/s00705-020-04780-7.
- ⊗ Labutytė G, Povilonienė S, Šimoliūnas E, Gabrielaitis D, Skapas M, Noreika A, Meškys R, Časaitė V. Functionalized Protein Nanotubes Based on the Bacteriophage vB_KleM-RaK2 Tail Sheath Protein. *Nanomaterials.* 2021; 11(11):3031. Doi: 10.3390/nano11113031.
- ⊗ Kaliniene L, Noreika A, Kaupinis A, Valius M, Jurgelaitis E, Lazutka J, Meškienė R, Meškys R. Analysis of a Novel Bacteriophage vB_AchrS_AchV4 Highlights the Diversity of Achromobacter Viruses. *Viruses.* 2021;13(3):374. Doi: 10.3390/v13030374.
- ⊗ Zajančauskaitė A, Noreika A, Rutkienė R, Meškys R, Kaliniene L. Low-Temperature Virus vB_EcoM_VR26 Shows Potential in Biocontrol of STEC O26:H11. *Foods.* 2021; 10(7):1500. Doi: 10.3390/foods10071500.

Stendiniai pranešimai konferencijose

- ⊗ Noreika A, Rutkienė R, Dumalakienė I, Povilonienė S, Meškys R, and Kaliniene L. Investigation of the Adsorption Complex of the Giant Phage vB_KleM-RaK2 Infecting *Klebsiella*. Viruses of Microbes. EMBO Workshop. 9–13 July 2018. Wrocław, Poland.
- ⊗ Noreika A, Rutkienė R, Stanislauskienė R, Meškys R, Kaliniene L. Towards the Elucidation of the Molecular Mechanisms Underlying the Cold Adaptation of Low-Temperature Viruses Specific for a Mesophilic Host. 45th FEBS Congress. Molecules of Life: Towards New Horizons. 3–8 July 2021. Ljubljana, Slovenia.

Mokslo dirbtuvė

Integrated Methodologies and Approaches for Structural Biology. Central European Institute of Technology. iNEXT Workshop. 29–31 May 2019. Brno, Czech Republic.

Pristatyti ir apginti pranešimai-egzaminai

- ⊗ Baltymų ir ląstelės biotechnologija (dr. R. Meškys), 8 ECTS, tema: „Antikūnai ir jų mimetikai – biotechnologija, savybės ir pritaikymas“. 2018-03-23.
- ⊗ Struktūrinė biochemija (dr. S. Serva), 8 ECTS, tema: „Uodega *vizgina* virusą. Struktūriniai ir biotechnologiniai aspektai“. 2018-12-20.
- ⊗ Molekulinė virusologija (dr. L. Kalinienė), 8 ECTS, tema: „Nanosistemos iš bakteriofagų arba jų komponentų“. 2018-10-08.
- ⊗ Prokariotų biochemija (dr. R. Meškys), 8 ECTS, tema: „Bakterijų kapsulės sintezė ir degradacija“. 2018-06-13.

Bendrųjų gebėjimų kreditai

- ⊗ Intelektinės nuosavybės apsauga; 5 val., **0,25** ECTS; 2017-12-14;
- ⊗ Patirtinio mokymo ir tinklaveikos programa; 40 val., **1,6** ECTS; nuo 2018-10-16 iki 2018-12-11;
- ⊗ Mokslo projektai – finansinės priemonės ir paraiškų rengimas; 3 val., **0,25** ECTS; 2019-06-12;
- ⊗ Akademinė etika; 2 val., **0,2** ECTS; 2019-12-16;
- ⊗ Atviros prieigos kompetencijų tobulinimas; 4+8 val., **0,5** ECTS; 2019-12-11.

Bakalaurantų ugdymas laboratorijoje

Geros laboratorinės praktikos, pagrindinių molekulinės mikrobiologijos ir biochemijos metodų įsisavinimas, eksperimentų planavimas ir baigiamojo darbo taisyklingas rengimas buvo ugdoma (>16 val.) bakalaurantams:

- ⊗ Agnei Morkutei (nuo 2018-02 iki 2019-06);
- ⊗ Edvinui Jurgelaičiui (nuo 2019-03 iki 2020-08).

iGEM konkursas – „FlavoFlow“ projektas

Prisidėta idėjomis ir medžiagomis prie 2020 m. „FlavoFlow“ projekto iGEM komandos, kuri tapo didžiojo prizo nugalėtojais iš 256 dalyvavusių komandų visame pasaulyje. Vienas iš dalyvių buvo E. Jurgelaitis.

PADĖKA

Esu *dėkingas* savo buvusiai mokslo vadovei dr. *Laurai Kalinienei* už galimybę atlikti darbus, susijusius su disertacija ir įgįstus pamatus moksliniuose eksperimentuose ir pagalbą rengiant straipsnius bei stendinius pranešimus konferencijoms. Taip pat didelis ačiū skyriaus vadovui prof. dr. *R. Meškiui* už pagalbą sprendžiant iškilusias mokslines problemas ir suteiktą galimybę vykdyti eksperimentus Biochemijos instituto MMBS skyriuje. Prof. dr. *Mindaugui Valiui* už galimybę atlikti „Western blot“ analizes jo vadovaujamame Biochemijos instituto proteomikos skyriuje ir dr. *Marijai Ger* už patarimus vykdant imunologines analizes. Taip pat esu dėkingas dr. *Irenai Dumalakienei* ir *Ritai Vilienei*, įsikūrusioms Inovatyviosios medicinos centro imunologijos skyriuje, už galimybę atlikti triušių imunizaciją ir imunologinius tyrimus. Dėkoju už pagalbą vykdant mėginių TEM analizes Biotechnologijos instituto eukariotų genų inžinerijos skyriaus mokslininkams dr. *Justui Lazutkai* ir dr. *Alionai Avižinienei*. O už geresnės raiškos mikrofajų – dr. *Martynui Skapui*, FTMC medžiagų struktūrinės analizės skyriaus mokslininkui. Labai ačiū dr. *Audriui Laurynėnui*, Biochemijos instituto bioanalizės skyriaus mokslininkui, už modeliinių struktūrų numatymą, pritaikant bioinformatinius įrankius RaK2 adsorbcijos kompleksą formuojantiems baltymams. Taip pat institute, bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje dirbančiai dr. *Marijai Jankunec* ačiū už AFM padarytas analizes. Dėkoju kitiems MMBS skyriaus mokslininkams ir darbuotojams: dr. *Rasai Rutkienei* už baltymų gryninimo apmokymus, *Justui Vaitekūnui* ir dr. *Jonitai Stankevičiūtei* už pagalbą, atliekant HPLC-MS analizes, vyr. laborantei *Nijolei Uždavinienai*, inžinieriui *Algimantui Krutkiui* už sklandžiai veikiančius prietaisus laboratorijoje. Ypatingas ačiū dr. *Eugenijui Šimoliūnui* ir *Monikai Šimoliūnienei* už palaikimą ir pagalbą kritiniu momentu.

SUMMARY OF DOCTORIAL DISSERTATION

INTRODUCTION

The consequences of human-induced excessive use of antibiotics in medicine, the food industry, livestock, and horticulture are evident in the increased variety and antibiotic resistance of microorganisms¹⁻³. This rise in resistance complicates the treatment of bacterial infections³⁻⁷. As these challenges persist, it's imperative to seek alternatives to antibiotics that are effective, yet, less harmful to patients enduring chronic bacterial infections.

Natural bacterial predators, such as (bacterio)phages⁸, which are typically composed of a genome-containing capsid and a tail with an adsorption complex at the end^{9,10}, offer an excellent alternative with superior properties compared to antibiotics^{11,12}. Phages precisely target and destroy specific bacterial species or strains while multiplying, reducing the likelihood of harming the microbiota and eliminating the need for high-dose treatments¹³⁻¹⁵. These attractive characteristics drive various studies involving phages. Common phage characterisation helps explore their genetic diversity, evolution, morphological distinctions, and expand treatment options^{8,16-18}. In addition, studies on virus-host interactions¹⁹ provide an understanding of bacterial resistance to phages and a foundation to create strategies that inhibit bacterial growth. In this context, the proteins identified as crucial for infection initiation, based on their properties (such as enzymatic activity^{20,21,30-39,22-29} or bacterial lysis⁴⁰), may have applications in medicine⁴¹ or biotechnology⁴².

In addition, bacteriophages are relatively simple and inexpensive modular organisms that have significantly contributed to the discovery of numerous fundamental truths in the molecular biology, such as: nucleic acid being the hereditary material of life⁴³; RNA hybridisation occurring during protein synthesis in ribosomes⁴⁴; bacteria degrade phage DNA through their restriction-modification⁴⁵ or CRISPR self-protection systems^{8,46}.

One of the fundamental research goals is study the adsorption complex, which is crucial for infection initiation and varies in complexity depending on the phage tail morphology^{21,47,56,48-55}. Limited research has been conducted on viruses with sophisticated adsorption complexes, such as *jumbo* phages (**Fig. 1**), including N1M2²⁰⁸, GBH019²⁰⁹, ϕ Kp24⁶⁴, Φ K64-1⁶³, and vB_KleM-RaK2 (RaK2)¹⁰⁰.

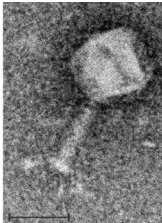
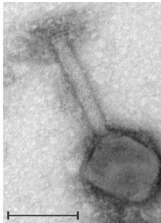
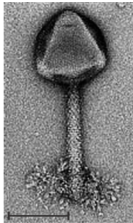
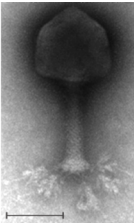
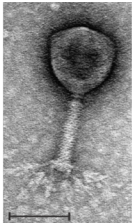
					
	GBH019	N1M2	ϕKp24	ϕK64-1	vB_KleM_RaK2
Accession No.	-	MN642089	MW394391	AB897757	NC_019526
Host	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella</i> KV-3
Capsid, nm	132.7	113×101	110	129*	123
Tail, nm	163.4	158×21	177×23.1	159×24*	128×21.5
gDNA, bp	347546	253367	307210	346602	345809
GC content, %	32	40.9	45.1	31.7	32
CDS	534	257	372	541	534
Tail fibres	4	?	14	11	10
tRNAs	6	3	9	-	7
tRNA anticodons	-	MRN	SNDQYRLM?	-	RS×2NT?×2
infecting K-serotypes:	K2, K51, K102	K186*	K2, K13, K19, K25, K35, K46, K61, K64, K81	K1, K11, K21, K25, K30, K35, K64, K69, KN4, KN5	-

Figure 1. TEM micrographs of *Klebsiella* spp. jumbo bacteriophages with key characteristics. The scale bar represents 100 nm. Letters or question marks correspond to known or unknown amino acids transported by tRNAs, respectively. Asterisks indicate parameters not published by the article authors^{63,100,208–211}.

Jumbo phages^{59,60} are characterised by their impressive size, with genomes exceeding 200 kbp and containing around 200–500 genes. Uniquely, among the genomes of GBH019²⁰⁹, ϕK64-1⁶³, and RaK2¹⁰⁰, a mosaic organisation of genes is observed, grouping them into a small genus named *Alcyoneusvirus*. Regardless, jumbo genomes encode additional proteins and RNAs absent in smaller phages. For instance, up to nine distinct tRNA genes can be found, while ϕKp24 and RaK2 even contain 1–2 tRNAs with unique anticodons^{59,63,100,208–211}.

The adsorption complex of jumbo phages usually consists of heterogeneous, labile, long, and typically branched nanostructures (long tail fibres) observed in electron micrographs^{61,62}. These fibres may contain up to 14 different structural proteins, primarily tailspikes^{63,64}, that are found in smaller phages^{21,38,65} as well. Tailspikes typically demonstrate distinct depolymerase activity^{63,66–69}, breaking down polymers enveloping the bacterium^{33,38,70}. This enzymatic activity allows the phage to reach the outer membrane⁵¹, where a secondary interaction occurs via adhesin affinity, causing the phage to irreversibly adsorb onto the bacterium and initiate infection^{50,71}. For example, the ϕKp24 bacteriophage can infect nine different K-serotypes of *Klebsiella* sp. strain⁶⁴.

Phage-borne depolymerases⁷² target lipopolysaccharides⁷³ and capsular polysaccharides^{74,75} that envelope the bacterium and are associated with O- and K-antigens^{76–79}, respectively. The latter antigens are primary virulence factors^{76,80} that enhance bacterial pathogenicity by protecting the cell from external threats,

such as an immune response, viruses, or adverse environmental conditions^{81–83}. Virulence factors⁸⁰, along with multi-drug resistance¹ further complicate treatment of bacterial infections and increase patient mortality^{84,85}.

It is estimated that over 300 different serotypes of *Klebsiella* spp. have already been discovered. However, the polysaccharide structure has only established for about 80 of them^{78,86}. The diversity of serotypes^{76,87,88} suggests a potentially wide array of polysaccharide depolymerases with varying enzymatic specificities^{31,35,39,89,90}, as polysaccharides can contain dozens of different monosaccharide residues, featuring various modifications^{91,92} with varying combinations of glycosidic bonds.

Therefore, conducting studies on phage adsorption complexes is crucial for understanding the complex oligomeric structures of these viruses involved in bacterial recognition, which may serve in nanostructure bioengineering⁹³. In addition, such studies provide insights into the mechanisms of interaction between phage and its host bacterium⁹⁴. Identifying proteins with depolymerase or affine activity facilitates the development of systems for pathogen detection or typing⁹⁵, as well as the synthesis of various oligosaccharides⁹⁶ under physiological conditions. These saccharides may be used in developing glycovaccines, while depolymerases could be supplemented as adjuvants during infection treatment^{97,98}. Phage interaction proteins, such as adhesins, can also be applied in platforms that generate affine molecules, similar to phage display⁹⁹ technology.

To gain a better understanding of *jumbo* phages, our research focused on RaK2, one of the first *Klebsiella* jumbo phages discovered. It features six branched long tail fibres, which are potentially composed of ten structural proteins. Notably, gp098, gp529, gp530, and gp533 of RaK2¹⁰⁰ show high protein sequence identity ($\geq 90\%$) corresponding to Φ K64-1 gp25, gp59, gp60, and gp63⁶³, which were demonstrated to exhibit depolymerase activity against *Klebsiella* serotypes K25, K35, and K30/K69, respectively. The high similarity between RaK2 and Φ K64-1 proteins suggests that their host-recognition ranges at least partially overlap, providing valuable insights for our research.

The research aim was to investigate the structural and functional characteristics of the RaK2 adsorption complex.

To accomplish the aim, **tasks** were established as follows:

- 1) to perform bioinformatic analysis of structural proteins, gp098, gp526–534, of RaK2;
- 2) to identify RaK2 proteins that play a role in the phage adsorption process on *Klebsiella pneumoniae* isolate KV-3;
- 3) to identify proteins involved in the formation of RaK2 branched long tail fibre;

- 4) to determine the *K. pneumoniae* KV-3 capsular serotype and its polysaccharide structure;
- 5) to identify and characterise RaK2 recombinant proteins with depolymerase activity.

Thesis statements

- ⊗ *AlphaFold2* bioinformatics tool enables the generation of reliable models for bacteriophage long tail fiber proteins that exhibit structural homology.
- ⊗ Solubility of recombinant fibre proteins can be increased by synthesising polypeptides with a shorter sequence.
- ⊗ Inhibition of the phage with antibodies allows the identification of proteins required for its adsorption.
- ⊗ Immuno-labelling with Au nanoparticles provides information on the location of proteins in the virion.
- ⊗ Bacterial K-serotype can be determined by genotyping the *cps* region.
- ⊗ Enzymatic activity of depolymerases can be characterised using polysaccharide as a substrate with a method based on (chemical modification of the product and) HPLC-MS assay.

Scientific novelty and practical significance

Little is known about the adsorption complexes of jumbo bacteriophages of the genus *Alcyoneusvirus*, which feature one of the most complex structures described in the literature. The presence of long and narrow nanostructures, exhibiting lability and branching characteristics, in these adsorption complexes makes them sophisticated and still scarcely investigated. The first discovered *Alcyoneusvirus* phage, RaK2¹⁰¹, was investigated with a respect to its adsorption complex, which contains at least a dozen structural proteins, including gp098 and gp526–534.

High-quality structural trimer models, particularly in regions composed of β -sheets, were generated using the *Alphafold2* tool for all the RaK2 proteins studied. In addition, the first possible architectural model of a long branched fibre of the *Alcyoneusvirus* phage was proposed. The model of the branched long tail fibre is composed of all investigated RaK2 proteins, except gp098. Furthermore, infection inhibition and adsorption studies have shown that gp098 and gp531 are important for RaK2 infection, with gp531 also acting as a depolymerase, as demonstrated by spot test on the *Klebsiella pneumoniae* KV-3 isolate bacterial lawn. Serotyping of the *Klebsiella* KV-3 strain, by genotyping the *cps* gene cluster associated with capsule polysaccharide synthesis, revealed a K54-type polysaccharide structure and identified one of the conditions leading to its deacetylation. Using this polysaccharide as a substrate, the enzymatic specificity of the depolymerase gp531 was determined. To date, no other depolymerase has been reported that hydrolyses the *Klebsiella* polysaccharide of

serotype K54 independently of its acetylation and acts as an acidic β -(1 $\rightarrow$ 4)-endoglucosidase.

The results of the study provide a better understanding of *Alcyoneusvirus* jumbo phages and the functions of the proteins involved in the adsorption complex. The relatively stable (<55°C) enzymatic specificity of RaK2 gp531 may be used for the production of specific prebiotics with L-fucose content, as well as for the development of glycovaccines against relevant pathogens¹⁰², or for the synthesis of novel saccharides. The depolymerase activity may also aid the treatment of virulent *Klebsiella*¹⁰³ K54 bacterial infections.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid vectors

Recombinant gene cloning:

⊗ pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific).

Recombinant gene expression/ protein synthesis induction:

⊗ pET16b and pET28b (Novagen, USA).

DNA primers

Table 1. Sequences of primer pairs complementary to RaK2 genes.

Gene	Primer (5' → 3') sequence	Gene sequence
098	F ATGGCT AG CGATACTATGACTGGCAAC R ATT CGGATC CTGACTGTGTGTCAGAT	truncated
526	F TACAGCT AG CTTAAACGAGGACAATATGTC R TAACAG GATCC ATTAATATTCCTAGATGTG	full
527	F AT GCTAG CTCTGGTACAACAAATACAA R TAACAG GATC CTCGTTTAAATTAGTTGG	truncated
528	F TACACATATGAAAAGGAATTATGACATGGC R TACTAG GATC CTGTAGTGGTGAGCTTAATG	truncated
529	F TGGCT AG CATGGGAAATTTTATAC R TCG GATC CTATTATGCACCTCTAATA	full
530	F GAAGCT AG CGTCAGTTACACTACATCA R AAGTGGAT CT TTTAGGTTGTATAAAATT	truncated
531	F CTTG TCGAC GAGGTTTAATATGTCATTGA R TAAG GATC CTTTTTTATACTGAAGTTCCTG	full
532	F TCAG TCGAC GTCTTTAAGTAATTTAAGCTC R TAAT GGATC CATTACTAGGTGAAAG	full
533	F TCAG TCGAC GTCAATTAATTCAACTTTCACC R GCC GATC CGATAATGACATAATCGAT	full
534	F CCAACGCT AG CATGCAAATAGCTGG R TACAG GATC CATTATATAGTTAAGAACTTAC	truncated

F/R – forward and reverse primers with bolded target site of restriction endonucleases: BamHI, NdeI, NheI, or Sall.

Corresponding sequencing primers of pJET1.2 and pET16b vectors were used for identifying proper transformants.

Bacterial strains

Recombinant gene cloning:

⊗ DH10B, *Escherichia coli*: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80/*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *endA1* *recA1* Δ(*ara*, *leu*)7697 *araD139* *galU* *galK* *nupG* *rpsL* (StrR) λ⁻ (Thermo Fisher Scientific, Lithuania).

Protein synthesis induction:

- ⊗ HMS174 (DE3), *Escherichia coli*: F⁻ *recA1 hsdR* (*rK12⁻ mK12⁺*) (Rif R) (Novagen);
- ⊗ Rosetta pLysS (DE3), *Escherichia coli*: F⁻ *ompT hsdS_B* (*r_B⁻ m_B⁻*) *gal dcm* (DE3) pLysSRARE (CamR) (Novagen, USA);
- ⊗ Arctic express (DE3), *Escherichia coli*: B F⁻ *ompT hsdS* (*rB⁻ mB⁻*) *dcm⁺* Tetragalλ *endA Hte* [cpn10 cpn60 Gent^r] (Agilent technologies, USA);
- ⊗ ER2566 or T7 Express, *Escherichia coli*: B *fhuA2 lacZ::T7 lon ompT gal sulA11* R(*mcr-73::miniTn10--Tet^S*)2 *dcm* R(*zgb-210::Tn10--Tet^S*) *endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10* (New England Biolabs, USA).

RaK2-based experiments:

- ⊗ *Klebsiella* sp. KV-3: a veterinary isolate acquired by scientists from VU – Institute of Biochemistry in Lithuania. Accession No. **SAMN31360738**.

Depolymerase identification:

- ⊗ *Klebsiella* sp. KV-1 isolate; ⊗ *Klebsiella pneumoniae* 279;
- ⊗ *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724; ⊗ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705.

Bacterial virus

The *jumbo* phage vB_KleM-RaK2 (Accession No. JQ513383), infecting *Klebsiella* sp. KV-3, was previously isolated from a swamp by Dr. Vytautas Klausas[†] in Rokiškis city, Lithuania.

Chemical compounds and solutions

Acids: acetic a., H₃BO₃, citric a., formic a., HCl, H₂SO₄, TCA a., TFA a.

Antibiotics: ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, tetracycline.

Bases: KOH, NaOH.

Chromogenic Compounds: 4-nitrophenyl (NP) acetate, 4-NP α-D-xylopyranoside, 4-NP α-L-arabinofuranoside, 4-NP α-L-arabinopyranoside, 4-NP α-L-fucopyranoside, 4-NP β-D-xylopyranoside, 4-NP β-L-arabinopyranoside, 4-NP butyrate, 4-NP decanoate, 4-NP palmitate, 4-NP stearate, 4-NP valerate, 4-nitroacetanilide, 4'-nitrobenzanilide, peroxidase substrate (×10), X-Gal, X-Glc, X-GlcA.

Detergents: sodium dodecyl sulfate (SDS), Tween-20.

Dyes: 3,3'-diaminobenzidine, 4-anisaldehyde, 8-Aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid (ANTS), bromphenol blue, Coomassie brilliant blue G250, ethidium bromide (EtBr).

Extracts: milk powder, tryptone, yeast extract.

Enzymes: T4 DNA ligase, DNase I, BamHI, NdeI, NheI, SalI.

Inorganic Salts: CaCl₂, CsCl, CuSO₄, CuSO₄·5H₂O, KH₂PO₄, K₂HPO₄, KCl, Mg₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, NaBH₄, NaCNBH₃, Na₂CO₃, Na₂HPO₄, NaCl, NaN₃, (NH₄)₂CO₃, NiSO₄·6H₂O.

Miscellaneous: Folin–Ciocalteu's reagent, Freund's full and incomplete adjuvants, stable peroxidase ($\times 1$) buffer solution.

Organic Compounds: acrylamide, APS, bis-acrylamide, β -mercaptoethanol, formaldehyde, EDTA, glycerol, L-glycine, imidazole, PMSF, poly-L-lysine, TEMED, Tris, Tris·HCl, carbamide.

Organic Salts: sodium acetate, sodium citrate.

Proteins: anti-rabbit IgG conjugated with 10 nm Au particles, anti-rabbit whole IgG peroxidase conjugate, BSA, IRDYE® 680RD goat anti-rabbit IgG secondary antibody, Page Ruler Prestained Protein Ladder 10–180 kDa.

Saccharides: agar, agarose, amylase, carboxymethylcellulose, D-(+)-glucose, D-cellobiose, D-glucuronic acid Na·H₂O, IPTG, L-fucose, pectin, starch, sucrose.

Solvents: 1-butanol, 1-propanol, ACN, chloroform, DMSO, ethanol, ethyl acetate, methanol, phenol.

Luria-Bertani (LB) broth:

1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl; pH adjusted to 7.0; sterile.

Luria-Bertani agar (0.5–1.2% LA) medium:

0.5 or 1.2% agar, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl; pH adjusted to 7.0; sterile.

Bacteriophage harvest solution:

49 mM Na₂HPO₄, 68 mM NaCl, 17 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄. Sterile magnesium sulphate is added after autoclaving.

CsCl gradient solutions:

water solutions of CsCl containing concentrations of 5.6, 3.92, 3.22, and 2.52 M, with respective densities of 1.71, 1.49, 1.40, and 1.31 g/mL.

Bacteriophage dialysis buffer solutions after CsCl purification:

I – 3 M NaCl, 100 mM Tris·HCl, pH $\approx$ 7.4;

II – 0.3 M NaCl, 100 mM Tris·HCl, pH $\approx$ 7.4.

Protein electrophoresis (SDS-PAGE) solution (10 $\times$):

250 mM Tris, 2 M L-glycine, 1% SDS.

Protein sample loading dye (4 $\times$):

200 mM Tris·HCl (pH 6.8), 8% SDS, 40% glycerol, 600 mM β -mercaptoethanol, 50 mM EDTA, 0.08% bromophenol blue.

Resolving PAA gels ($\approx$ 10–14%):

9.88–13.84% acrylamide (30%), 0.26–0.37% bis-acrylamide (0.8%), 123 mM Tris, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.2% TEMED, pH $\approx$ 8.8.

Stacking PAA gel ($\approx$ 4%):

3.85% acrylamide (30%), 0.1% bis-acrylamide (0.8%), 123 mM Tris, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.2% TEMED, pH $\approx$ 6.8.

Coomassie dye for PAA gel staining:

0.1% Coomassie brilliant blue G-250, 30% methanol, 30% acetic acid.

PAA gel washing solution:

5% methanol, 7% acetic acid.

Tris·acetate·EDTA (TAE, 50×), DNA electrophoresis solution:

2 M Tris, 1.0 M acetic acid, 50 mM EDTA.

Agarose (0.5–1.0%) for DNA electrophoresis:

0.5–1.0 g agarose, 99.5–99.0 g TAE (1×).

Protein chromatography solutions:

A1: 25–50 mM Tris, pH 8.0;

A2: 20 mM sodium phosphate, pH 8.0.

B1: 25 mM Tris, 0.7 M imidazole, pH 8.0;

B2: 50 mM Tris, 0.5 M imidazole, pH 8.0;

B3: 20 mM sodium phosphate, 0.7 M imidazole, pH 8.0.

Solutions for protein purification under denaturing conditions:

A1c: 50 mM Tris, 6.0 M carbamide, pH 8.0;

B2c: 50 mM Tris, 6.0 M carbamide, 0.5 M imidazole, pH 8.0.

A/B reagents for concentration determination according to Lowry:

A – 0.4% NaOH, 2% Na₂CO₃;

B – 0.5% CuSO₄·5H₂O, 1.0% sodium citrate.

PBS (10×) for antiserum dilutions:

1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄, 11.5 mM K₂HPO₄, pH 7.4.

Protein transfer solution (Western Blot):

25 mM Tris, 192 mM L-glycine, 0.1% SDS, 20% methanol.

Membrane blocking mixtures:

i) 1% mp: 1.0% milk powder, 154 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.05% Tween-20, 0.02% NaN₃. Stored at 4–8°C before use.

ii) 3% BSA: 3.0% BSA, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, 0.05% Tween-20. Stored at -20°C before use.

Membrane washing solution (PBST):

0.5% Tween-20 in PBS (1×) solution.

TEM grid solution:

150 mM NaCl, 20 mM 0.02 M sodium phosphate, pH 8.1.

Uranyl (2%) acetate solution:

20 mg of uranyl acetate salt dissolved in 0.995 mL of water and in 25 μL of a 2 M acetic acid solution.

NaBH₄ (0.6 M) solution:

23 mg of NaBH₄ dissolved in 0.150 mL of a 0.1 M KOH solution and 1.350 mL of water.

ANTS (0.2 M) derivatisation solution:

43 mg of ANTS·2Na⁺ dissolved in 0.229 mL of water and 0.0404 mL of a 99.8% acetic acid.

NaCNBH₃ (1 M) solution:

63 mg of NaCNBH₃ dissolved in 1.000 mL of DMSO.

DEAE carbohydrate chromatography solutions:

A: 20 mM sodium phosphate, pH 8.1, ≈3.14 mS/cm;

B: 20 mM sodium phosphate, 1.0 M NaCl, pH 8.1, ≈72 mS/cm.

TFA acid (8 M) solution:

0.700 mL of trifluoroacetic acid dissolved in 0.443 mL of water.

TLC mobile phases:

i) 1-proOH: EtOAc: H₂O in a ratio of 6:1:3 (v/v/v);

ii) 1-butOH: ethanol: H₂O in a ratio of 5:3:2 (v/v/v).

Anise aldehyde(1%) dye:

90.6% ethanol, 1.0% 4-anisaldehyde, 1.0% acetic acid, 3.4% H₂SO₄.

Depolymerase substrate screening solutions:

i) mono and disaccharide (0.05–0.01 M) water solutions as controls;

ii) polysaccharide (1–5 mg/mL) water solutions;

iii) 4-NP chromogenic solutions (0.01 M) in DMSO;

iv) X-saccharide chromogenic solutions (0.01 M) in DMSO.

Depolymerase activity assay solutions (0.05 M and pH 3–10):

prepared by mixing 0.2 M acidic/ basic pair solutions, namely citric acid/ citrate for pH 3–6, Tris·HCl/ Tris for pH 7–9, and Boric acid/ NaOH for pH 10, in appropriate ratios based on the Henderson-Hasselbalch approximation.

Methods

Bioinformatic analysis of RaK2 protein structures

The *AlphaFold2* bioinformatic tool was used to model the trimeric structures of the RaK2 proteins gp098 and gp526–534, refined over 12 runs using 16 structural templates. Small overlapping fragments of the protein, about 350 aminoacid residues, were first modelled and then assembled into a complete structure using UCSF Chimera v1.16 software, which was also used to visualise the generated structures. The reliability of the models was assessed using the pLDDT (predicted Local Distance Difference Test) in scale (0–100%), measuring the deviation of predicted distances in the model from those in the established structure.

Protein Data Bank (PDB) databases with sequence identity thresholds of 25–90% (PDB25, PDB50, PDB90) were used to identify the closest structural homologues by submitting structural regions to the *Dali* server and selecting the most reliable homologues of the phage proteins, with the highest Z-score, which indicates a statistically significant overlap (structural homology) between the

amino acid residues of two proteins within the folding region. Typically, a Z-score of >2 suggests a common biological significance between two proteins, such as similar function, activity, or interaction with a ligand, while a Z-score of >8 indicates that both structures share a common ancestry (orthologs). Protein sequences were also analysed using the *Hhpred* tool with PDB_mmCIF70, employing default settings and a minimum coverage of 10–20% between aligned sequences.

The protease cleavage site for the 650–779 region of the C-terminus of gp530 was analysed using the *MMAFT* bioinformatic tool against other proteins, including GA1 gp12, Φ K1-5 gp46, K1E endoNE, Φ 63D endoN, T5 pb1, 29 gp12, PZA gp12, B103 gp12, and K5 KlfA, all of which contain an intramolecular chaperone domain (endochaperone) at their C-terminus.

Modelling of the trimeric structures of RaK2 proteins was conducted by Dr. Audrius Laurynėnas (from Bioanalysis Department at the Institute of Biochemistry), and the domain homology analysis was performed by Dr. Laura Kalinienė.

Klebsiella sp. KV-3 K-typing using bioinformatics

The bioinformatic analysis was conducted on a 30,887 kbp fragment of genome (3637592–3668479) of *Klebsiella* sp. KV-3, identified using primary *Blast* analysis of homologous sequences). The analysed fragment includes the *cps* gene cluster flanked by *terC* and *rfbA* at the 5' and 3' termini, respectively. The K-serotype of *Klebsiella* sp. KV-3 was determined using the open-source tool, *Multigeneblast*, with default parameters. To facilitate the identification process, 81 *Klebsiella* K-serotypes with established polysaccharide structures and *cps* genotypes were utilised as references. Additionally, two open-source tools, *K-Pam*⁸⁷ and *Kaptive*²¹², were used to verify the serotype identification.

Cultivation, competent cell preparation, and transformation

E. coli bacterial cultures (DH10, Rosetta, HMS174, etc.) were grown in a shaker incubator (Innova 44, New Brunswick Scientific) at 180–200 rpm and temperatures of 30–37°C for 2–24 h in sterile LB broth supplemented with the appropriate antibiotic. To prepare competent cells, the grown bacterial biomass (OD₆₀₀ 0.4–0.8) is washed several times under ice-cold conditions with either 0.1 M CaCl₂ or a 10% glycerol solution for chemical or electrotransformation, respectively. Chemical bacterial transformation is performed by adding 25–50 ng of plasmid DNA or 2.5–5 μ L of a ligated DNA mixture to the glycerol-washed bacterial suspension, followed by a 30-min cold (4°C) and a 2-min heat shock (42°C) treatments. In contrast, electrotransformation is induced by an electric discharge at 1990 mV/cm voltage. Transformed bacteria are then recovered by incubating them in LB broth and plated in a petri dish, allowing bacterial colonies to grow at 30–37°C.

RaK2 propagation and CsCl purification

Klebsiella sp. KV-3 bacteria (60 mL LB, 30°C, 180 rpm, 2–3 h, OD₆₀₀ 0.4–0.5) were inoculated with RaK2 bacteriophage suspension containing 2–5 times more phage particles than bacterial cells. The infection was carried out for 3–5 h at 30°C, and biomass was then harvested (14,500×g, 60 min, 4–6°C). Phages were dissociated into solution by gently shaking the collected pellet in 1.0–2.0 mL of bacteriophage harvest solution with 100–200 µL of chloroform and 2–4 units of DNase I. Finally, the supernatant was collected (2,700×g, 20 min at 4°C), and the phage concentration (pfu/mL) was determined by double-agar titration on a *Klebsiella* sp. KV-3 bacterial lawn.

High-conc. RaK2 suspensions ($\geq 10^{10}$ pfu/mL, 2–4 mL) were purified through a CsCl gradient²¹³, which was consistently prepared by layering CsCl solutions with the following concentrations (densities): 5.6 M (1.7 g/mL), 3.92 M (1.49 g/mL), 3.22 M (1.40 g/mL), and 2.52 M (1.31 g/mL), with the phage suspension layered on top. The purification was performed by ultracentrifugation (Optima L-100K with SW40 rotor, Beckman Coulter, 73,000×g average speed, at 4°C, 2–3 h), causing the phage particles to concentrate into a visible thin layer, depending on the density within the CsCl gradient. The phage-containing layer was collected and cold-dialysed (14 kDa MWCO, a sealed semi-permeable membrane tube; Roth) for 30 min in Ist buffer solution and at least three times for 1.5–2 h each in IInd.

PCR assay

The target genes 098, 526–534 of phage RaK2 were amplified using the PCR enzyme mixture, namely *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), with specific primers (**Table 1**) complementary to the corresponding genes and the RaK2 genome as a template DNA.

In the case of selecting properly cloned plasmids, a colony PCR assay was used with plasmid sequencing primers and *DreamTaq Green PCR Master Mix* 2× (Thermo Fisher Scientific). The PCRs were performed in a thermocycler (Mastercycler 5345, Eppendorf) according to the manufacturer's recommendations.

Plasmid cloning

Plasmid vectors pET16b and pET28b, as well as amplicons of RaK2 genes, were prepared with appropriate restriction endonucleases, namely NdeI, NheI, BamHI, and SalI, to generate digested 5' and 3' termini. Hydrolysed DNA fragments were purified from a 0.7–1.2% agarose gel after electrophoresis using *DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific) as a reference for fragment sizes, and the *GeneJET Plasmid Miniprep Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific) for DNA extraction from a gel slice following the guidelines provided in the kit.

The extracted fragments 528N, 531–533 and 098C, 526, 527C, 529, 530C, 534C were inserted into the correspondingly hydrolysed pET16 and pET28b vectors, respectively. The insertion was performed with T4 DNA ligase using the *Rapid DNA Ligation Kit* (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's recommendations. Afterwards, the reaction mixtures were transformed into gene expression bacterial strains DE3 (Rosetta, HMS174, Arctic Express, ER2566, etc.) to perform protein synthesis optimisation.

Recombinant protein induction and purification

E. coli DE3 bacterial strains (HMS174, Rosetta, Arctic Express, or ER2566) containing the appropriate pDNA were cultured in LB broth (180 rpm, 37°C, 2–3 h) supplemented with antibiotics (50 µg/mL ampicillin for pET16b or 35 µg/mL kanamycin for pET28b) until the suspension reached an OD₆₀₀ of 0.5–0.9. Protein induction was performed using 0.1–1.0 mM of IPTG inducer at 17–30°C for 5–21 h. Afterwards, the biomass was harvested, resuspended in purification solution with 1–2 mM PMSF at a ratio of 1:19 (m/v), disrupted with an ultrasound homogeniser (UZDN-2T) at a 22 kHz frequency for 5–10 min, and protein solubility was determined by performing SDS-PAGE analysis. The sediments and lysates containing insoluble (gp527C, gp530C, and gp534) and soluble (the rest) proteins were purified under mild or denaturing conditions (dissolved within 6 M carbamide-supplemented solutions), respectively.

Protein purification was performed on the chromatographic system (AKTA Purifier 100 FPLC system, GE Healthcare Life Sciences) using a 1–5 mL HiTrap chelating HP column (GE Healthcare Life Sciences) loaded with Ni²⁺ ions and equilibrated with the corresponding solution A. Protein elution was conducted using a 12-CV gradient (0–100% with solution B). The presence and purity of proteins in the collected elution fractions were analysed using SDS-PAGE. The fractions containing pure and high quantities of recomb. protein were pooled and then cold-dialysed (12 kDa MWCO, a sealed semi-permeable dialysis tube; Sigma-Aldrich) in solution A1 without carbamide in each case.

Protein concentration was determined using Lowry's method²¹⁴ with a spectrophotometer (Helios γ, Thermo Fisher Scientific). A calibration curve prepared using bovine serum albumin standards (50–300 µg/mL) was expressed as a linear equation ($R^2 = 0.98$) and used to calculate the concentration:

$$C_B = (A_{750} - 0.003) / 0.00257 \times DF,$$

where C_B represents the protein concentration in µg/mL, A_{750} is the absorbance value at a 750-nm wavelength in a 1.0-cm width cuvette, and DF is the sample dilution factor.

Rabbit immunisation with recombinant proteins of RaK2

Immunisation was conducted at the Innovative Medicine Center under the guidance of Dr. Irena Dumalakienė. The animal experimentation licence No.

0209 was granted by the Lithuanian State Food and Veterinary Service on November 11, 2010.

Antisera against purified recombinant RaK2 proteins were raised by immunising silver rabbits with 4×0.25 mg of each protein, prepared in 1-mL doses with 50 mM Tris, 10% glycerol, pH 8.0. Every two weeks, a thawed dose was mixed with 1 mL of complete Freund's adjuvant (for the 1st immunisation) or incomplete Freund's adjuvant (for the 2nd to 4th). Then, the prepared mixture was injected in 8×0.2 mL portions into the subcutaneous layer and 2×0.2 mL portions into the muscular tissue using an insulin syringe. Two weeks after the final immunisation, blood was drained and antisera were extracted, which were stored at $-80^{\circ}\text{C}^{215}$.

RaK2 infection inhibition with antisera

Each specific antiserum was diluted 100-fold in PBS_{bis} solution and incubated with a RaK2 suspension ($\approx 10^{10}$ pfu/mL) at $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ for an hour. The infective phage quantity in each sample was determined by titration, and the inhibitory effect of the antisera on RaK2 infection was evaluated by comparing quantity values to a control (phage qty without antiserum treatment). The values were expressed as average values with standard deviations ($\pm\text{SD}$) in a log scale, calculated from four experimental replicates ($n=4$). The significance of inhibition was assessed using a two-tailed Student's t-test for independent samples.

RaK2 adsorption inhibition

Biomass of *Klebsiella* sp. KV3 bacteria (37°C , 180 rpm, 1–2 h, OD₆₀₀ 0.8–1.0) was harvested ($15,200 \times g$ for 2.5 min at $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$), washed with 0.2 M sodium phosphate solution (pH 6), twice with sterile water, and then resuspended in 20 mM sodium phosphate solution (pH 6). The prepared bacterial suspensions were separately treated with 10 μg of gp531, 15 μg of gp098C, a mixture of both proteins, and 25 μL of a buffer solution (control) for 30 min at 37°C . Afterward, the biomass was washed with LB broth, diluted to 5.0 mL in the same medium, and subjected to an 8-min adsorption with an equal quantity of RaK2 phage for each sample. Finally, phage pfu quantities for each sample were evaluated from the supernatants (20 min, $2,700 \times g$, 4°C).

The indirect effects of gp098C or gp531 on RaK2 adsorption were evaluated by comparing the phage pfu quantities to two controls: (1) the initial phage pfu qty used for each sample, prepared in LB broth, and (2) the qty of free phage remaining after initial adsorption on *Klebsiella* sp. KV-3 not treated with any protein. The data were expressed as percentages of the mean values with calculated $\pm\text{SD}$ from six experimental replicates. A two-tailed Student's t-test for independent samples was performed to determine the significance of the indirect effect.

Western Blot

Western blot analysis was performed to assess the reactivity of antisera against RaK2 recombinant proteins. Protein and RaK2 samples were subjected to SDS-PAGE, followed by transfer from the PAA gel onto a PVDF or nitrocellulose membrane (Thermo Fisher Scientific) using a wet Western blot method, according to the manufacturer's guidelines. Transfer parameters were 80 mA for 15 h or 400 mA for 3 h.

The membrane was blocked for 45–60 min at $20 \pm 3^\circ\text{C}$ using a blocking mixture of 3% BSA or 1% milk powder and then incubated with the corresponding extracted antiserum (diluted 100–5,000-fold in the blocking mixture) for 1.5–2 h at $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Afterwards, the membrane was washed 4×3 –5 min, each time with PBST, followed by a 45–60-min treatment with secondary antibodies (conjugated with peroxidase or a fluorophore). After another round of washing with PBS, protein-antibody interactions²¹⁶ were detected using either the DAB substrate hydrolysis reaction or a laser scanner (Odyssey 9120, Li-Cor), with fluorescence measured after excitation with a 700-nm wavelength laser.

Immunogold labelling of RaK2 and TEM

The antiserum, diluted 35–100 times in the grid preparation solution, was mixed (1:1, v/v) and incubated with a purified phage suspension ($\approx 10^{10}$ pfu/mL). A nickel-copper TEM grid (Agar Scientific) was then carefully placed on the antiserum-treated RaK2 suspension within a well of a silicone pad (Agar Scientific) and incubated for 15–25 min at 37°C . Subsequently, the grid was washed several times and incubated again solely with gold particle-conjugated antibodies diluted 30–100 times. After a final round of washing, the sampled grids were stained with a 2% uranyl acetate solution, and the dried grids were examined using a transmission electron microscope (Morgagni 268D) at magnifications of 140,000–180,000.

The TEM analysis was carried out at the Institute of Biotechnology, Department of Eukaryotic Gene Engineering, under the guidance of Dr. Justas Lazutka and Dr. Aliona Avižieninė. Higher-resolution micrographs were captured by Dr. Martynas Skapas using Tecnai G2 F20 X-TWIN at Physical Sciences and Technology center.

AFM analysis of RaK2

A homogeneous surface layer containing a mica plate (grade IV, SPI Supplies, Inc.) was treated with a 0.01% poly-L-lysine solution for 30 min at $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Then, 10 μL of a CsCl-gradient purified RaK2 suspension (1.6×10^{10} pfu/mL), prepared in a 0.02 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl solution (pH 8.1), was applied to the surface. After a 2-min incubation, the sample was rinsed with Milli-Q water ($18.2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$), dried under a stream of N_2 gas, and analysed using an atomic force microscope (Dimension Icon AFM, Bruker) in constant

amplitude tapping mode in air, using cantilevers equipped with probes (TESPA, Bruker). The nominal spring constant of the cantilevers ranged from 2–40 N/m. The acquired images were analysed using *Nanoscope Analysis* software, v.1.9. Dr. Marija Jankunec performed the AFM analysis at the Department of Bioelectrochemistry and Biospectroscopy (Institute of Biochemistry).

Depolymerase activity identification using spot test

The cultured *Klebsiella* sp. KV-3 bacteria (OD₆₀₀ of 0.3–0.5 at 37°C and 180 rpm) were mixed with 2.5 mL of 0.5% LB agar and plated on a Petri dish containing 1.2% LB agar. After allowing it to solidify for 5–15 min at 20 ±3°C, serial dilutions of the recombinant protein and phage, prepared in LB broth, were spotted as 4-μL droplets onto the surface of the bacterial lawn. Once the spots dried, the plates were incubated at 30°C for 16–24 h. The resulting transparent spots, a.k.a. lysis zones, that appear on the bacterial lawn were then evaluated. To test protein stability, samples were heated at 46–66°C for 15 min before spot-testing.

Depolymerase substrate screening

To assess the enzymatic specificity of gp531 for different substrates, various commercial compounds were utilised, including 4-nitrophenyl and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl derivatives, as well as oligo- and polysaccharides. Chromogenic compounds were tested in a 50 mM Tris buffer solution (pH 8) containing 1 μg of gp531 at 30°C for 1–2 h, and the products were analysed at 405 or 615 nm using a spectrophotometer. Oligo- and polysaccharides were tested in a 20 mM sodium phosphate buffer solution (pH 6) containing 3 μg of gp531 at 37°C for 16–18 h and the products were analysed by TLC.

The depolymerase activity of gp531 was analysed using isolated polysaccharide from *Klebsiella* sp. KV-3 bacteria as a substrate. The enzymatic reaction was carried out at 30°C for 0.5–20 h in a buffer solution (pH 6) containing 0.15–12 mg of isolated polysaccharide and 0.3–25 μg of gp531. The enzyme was subsequently inactivated by adding ACN at a 1:1 ratio (v/v), and the liquid fractions collected (8 min, 12,000×g) were analysed via TLC and HPLC-MS assays.

Thin-layer chromatography (TLC)

TLC analysis for saccharides was run using a silica gel covered plate (60 F254, Merck; 40±1 mm) for 20 min. Different mobile phases were employed based on the compound properties, for:

- ⊗ polysaccharide hydrolysis products, 1-proOH: EtOAc: H₂O, 6:1:3;
- ⊗ ANTS-/ di-/ monosaccharides, 1-butOH: EtOH: H₂O, 5:3:2.

The TLC plates containing non-modified carbohydrates were developed by staining with a 1% anise dye solution and heating, while ANTS-derivatised carbohydrates were analysed under a 365-nm light (UV-8 M/L, Herolab).

Polysaccharide isolation and digestion

The overnight culture of *Klebsiella* sp. KV-3 was inoculated into a ten-fold higher volume of LB broth and incubated without agitation at 37°C for 9–11 days to allow bacterial growth. Polysaccharide extraction was performed following a method previously described with minor adjustments^{217,218}. The isolated polysaccharide was then lyophilised to obtain a cotton-like substance.

The polysaccharide digestion reaction was carried out in a 20 mM sodium phosphate solution, pH 6, with 0.15–12 mg of isolated polysaccharide and 3–25 µg of gp531, at 30°C for 0.5–20 h. The reaction mixture was then stopped by diluting the samples with ACN to 50%, and the insoluble precipitates were removed after centrifugation (8 min at 12,000×g).

The supernatants were either used for saccharide modification reactions or analysed using TLC and HPLC-MS to determine the produced compounds. For the hydrolysis of wild-type (wt) polysaccharides, a washed and prepared KV-3 *Klebsiella* sp. bacterial biomass, harvested after 2 h, 2 days, and 11 days of cultivation, was used. A detailed description of the reaction procedure is provided in the section titled *RaK2 adsorption inhibition*.

Saccharide HPLC-MS analysis

Polysaccharide hydrolysis samples, commercial mono- and disaccharides, and their chemically modified (reduced, derivatised) compounds were analysed using the HPLC-MS system. The system was equipped with a photodiode array detector and a mass spectrometer (LCMS-2020; Shimadzu, Japan) with an electrospray ionisation source.

Chromatographic separation was conducted using a *YMC-Pack Pro C18* column (3×150; Pack Pro C18, YMC) at 40°C, with a mobile phase consisting of either a 0.1% formic acid or a 10 mM ammonium carbonate water solution (solvent A) mixed with ACN (solvent B). Elution was performed in a 5–95% gradient mode over a total of 12 min.

Mass spectra were measured in the 250–2000 *m/z* range, with interface and desolvation line temperatures of 350°C and 250°C, respectively, using an interface voltage of ±4500 V and N₂ as the nebulising and drying gas. Mass spectrometry data were acquired in both positive and negative ionisation modes and analysed using *LabSolutions* mass spectrometry software.

Saccharide reducing end modification with NaBH₄ or ANTS

Oligosaccharides obtained from 0.6 mg of polysaccharide hydrolysis were reduced within 200 µL of 0.15 M NaBH₄ (in 2.5 mM KOH) at 20 ±3°C for 16 h.

The reduction reaction was quenched by the addition of 2 M acetic acid (15% of the sample volume). L-fucopyranose (L-Fucp), D-glucopyranose (D-Glcp), D-glucopyranuronic acid (D-GlcpA), and D-cellobiose (D-Cell) were reduced using a three-fold molar vol of NaBH₄ and used as controls. Finally, all samples were dried in a vacuum concentrator (Speedvac SPD2010, Thermo Savant), reconstituted in water, and analysed using TLC and HPLC-MS assays.

Oligosaccharides obtained from 12 mg of polysaccharide hydrolysis were derivatised for 24 h at 37°C with 0.2 M ANTS (in 2.62 M acetic acid) in combination with 1 M NaCNBH₃ (in DMSO) in a 1:1 ratio (v/v), using a total vol of 250 µL. To serve as controls, L-Fucp, D-Glcp, D-GlcpA, and D-Cell were also derivatised using a molar ratio of 6:5:25 (saccharide: ANTS: NaCNBH₃). Afterwards, the samples were dried and reconstituted in water.

The ANTS-derivatised tetrasaccharide was primarily purified using a 1-mL *Hitrap* ion-exchange column DEAE FF (GE Healthcare, Sweden) with appropriate solutions A and B, while detecting absorption at 365 nm. ANTS-free fractions were confirmed via TLC assay and pooled. Secondary purification was carried out to remove excess salts through a column (10×370) manually loaded with 30 mL of *Sephadex SG-10* resin (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden). Low-salt-containing and pure fractions were used in further experiments.

Saccharide hydrolysis with TFA

To identify the reducing end sugar residue of the polysaccharide hydrolysis products generated during the gp531-catalysed reaction, both these products and the compounds formed during their reactions with NaBH₄ or ANTS, as well as ANTS-cellobiose, were hydrolysed with 4.0 M TFA acid at 90°C for 10–180 min. After hydrolysis, the acid was evaporated using a vacuum concentrator, and the resulting compounds were reconstituted in water and evaluated using TLC and HPLC-MS assays.

Relative activity of gp531 under different conditions

To investigate the optimum pH and temperature for gp531 activity on the isolated *Klebsiella* KV-3 polysaccharide, enzymatic reactions were conducted at 10–70°C and pH 3–10. The relative enzymatic activity was calculated, based on the HPLC-MS data from the four experimental replicates. For calculations, the intensity areas were integrated and expressed as the mean percentage with ±SD of the signals at 663⁺ and 687⁺ *m/z*, corresponding to the main polysaccharide hydrolysis product, tetrasaccharide, within the HPLC retention time of 2–4 min. Control values were subtracted from the measurements to obtain accurate results.

The reactions were performed for 90 min and consisted of 45 µg of polysaccharide and 0.3 µg of gp531 in a 20 mM sodium phosphate solution at

pH 6.0 to determine the influence of temperature on gp531 activity. A reaction with inactivated enzyme at 20°C was included as a control.

In a similar fashion, pH-based reactions were performed at 20°C for 16 h in 50 mM buffer solutions of citrate at pH 3–6, Tris at pH 7–9, and sodium borate at pH 10, containing 75 µg of polysaccharide and 1 µg of gp531, with a negative control (reaction mixture without gp531 at pH 3).

Finally, the enzyme in each sample was inactivated with ACN, and the fractions without sediments were collected (8 min, 12,000×g, 20°C) and subjected to TLC and HPLC-MS analyses.

RESULTS

Bioinformatic analysis of RaK2 proteins

Scientific literature describes that tailspikes and fibres in the adsorption complex of phages typically form homotrimeric structures. Therefore mono- and trimeric structures of the RaK2 proteins gp098, gp526–534 and gp098, gp526–534 were modelled using the *AlphaFold2* tool. Structural homologs were identified in the PDB database using the *Dali* tool, and the sequences were analysed using *Hhpred*.

The previous RaK2 study¹⁰⁰ suggest that its adsorption complex is formed from at least ten proteins (gp098 and gp526–534). Therefore, modelling was performed to identify the structural elements of these proteins that are important for forming the long branched fibres and to assess their biological functions. To provide a clearer description of the models and to focus on key points, the generated models were grouped into three categories based on the structural domains of the proteins and their overall similarity to TSP proteins. The reliability of the models was also assessed using the pLDDT scale, which indicated that the least reliable regions are found in the gp098, gp528, and gp534 proteins. The modeled domains, in terms of their similarity to typical TSPs, consist of two main regions: the 'head', which contains N-terminal domains (NTDs) typically formed by β -sheets, and the 'body', which usually includes a central domain (CD) responsible for enzymatic activity and composed of a neatly arranged trio of β -helices, as well as C-terminal domains (CTDs) at the end. These two protein regions are typically separated by a distinct 'neck' structure characterised by a triple α -helix motif.

Thus, the modelled structures were grouped according to their overall similarity to TSP proteins (**Fig. 2**): A₁ – similar to TSPs and having a short 'neck' motif (gp527 and gp529); A₂ – similar to the A₁ group, though containing additional CTDs that are not typical to TSPs (gp530); B₁ – similar to TSPs and containing a pronounced 'neck' motif and a 'head' structure composed of more than two CTDs (gp532 and gp533); B₂ – similar to B₁ and containing a highly pronounced 'neck' motif, with the 'head' structure at the N-terminus consisting of

four or more NTDs (gp528 and gp531); C – low similarity to TSPs and generally distinguished by unique protein structures (gp098, gp526, and gp534).

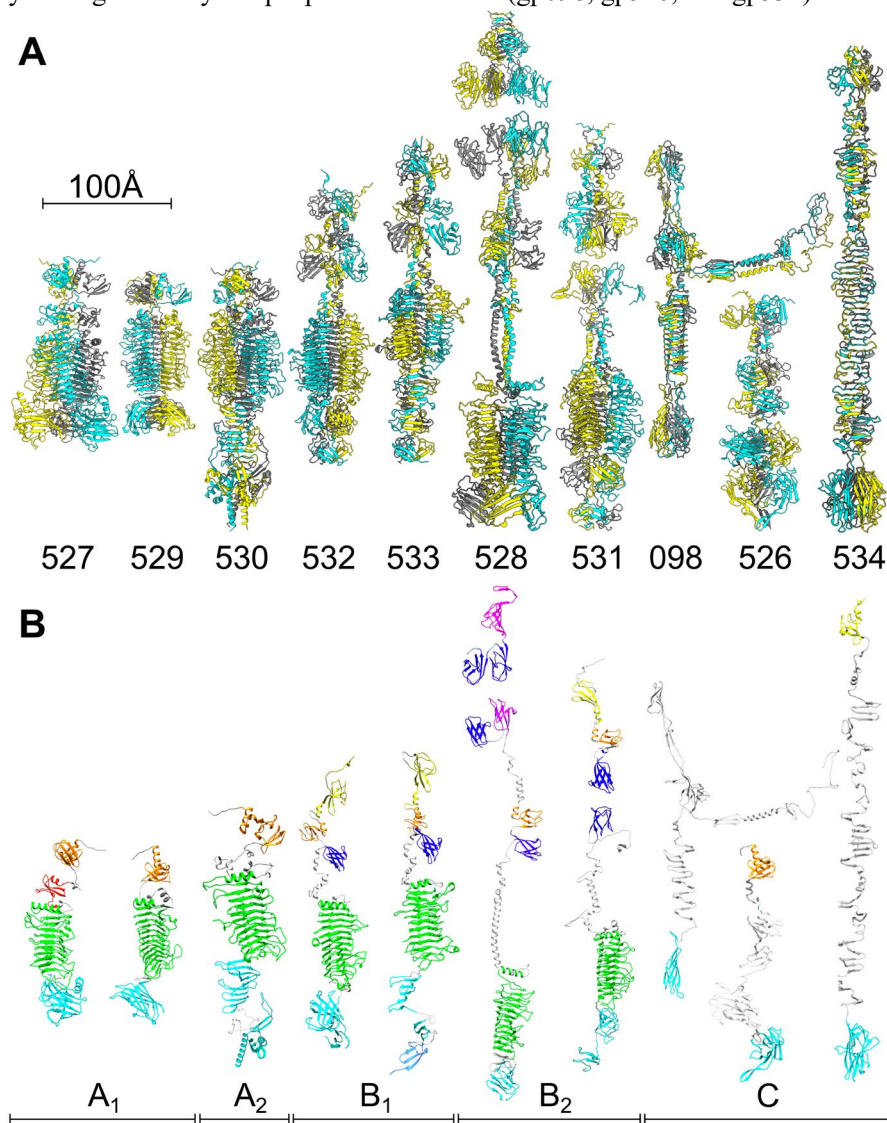


Figure 2. Bioinformatic analysis of RaK2 proteins: *AlphaFold2* trimeric protein models (A) and protein monomers with highlighted homologous structural motifs identified using *Hhpred* and *Dali* (B). The colours indicate: (A) **red, green, and blue** – individual polypeptides; (B) **pink** – the anchor domain involved in binding the fibre to the baseplate; **blue and purple** – the XD2 and XD3 domains homologous to the D2 and D3 of the T4 of gp10; **orange, yellow, and red** – the D1, D2, and D3' homologous to the N-terminal domains of CBA120; **green** – regions composed of β -helices that may contain a depolymerase activity; **cyan and light blue** – C-terminal domains; **grey** – interdomain loops or regions homologous to other proteins of the phage origin. Structural groups: A₁ – similar to typical TSPs; A₂ – similar to A₁ proteins with an endochaperone at the C-terminus; B – typical TSPs with protein-binding domains (B₁₋₂), including those

with elongated triple α -helix bundles (B₂); and C – dissimilar to TSPs or are structurally unique proteins.

The structures of the group A modelled proteins are most similar to typical TSPs. Gp529 and gp530 each contain one, while gp527 contains two NTDs, all of which are composed of a triple β -sheet sandwich and are homologous to specific D domains of CBA120 TSP1,4 and TSP1,2 proteins, respectively^{21,166,219,220}. All of these proteins have a modelled CD, a depolymerase region consisting of a triple β -helix, though the structural homology varies. Interestingly, gp530 has two CTDs, the first of which forms a triangular prism from individual polypeptides. The second, CTD2, is homologous to the C-terminal intramolecular chaperone domain (endochaperone) of the T5 L-shaped fiber pb1, which promotes protein folding and is, thereafter, autocleaved. The C-terminal-less protein is known to bind to oligomannose²²¹. Interestingly, the CTD of gp529 is also homologous to the C-terminal portion of the T4 gp9 protein, which is responsible for binding to the long T4 tail of gp34²²². Meanwhile, the structures of the gp527 CD and CTD are similar to the C-terminal domain of CBA120 TSP4²¹.

The group B₁ proteins (gp532 and gp533) are distinguished from group A proteins by the presence of two additional NTD and CTD domains, as well as a distinct triple α -helix motif that clearly separates the 'head' structure. In contrast, the group B₂ proteins, gp528 and gp531, have an even higher number of NTDs (up to 5) within the 'head', accompanied by even more pronounced α -helix motif. In the case of gp528, this motif is separated by two trimeric antiparallel β -barrel structures connected by a triple loop. For the gp531, gp532, and gp533 proteins, two homologous domains of CBA120 TSP1–3 D1 and D2, composed of triple β -sandwich structures and responsible for protein-protein interactions, were identified. NTD domains homologous to CBA120 TSP4 XD2,3 (which also show homology to T4 gp10 D2,3), formed by triple β -sandwich structures and binding to D domains, were identified: one for each gp532 and gp533, two for gp531, and five for gp528^{21,166,219,220}. A CD depolymerase region, mostly homologous to phi29 gp12, has also been identified for all B group proteins²²³. Two CTDs have been identified for the gp531 and gp532 proteins; the first is formed by a triple β -sandwich structure and is homologous to the T4 gp9 intermediate region, which is flanked by two protein-protein interaction domains²²². Meanwhile, gp533 CTD1 forms a triangular β -prism homologous to P22 gp9⁶⁵, although *Hhpred* analysis has shown homology of gp533 CTD1,2,3 to the C-terminus of CBA120 TSP2¹⁶⁶. Low model reliability was found in gp528, specifically in the CTD with structural homology to the *Clostridium histolyticum* collagenase protein, likely indicating that the gp528 CTD promotes phage adsorption on the bacterium²²⁴. An unusual structural homology to a tyrosine phosphatase protein is observed in gp532 CTD2²²⁵. The remaining CTDs of the

gp531 and gp533 proteins are structurally homologous to tail spike proteins such as CBA120 TSP2,3^{166,220} and phi92 gp150^(unpublished).

Group C proteins gp098, gp526, and gp534 have the most unique structures and are the least similar to typical TSPs, as they lack a depolymerase region CD and share structural homology primarily with bacterial proteins. Only the NTDs identified in gp526 and gp534 are structurally homologous to the D1 and D2 of CBA120 TSPs, respectively. *AlphaFold2* modelling of gp534 generated a trimeric stem-like structure, with a CTD that is structurally homologous to human ectodysplasin and exhibits receptor-binding capability²²⁶. The 'body' of gp526 comprises two triangular²²⁷ and two β -sandwich domains. The first of latter two is structurally homologous to the C-terminus of a glycan biofilm-modifying enzyme WceF²²⁸ (*Pantoea stewartii*), while the second – to the TSP of phage phiAB6²²⁹ (*Acinetobacter baumannii*). A low-reliability model was generated for the gp098 protein, probably due to its unique amino acid sequence, as no similar structures have been identified yet. However, a model with higher reliability was obtained for the gp098 C-terminus, which consists of five antiparallel β -sheets with a parallel β -helix motif and a β -subunit domain, showing structural homology to the R2 pyocin fibre (*Pseudomonas aeruginosa*), which possesses RBP properties²³⁰.

Thus, all generated models of RaK2 proteins demonstrate individual structural uniqueness, with either partial or only just complete domain homology to established structures found in the PDB database.

Since the C-terminus of gp530 shows structural homology to endochaperone, which is typically proteolytically cleaved, thus the 650–779 amino acid region of gp530 was analysed using the *MAFFT* bioinformatic tool in comparison with other proteins, including GA1 gp12, Φ K1-5 gp46, K1E endoNE, Φ 63D endoN, T5 pb1, 29 gp12, PZA gp12, B103 gp12, and K5 KlfA²³¹. A protease cleavage site was identified in the first conserved region of the endochaperone of gp530, within the sequence VSDENYK, between the serine and aspartate residues, suggesting that this domain is likely to be cleaved off.

Induction and purification of the RaK2 proteins

To investigate protein composition and activity of the long tail fibres with the adsorption complex, RaK2 genes encoding the gp098 and gp526–532 were cloned. Amplicons of the RaK2 corresponding genes were amplified by PCR with the primer pairs (**Table 1**) and inserted into the gene expression vectors pET16b and pET28b to generate recombinant proteins tagged with His $\times$ 10 and His $\times$ 6 oligopeptides at the N-termini, respectively. The notion was based on the understanding that the C-termini of phage tailspikes contain domains that promote proper folding and oligomerisation of the protein. The modification at the N-terminus is expected to have a less significant impact on the structural and functional characteristics of the protein^{169,183,232}.

To produce a substantial amount of soluble recombinant protein, their induction was carried out under various conditions: using different *Escherichia coli* DE-3 gene expression strains such as HMS174, Rosetta, Arctic Express, and ER2566; implementing induction temperatures within the range of 17–30°C; and introducing 0.5–1.0 mM concentrations of the IPTG inducer, with the induction period extending over 16–21 h. Unfortunately, only the gp526 and gp531–533 recombinant proteins were synthesised soluble when induction was carried out in *E. coli* Rosetta DE3 or HMS174 DE3 (only gp532) strains with 0.5–1.0 mM IPTG at 17–30°C for about 17–21 hours.

To improve the solubility of gp098, gp527, gp528, gp530, and gp534, their recombinant proteins were designed to contain a partial amino acid sequence corresponding to either the N or C-terminus of the polypeptide. Among the five proteins, only gp098C (His6::pΔ1–228) and gp528N (His10::pΔ373–1113) were synthesised in a soluble form during induction in the Rosetta DE3 (gp098C) and HMS174 DE3 (gp528N) strains, respectively, using 0.8–1.0 mM IPTG at 20–25°C for about 18 h.

The remaining truncated proteins, gp527C (His6::pΔ1–538), gp530C (His6::pΔ1–537), and gp534C (His6::pΔ1–441), were produced in an insoluble form. Therefore, they were solubilised and purified under denaturing conditions using 6M carbamide-supplemented solutions A1c and B2c. Despite successful purification, these proteins exhibited aggregation upon renaturation during dialysis in a solution without the chaotropic compound.

SDS-PAGE analysis revealed the presence of an additional protein with a molecular mass (≈ 13 kDa), corresponding to half the size of gp530C (**Fig. 3**).

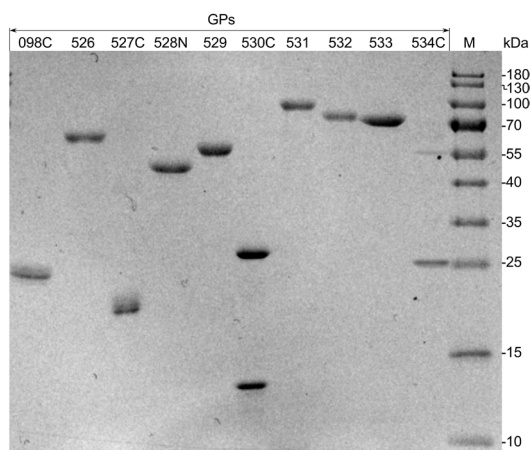


Figure 3. SDS-PAGE analysis of the RaK2 purified recombinant proteins (1–5 μ g) in a 14% PAA resolving gel. A protein molecular weight marker, M (#26616). GP – gene product.

That is likely due to the endochaperone characteristic of gp530, which contains a protease cleavage site, allowing the production of two proteins of equal molecular mass (≈ 14.6 kDa) during proteolytic digestion. As a result, the portion of gp530C containing a His-Tag is observed on the PAA gel after protein

purification. Finally, the purified recombinant proteins were used as antigens for rabbit immunisation to raise the corresponding antisera.

Western blot analysis of RaK2 proteins

Isolated antisera against recombinant proteins (gp098C, gp526, gp527C, gp528N, gp529, gp530C, gp531–533, and gp531C) were used in Western blot analysis to confirm their reactivity against RaK2 proteins. The blotting results (**Fig. 4**) indicated that all obtained antisera were reactive against their respective antigens a.k.a. recombinant proteins. However, appropriate antisera reactivity was not observed in the RaK2 virion (phage suspension) only for gp527, gp530, and gp530, whose recombinant counterparts were purified under denaturing conditions, suggesting that protein aggregation after renaturation negatively influences the raised antiserum reactivity.

Notably, anti-gp534C interacted with the ≈ 150 kDa protein present in RaK2, likely corresponding to a partially denatured gp534 dimer (142 kDa), as interaction with a protein of double the molecular mass of gp534C was observed as well in the antigen sample. In addition, cross-reactivity between gp531 and gp532 with anti-gp532/531 was observed, probably attributed to the high homology within the 17–322 amino acid sequence region between these proteins (1–330:5–322 aa regions, 41% identity, according to *Blastp* analysis).

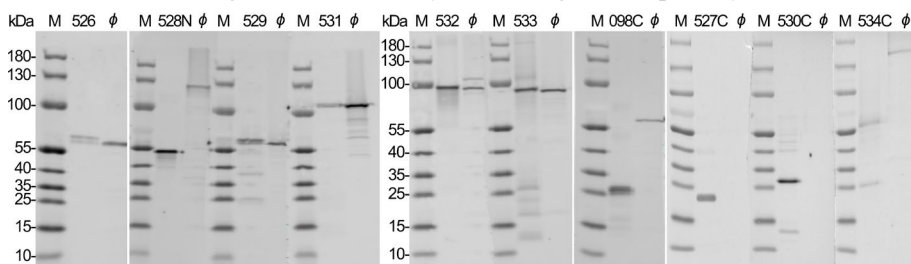


Figure 4. Western blot analysis of RaK2 structural proteins. Recombinant proteins gp526, gp528N, gp529, gp531–533, gp098C, gp527C, gp530C, and gp534C (4–1130 ng) were used as positive control samples, whereas ϕ – RaK2 purified suspension ($1.5\text{--}19.1 \times 10^8$ pfu). M – a protein molecular weight marker (#26616). SDS-PAGE was conducted using 4% stacking and 4–18% gradient resolving PAA gels.

Isolated and reactive antisera were used to study the biosynthesis of RaK2 proteins. The biosynthesis process was examined through Western blot analysis of samples collected at 10-min increments after infecting KV-3 bacteria with RaK2. The blotting results revealed that RaK2 protein biosynthesis had already been observed at 30–40 min from the onset of infection, indicating the characteristics of the structural proteins transcribed from late-stage gene promoters, as early-stage promoters are active at the initial minutes of viral infection.

RaK2 infection and adsorption inhibition

Isolated polyclonal antisera were used to identify crucial proteins associated with the infection of KV-3 bacteria by RaK2. Consequently, blocking these proteins is expected to reduce the infectious bacteriophage amount significantly. Inhibition analysis demonstrated that gp098 and gp531 of RaK2 are crucial for the successful infection of *Klebsiella* sp. KV-3 (**Fig. 5**). The observed phage inhibition was greater than 400,000-fold. In addition, a significant and lower decrease in RaK2 amount was observed during RaK2 treatment with antisera raised against gp532 ($p \approx 0.00016$) and gp533 ($p \approx 0.017$), which could be due to the cross-activity of antiserum or nonspecific inhibition of RaK2.

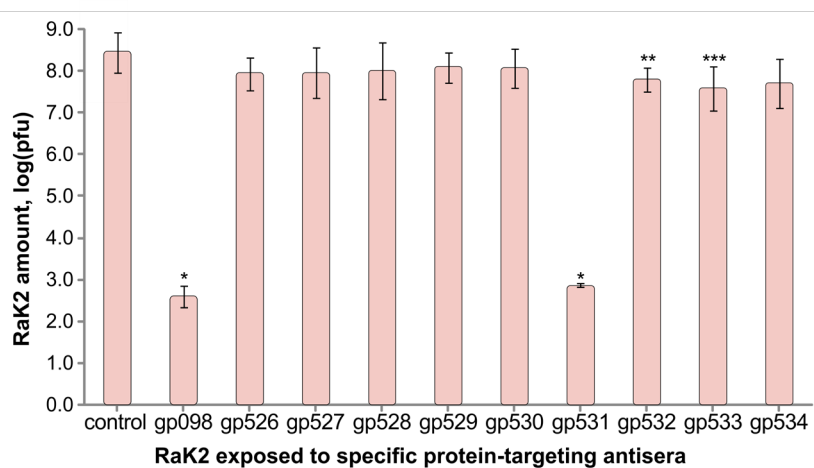


Figure 5. Inhibition of RaK2 infection with antisera isolated against specific recombinant proteins. Data are presented as mean values of phage amount with $\pm$ SD ($n=4$) in logarithmic scale. The significance of infection inhibition was assessed using Student's t-test, with comparisons made between the control and each treatment: *, $p < 1 \times 10^{-11}$; **, $p \approx 0.00016$; ***, $p \approx 0.017$.

Having established that blocking gp531 and gp098 located in the virion significantly inhibits RaK2 infection, a study on phage adsorption inhibition was conducted to verify the ability of these proteins to initiate phage attachment to the bacterial surface (**Fig. 6**).

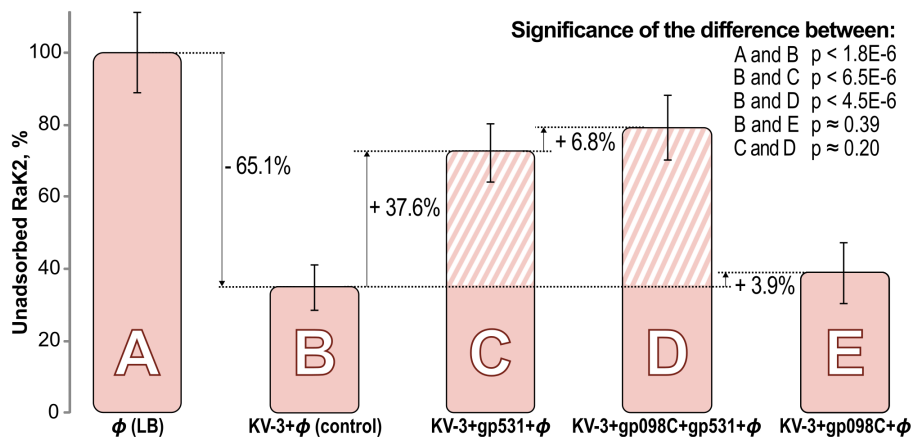


Figure 6. The indirect effect of recombinant gp098C and gp531 proteins on RaK2 adsorption. Arrows with associated values indicate the percentage changes in the amount of free bacteriophage; ϕ is a purified RaK2 suspension ($1.2 \times 10^6 \pm 11\%$ pfu). Data are expressed as mean values with $\pm$ SD ($n=6$), and the significance of the effect (the dashed area) was verified using Student's t-test.

Hence, *Klebsiella* sp. KV-3 bacteria were separately treated with gp098C, gp531, and both proteins, followed by incubation with an equal pfu qty of phage RaK2. To assess the indirect effect of the recombinant proteins on RaK2 adsorption, the quantities of unadsorbed infective phage were determined by titration and compared with the initial pfu qty and the control.

Theoretically, suppose a specific protein is crucial for the initial phage binding (adsorption) to the bacterium, then treating the bacteria with this protein should lower the likelihood of phage adsorption, leading to the increase in the pfu qty of free phage.

Under the conditions of the study, typically 65% of the bacteriophage was adsorbed onto *Klebsiella* sp. KV-3 bacteria (**Fig. 6**). However, after treating the bacteria with recombinant gp531, there was about a twofold increase (+38%) in the pfu qty of free phage compared to the control, indicating that gp531 is involved in the initial contact with the bacterium. Although a small increase was also observed when the bacteria were exposed to the gp098C protein alone and in combination with gp531, the changes associated with gp098C were not statistically significant ($p \geq 0.2$) in either case.

RaK2 labelling with gold and microscopic analyses

To determine the location of gp098 and gp526–534 within the RaK2 virion structure, immunological labelling with gold nanoparticles and TEM analysis were conducted. All investigated proteins were labelled in the area of the RaK2 adsorption complex. However, only gp526–534 were found to be located in the area of the branched long tail fibres of the adsorption complex, whereas gp098 was usually labelled on virions with contracted tails at varying distances of 8–46

nm (n=44) from the end of the phage tail tube, suggesting that gp098 does not assemble into branched LTF.

Immunogold labelling with gold nanoparticles of other RaK2 proteins revealed more approximate tendencies than direct locations, which can be summarised based on the position of the branched long tail fibre (Fig. 7). Quite accurate locations of gp528 and gp534 were identified in the proximal and terminal regions, respectively, with gp534 positioned at 82 ± 8.1 nm (n=32) from the baseplate centre. Proteins gp526, gp527, and gp532 were located in the medial area of the LTFs, whereas gp530 and gp531 were found to be in the distal region. Unfortunately, the locations of gp529 and gp533 were undefined, yet showing a lesser labelling tendency in the proximal region.

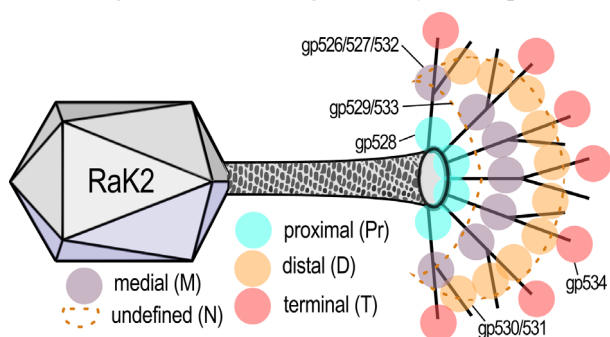


Figure 7. Summary of RaK2 immunogold labelling using antisera against proteins gp526–534. Proteins are located at proximal, medial, distal, terminal, and undefined regions of branched LTFs.

The RaK2 immunogold labelling assay revealed that gp534 is likely positioned at the tips of the LTFs. Hence, AFM analysis of RaK2 was conducted to perform a detailed examination. Initially, the analysis revealed that the branched LTFs exhibit a bent conformation, with the tips ending in a protruding tubular structure (Fig. 8).

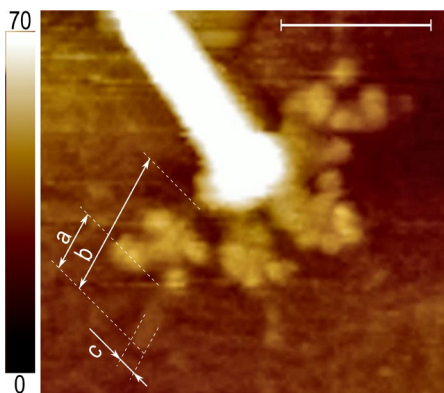


Figure 8. AFM image of the RaK2 adsorption complex with branched long tail fibres, with measured structures: (a) 32 ± 5.1 nm (n=68), a protruding structure; (b) 75 ± 6.5 nm (n=32), the full length of the branched fibre; (c) 2 ± 0.3 nm (n=8) the width of the protruding structure. The white bar represents a 50-nm scale. The brown colour gradient scale reflects the z-axis, indicating the structure's height range of 0–70 nm.

Upon closer inspection, the measured length of the branched tail fibre (≈ 75 nm; n=32) closely aligns with the distance (≈ 82 nm; n=32) determined using the immunogold labelling assay with TEM. Moreover, the dimensions of the protruding structure observed in the AFM image (Fig. 8) are comparable to

acetylated form (MS signals observed at 705 and 1393 m/z), undergoing gradual deacetylation as indicated by analysis (**Fig. 10 C**). After a 2-day incubation, the MS signal of monoacetylated octasaccharide is observed at 1351 m/z , while a complete deacetylation takes place after 11 days (**Fig. 10 D**), with results comparable to those obtained with the isolated polysaccharide (**Fig. 10 A**).

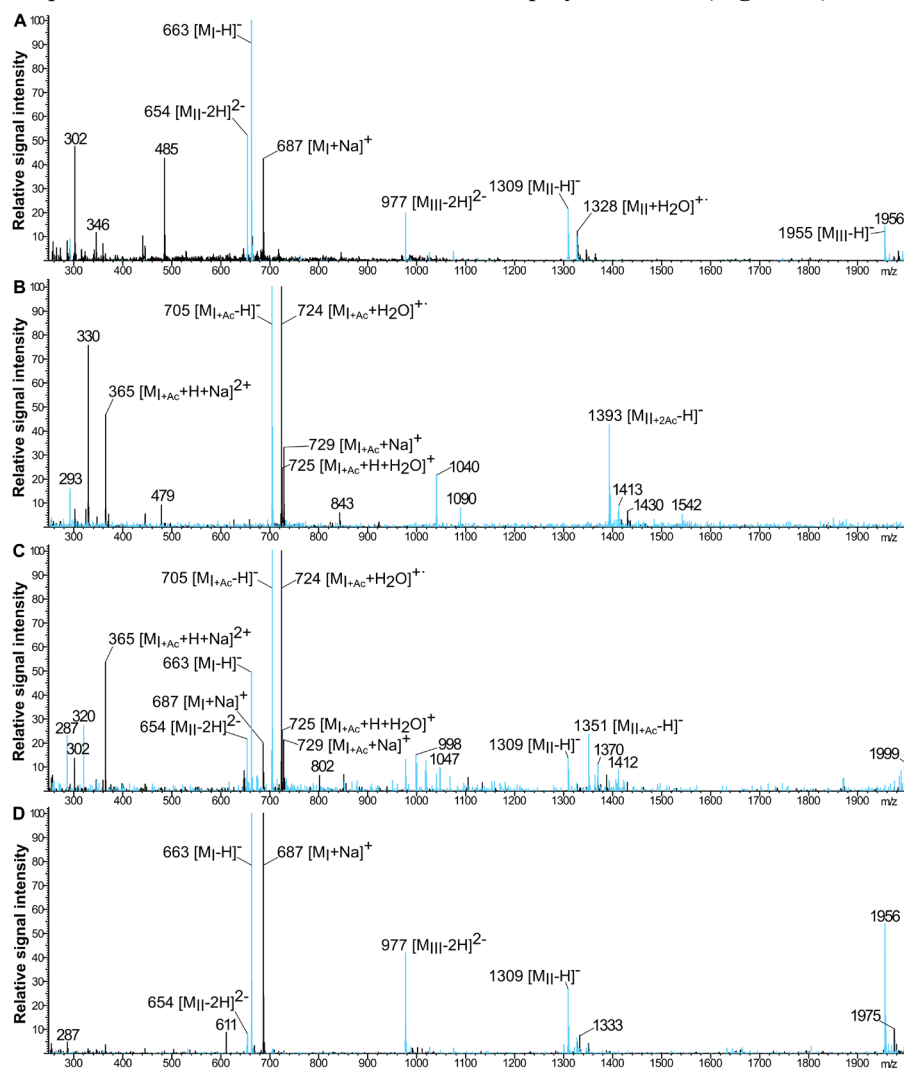


Figure 10. HPLC-MS mass spectra of gp531-catalysed hydrolysis products when the substrate was either an isolated polysaccharide (**A**) or KV-3 biomass, cultivated at 37°C for: 2 h at 190 rpm (**B**), 2 days (**C**), and 11 (**D**) days without agitation. Negative ionisation peaks are indicated in blue.

Therefore, the capsular polysaccharide of *Klebsiella* sp. isolate KV-3 corresponds to the structure of the *K. pneumoniae* K54 serotype, and its acetylated form does not inhibit the enzymatic activity of gp531, although deacetylation occurs under prolonged cultivation conditions.

RaK2 depolymerase characterisation

The full-length purified RaK2 proteins, including gp526, gp529, and gp531–533, underwent spot testing to assess their depolymerase activity on various *Klebsiella* spp. strains, namely *Klebsiella* sp. KV-3, *Klebsiella* sp. KV-1, *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705, and *K. pneumoniae* 279. Among the tested proteins, only gp531 demonstrated depolymerase activity (Fig. 11), and solely on *Klebsiella* KV-3.

Furthermore, heat-induced inactivation experiments were conducted on gp531 (Fig. 11), exposing the samples to temperatures of 46–66°C for 15 min. The results indicated a decrease in gp531 depolymerase activity following exposure to 57°C, while at 62°C, 0.1 µg of the protein was completely inactivated. Notably, a comparable thermal inactivation pattern was observed in the case of RaK2 infectivity.

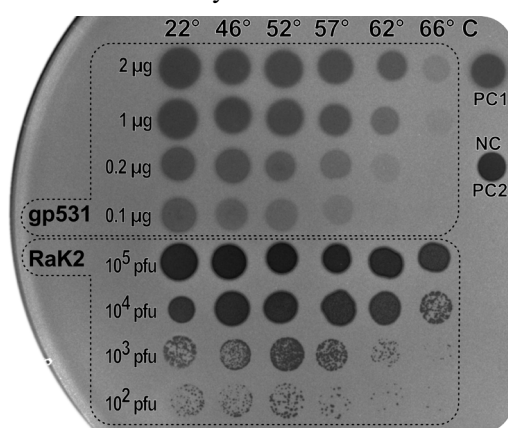


Figure 11. Depolymerase gp531 activity and stability analyses using a spot test on a *Klebsiella* sp. KV-3 bacterial lawn. 1st positive control (PC1), purified gp531 stock sample (4 µg); a negative control (NC), a sterile LB broth; 2nd positive control (PC2), RaK2 suspension (10⁶ pfu).

Since only gp531 exhibits depolymerase activity, manifesting as a glycosyl hydrolase based on *Klebsiella* KV-3 capsular polysaccharide assays, a follow-up study was conducted to investigate the glycosidic bond cleaved by gp531-catalysed hydrolysis. A total of 27 different chromogenic compounds and oligo/polysaccharides were tested in substrate screening. Unfortunately, none of them underwent hydrolysis in the presence of gp531.

The extracted *Klebsiella* KV-3 polysaccharide was used as a substrate to further investigate the enzymatic specificity of gp531. The gp531 hydrolase acts on the K54 polysaccharide and produces a tetrasaccharide, which can be detected by TLC and HPLC-MS assays. The potential product contains three distinct glycosidic bonds and a reducing saccharide end (Fig. 12), which can be chemically modified to mark the cleaved bond and thus determine the enzymatic specificity. Therefore, two modification approaches were adopted, involving either reduction with NaBH₄ or derivatisation with ANTS. Modified products were purified and subjected to hydrolysis with 4 M TFA for 10–180 min at

90°C. The resulting hydrolysates were analysed using TLC and HPLC-MS assays and compared with their non-modified counterparts.

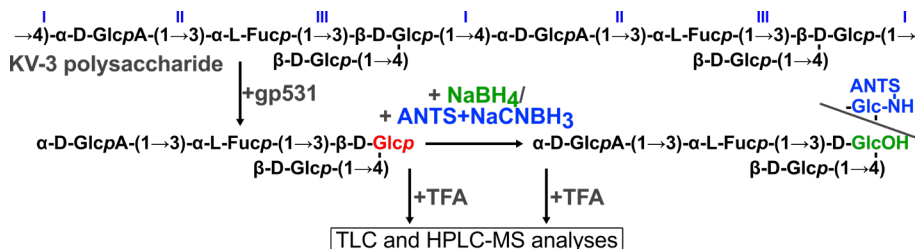


Figure 12. Schematic representation of enzymatic specificity determination: polysaccharide hydrolysis with gp531 produces a tetrasaccharide that is modified either with NaBH_4 or ANTS, followed by acid (TFA) hydrolysis, TLC and HPLC-MS analyses. The conversion of the glucose residue (red), depending on the modification reaction, results in either the reduced product sorbitol (green) or the ANTS derivative (blue).

The chemical modifications were also performed on commercial carbohydrates (L-fucose, D-glucose, D-glucuronic acid, and D-cellobiose) to be used as controls in TLC and HPLC-MS analyses.

TLC analysis of the non-reduced tetrasaccharide after partial hydrolysis with TFA revealed the formation of a disaccharide corresponding to D-cellobiose. This product was detected exclusively in non-reduced samples, whereas reduced samples contained only the compound equivalent to reduced cellobiose (**Fig. 13**). As hydrolysis with TFA progressed, the spots of both disaccharides gradually disappeared, while a glucose-like compound gradually appeared.

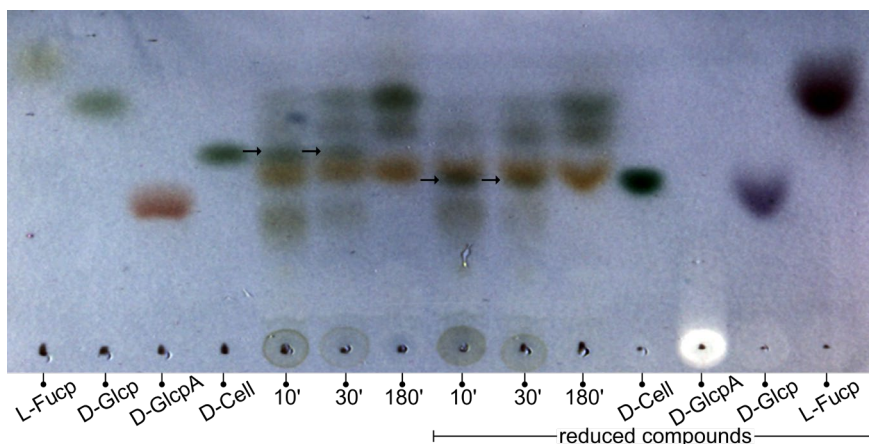


Figure 13. TLC analysis of non-reduced and reduced tetrasaccharide after 10–180 min of the hydrolysis with TFA, along with corresponding non- and reduced saccharides as controls. Arrows (→) indicate non-reduced and reduced cellobiose. The TLC mobile phase was 1-butOH: EtOH: dH_2O (5:3:2), 2×20 min.

Unfortunately, no reduced monosaccharide was observed after acidic hydrolysis, wherefore HPLC-MS analysis was performed (**Fig. 14**).

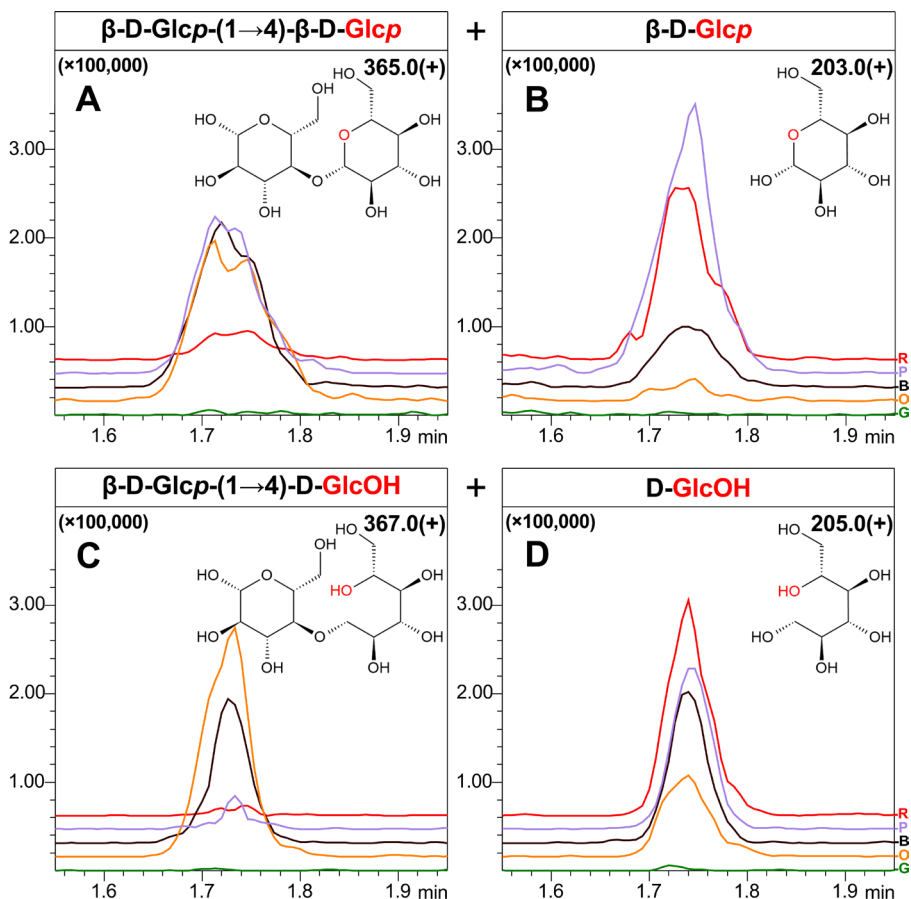


Figure 14. Comparison of the ion mass chromatograms of the compounds formed by hydrolysis with TFA of the non-reduced (A, B) and reduced (C, D) tetrasaccharides, based on HPLC-MS analysis. The chromatograms presented were empirically validated using measurements of the purchased and reduced saccharides: cellobiose $[M+Na]^+ = 365\text{ m/z}$ (A), reduced cellobiose $[M+Na]^+ = 367\text{ m/z}$ (C), glucose $[M+Na]^+ = 203\text{ m/z}$ (B), and reduced glucose $[M+Na]^+ = 205\text{ m/z}$ (D). The green, orange, black, violet, and red curves indicate samples taken before (G) and after 10 (O), 30 (B), 90 (V), and 180 min (R) of acidic hydrolysis, respectively. The HPLC-MS gradient was 0.1% HCOOH vs ACN.

The HPLC-MS analysis revealed that only during acidic hydrolysis, in samples before and after the reduction reaction, the signal intensities corresponding exclusively to non-reduced cellobiose at 365 m/z (Fig. 14 A) and the reduced form at 367 m/z (Fig. 14 C) gradually decreased. In contrast, the signal intensities for non-reduced and reduced glucose, corresponding to 203 m/z (Fig. 14 B) and 205 m/z (Fig. 14 D), gradually increased. Therefore, the HPLC-MS data confirm the TLC results, demonstrating that a product with a glucose residue at the reducing end of the saccharide is formed during the hydrolysis reaction catalysed by gp531.

Given the limitations of the analyses employed in the previous approach, which include challenges in detecting reduced monosaccharides through TLC, limited HPLC-MS detection of non-chromogenic compounds, poor carbohydrate ionisation, and a small 2-Da mass increase in the molecular mass of compounds formed during reduction, they likely contribute to a false-positive interpretation of the results. Therefore, ANTS derivatisation of the saccharide reducing end of the tetrasaccharide was conducted to confirm the site of glycosidic bond hydrolysed by gp531.

The ANTS-derivatised tetrasaccharide was purified using ion-exchange and gel filtration chromatography to remove excess ANTS and salts prior to hydrolysis with TFA. The TLC analysis revealed that the ANTS-tetrasaccharide was gradually hydrolysed over a 10–180-min period by TFA into three compounds, corresponding to the migration of ANTS derivatives, including: cellobiose (1), glucose (2), and fucose or potentially a free ANTS (3). To verify that compound (3) is not ANTS-fucose, but an ANTS-glucose degradation product, TFA-catalysed hydrolysis of ANTS-cellobiose was performed and the resulting products were compared with those yielded from the ANTS-tetrasaccharide hydrolysis. The analysis (**Fig. 15**) revealed comparable migration profiles between the hydrolysates of ANTS-derivatised cellobiose and tetrasaccharide. This demonstrates that ANTS-glucose is further degraded during hydrolysis with TFA into chromogenic compound and gp531-produced tetrasaccharide contains a reducing-end glucose residue.

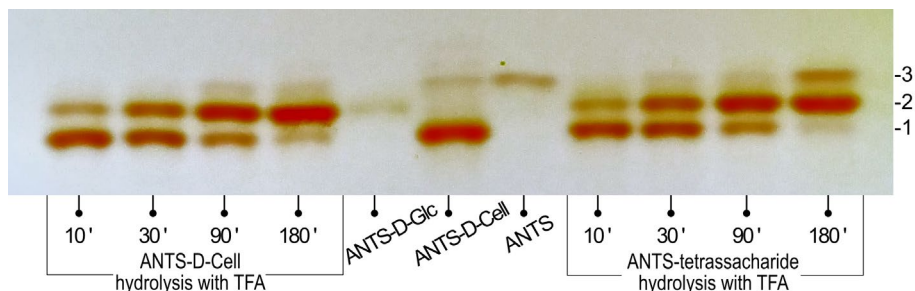


Figure 15. TLC analysis of ANTS-derivatised oligosaccharides, including D-cellobiose and gp531-produced tetrasaccharide, after 10–180 min of acidic hydrolysis. Compounds showing a migration pattern similar to ANTS-cellobiose (1), ANTS-glucose (2), and an ANTS-like molecule (3). The TLC mobile phase was 1-butanol: EtOH: dH₂O (5:3:2) with 2×20 min run time.

In addition, HPLC-MS analysis was conducted to determine the molecular mass of compound (3), using ANTS-derivatised L-Fucp, D-Glcp, D-GlcpA, and D-Cell as reference compounds. However, the only significantly intense signal detected (**Fig. 16**) was at 548 *m/z*, corresponding to ANTS-glucose. Furthermore, its signal intensity between 10 and 30–180 min decreases, indicating the degradation of ANTS-glucose and confirming that compound (3) is a byproduct.

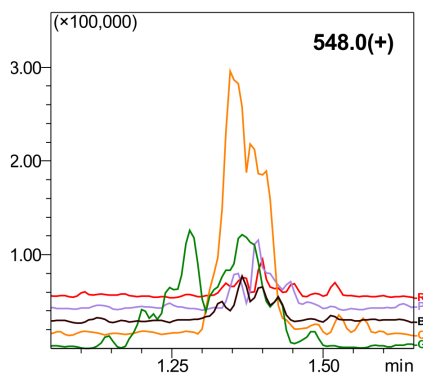


Figure 16. HPLC-MS chromatograms of ANTS-glucose $[M+H]^+=548$ after TFA-catalysed hydrolysis of ANTS-tetrasaccharide. The green, orange, black, purple, and red curves represent the signal intensities of the samples before (G) and after 10 (O), 30 (B), 90 (P), and 180 min (R) of hydrolysis, respectively. The HPLC-MS gradient was 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ vs ACN.

Given that gp531's enzymatic specificity was established, the extent of its activity was assessed by HPLC-MS assay under varying conditions of 10–70°C and pH of 3–10 (**Fig. 17**). The extracted polysaccharide from *Klebsiella* sp. KV-3 as a substrate was used in gp531-catalysed hydrolysis.

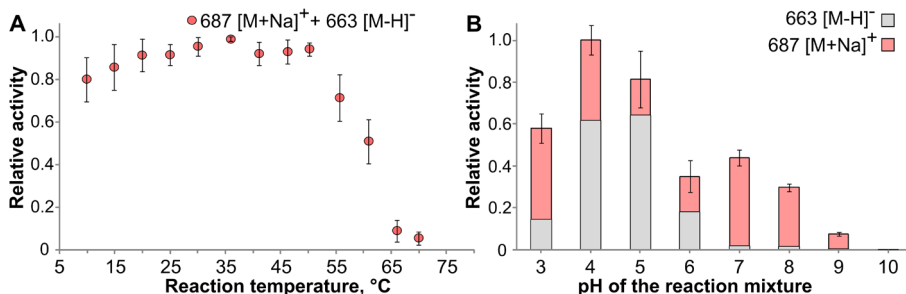


Figure 17. Relative gp531 activity dependence on temperature (A) and pH (B). The HPLC-MS data ($n=4$) are expressed as mean values $\pm$ SD, based on the total area of product-tetrasaccharide ion signal intensities for their molecular masses ($[M-H]^-=663$ and $[M+Na]^+=687$) within the 2–4 min retention time range.

The study revealed that gp531 maintains high enzymatic activity ($92 \pm 6\%$) within a range of 25–50°C, with an optimum at 36°C (**Fig. 17 A**). However, gp531-catalysed hydrolysis rapidly decreases in the 50–66°C range. In addition, gp531 exhibits higher activity under acidic conditions (pH 3–5), with the optimum at pH 4 (**Fig. 17 B**). Notably, enzymatic activity is almost unaffected at lower temperatures.

DISCUSSION

Bioinformatic analysis of RaK2 proteins

RaK2 proteins, gp098 and gp526–534, were subjected to mono- and trimeric structural modelling, along with model reliability assessments using the *Alpha-Fold2* tool. Structural and amino acid sequence homologies were then evaluated with *Dali* and *Hhpred*, respectively.

Although gp527, gp529, and gp530 (group A) show the highest similarity to typical TSPs, they also differ in certain structural elements, such as variations in the number of NTDs. In addition, the CTD of gp530 contains an endochaperone, which is more characteristic of other phage proteins, such as the L-shaped tail fibre²²¹ or atypical structures-containing TSPs that hold sialidase activity²³⁵. The depolymerase triple β -helix region, typical of TSPs with an 'amphora' structure^{21,65}, has been identified in the gp527–528 and gp531–533 proteins (group B). However, these proteins exhibit less similarity to typical TSPs, particularly in the N-termini. The structural dissimilarity is attributed to additional 'head' domains homologous to CBA120 D1,2 and XD2,3, composed of trimeric structures formed from β -sheets. Consequently, the interaction between D and XD leads to the branching of the phage fibre in CBA120¹⁶⁶.

Interestingly, the base of CBA120 fibre is the largest TSP4 protein, containing the most XD domains, along with AD, which is responsible for binding TSP4 to the baseplate²¹. This is similar to the RaK2 gp528 protein, which has five XD domains. Unfortunately, the gp528 protein shows no structural homology to the TSP4 AD of CBA120; however, the sequence of this gp528 region (1–105 aa) is highly conserved among *Alcyoneusvirus* phages, indicating its uniqueness as characteristic of this genus. It likely plays a role in binding the fibre to the phage baseplate, similar to the TSP4 AD.

In TSP-like gp527–533 proteins, with the exception of gp530, the last domain of their C-terminus is typically formed by individual β -sandwiches, which usually associate in a trimeric triangular structure. In contrast, individual β -sandwiches form a trimeric "three-leaf clover" structure in the NTDs. The function of the C-terminus and adjacent domains is poorly understood in TSP proteins, although the C-termini of gp528 and gp531 show structural homology to proteins that interact with polymers.

The structural models of proteins gp098, gp526, and gp534 lacked the depolymerase domain. Although the gp526 model contains a TSP-specific structural element, an NTD homologous to the D1 domain of CBA120 TSP1, gp526's 'body' is also formed from β -sheets devoid of a β -helical structure, instead forming three separate trimeric domains.

A domain homologous to CBA120 TSP3 D2 was also identified in the NTD of gp534, but the remaining portion of the protein is entirely dissimilar to TSP. Gp534 forms a stem-like structure made of intertwined individual polypeptides, with its C-terminal domain forming a structural knob²²⁶. In contrast, the modelled structure of gp098 exhibits the lowest homology and low model reliability, except for the C-terminus, which contains a stem with a structural knob composed of β -sheets. The C-terminal regions of both proteins, gp534 and gp098, exhibit greater homology to domains of the fibre proteins involved in affinity interactions, making them less similar to TSPs²²⁷.

Thus, gp526–533 are similar to TSPs with depolymerase activity, except for gp526, which shares similarity only in size and the structural homology of its NTD, but lacks the β -helical structure required for depolymerase catalysis. Meanwhile, gp098 and gp534 exhibit greater similarity to fibre proteins.

Adsorption complex study

The RaK2 adsorption complex studies involved the genetic engineering and purification using Ni^{2+} chromatography of the RaK2 recombinant proteins gp098 and gp526–534. Optimisation of the protein induction and purification process revealed that only gp526, gp529, and gp531–533 were obtained in soluble form with a complete amino acid sequence, whereas gp098, gp527, gp528, gp530, and gp534 were produced in an insoluble form. That was not surprising, as typical TSPs tend to aggregate when induced individually and contain intact N-termini^{236,237}, whereas the C-terminus promotes protein folding, trimerisation, and stability^{238,239}. Therefore, to enhance solubility, recombinant proteins with incomplete amino acid sequences were constructed, truncated to either the N or C-terminal region. Among all truncated proteins, only gp098C and gp528N were obtained in a soluble form, whereas insoluble proteins gp527C, gp530C, and gp534C were solubilised and purified under denaturing conditions using 6 M carbamide-supplemented solutions.

SDS-PAGE analysis of the purified recombinant proteins revealed that gp530C undergoes partial proteolysis, likely due to its predicted endochaperone, as a ≈ 13 kDa oligopeptide co-eluted as well. In addition, studies on the T5 L-shaped tail fibre protein pb1 demonstrate that the endochaperone undergoes autoproteolysis and is not present in the final structure²²¹. Therefore, the partial hydrolysis of gp530C is likely associated with protein aggregation and purification under denaturing conditions.

The lab rabbits were immunised with purified recombinant proteins, and the reactivity of the corresponding isolated antisera was tested using Western blot, which demonstrated their significant activity against the respective antigens. In contrast, testing antisera reactivity against RaK2, no interaction was only observed with gp527C, gp530C, and gp534C. This inactivity may be due to misfolding of the recombinant proteins during aggregation, which promotes the

formation of antibodies recognising spatial epitopes during immunisation. Therefore, SDS-PAGE denatures the RaK2 proteins, leading to the lack of antiserum reactivity during blotting. A similar antibody inactivity against proteins purified under denaturing conditions was demonstrated in protein-protein interaction studies involving SPP1 phage gp21 and the bacterial protein YueB²⁴¹.

Interestingly, the anti-gp534C antiserum reacts with two proteins of ≈ 28 and 56–58 kDa in the antigenic sample, corresponding to the molecular masses of gp534C's monomer and dimer. This phenomenon is likely attributed to protein stability, as phage TSP studies involving P22 gp9 and Sf6 p14²⁴² have shown a partial resistance to SDS-mediated denaturation. In a similar fashion, anti-gp534C interacts with a ≈ 150 -kDa protein, corresponding to the dimer (≈ 142 kDa) of the full-sequence gp534, but further investigation is needed to verify this phenomenon. In addition, the potential cross-reactivity, observed in the interaction of anti-gp532 with gp531 and anti-gp531 with gp532 is likely due to the 41% N-terminal identity between gp531 and gp532. However, according to statements from *Proteintech* and *Abcam*, generating antibody cross-reactivity typically requires at least 60–85% sequence identity between polypeptides, whereas a study conducted with mammalian albumin proteins revealed that 80% identity between amino acid sequences is needed²⁴³.

Using the isolated antisera in a bacteriophage infection inhibition assay, proteins gp098 and gp531 were found to be crucial for RaK2 to infect its host, *Klebsiella* KV-3 bacteria. As a result, phage infection was inhibited more than 4×10^5 times by blocking either of the two proteins. Additionally, a slight but statistically significant inhibition was observed when blocking gp532 ($p < 2 \times 10^{-4}$) and gp533 ($p < 2 \times 10^{-2}$) proteins. This may correspond to the cross-reactivity of anti-gp532 with gp531, whereas the interaction between anti-gp533 and gp533 may indirectly inhibit RaK2, as gp531 or gp098 is spatially hindered. Blocking the remaining RaK2 proteins (gp526–530 and gp532–533) of the adsorption complex with the appropriate antisera did not have a significant effect on infection, which may imply the phage's multivalency.

Having established that the RaK2 proteins gp098 and gp531 are crucially involved during the infection process, their indirect effect on phage infection was investigated through a phage adsorption inhibition assay. The investigation revealed that only recombinant gp531 decreased RaK2 adsorption on KV-3 bacteria by 38% and given that anti-gp098C antiserum blocks RaK2 infection, both findings suggest that gp531 and gp098 may act in a coordinated manner during infection. Potentially, gp531 acts first, forming a pathway in the capsule towards the outer membrane, where the interaction with gp098 promotes the further progression of infection. Unfortunately, the structural modelling of gp098 did not predict a typical short tail fibre structure that could provide solid

reasoning for a two-component mechanism of bacteriophage adsorption. Interestingly, one of the C-terminal homologs for gp098 (*Hhpred* analysis: 509–595 aa, 91% probability, 27% identity, 0.348 similarity) was AP22 phage gp53 C-terminus²⁴⁶. The latter exhibits tail fibre characteristics and likely binds to bacterial polysaccharides. In addition, AP22 phage adsorption assay revealed similar results to those of RaK2 gp098C, implying that gp098 is likely a phage tail fibre.

Immunogold labelling of the RaK2 phage revealed that all the investigated proteins are located in the area of the adsorption complex. Unfortunately, the sensitivity of the labelling and sample preparation procedures, combined with the heterogeneity of the primary antibodies and the lability of the nanostructures, posed challenges in pinpointing the exact location of the investigated RaK2 proteins. Similar challenges were also encountered by researchers, investigating adsorption complexes of Tuc2009²⁴⁵ and A511²⁴⁷ using immunogold labelling.

However, only gp528 and gp534 were identified to be distinctly located at the proximal and terminal sites of the branched LTFs, respectively. The rest of the proteins revealed only approximate tendencies of immunogold labelling: gp526, gp527, and gp532 were likely found in the medial areas of the LTFs, while gp530 and gp531 were in the distal areas. However, labelling for gp529 and gp533 did not show a clear tendency, suggesting that these proteins are probably bound to highly labile parts of the branched fibres. Finally, the labelling pattern of gp098 on virions with a contracted tail suggests that it is rather a baseplate protein than belonging to LTFs.

Despite the technical challenges encountered during the investigation of the RaK2 branched LTF and even high-performance methods such as cryo-EM analysis being unable to determine the structure of jumbo phage adsorption complexes with labile nanostructures (ϕ Kp24⁶⁹ study), we have proposed a probable model of the RaK2 fibre structure and assembly (**Fig. 18**) based on results gathered from bioinformatic data, immunogold labelling, AFM, inhibition assays.

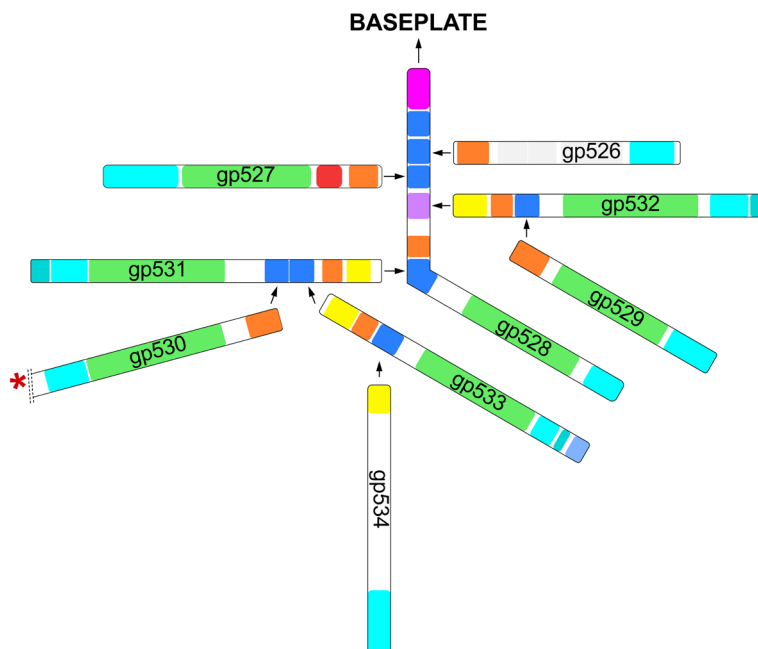


Figure 18. Proposed architectural model of the RaK2 branched long tail fibre with the potential assembly of gp526–534. The colour-coded domains for: anchor AD (**pink**); branching XD2 (**indigo**) and XD3 (**purple**), homologous to T4 gp10 D2 and D3; binding D1 (**orange**), D2 (**yellow**), and head D3' (**red**), each homologous to specific N-terminal domains of CBA120 TSP1–4; catalytic CD (**green**); C-terminal CTDs (**blues**); areas with homology to other phage-derived proteins (**grey**). A red asterisk (*) indicates a cleaved endochaperone.

The results of immunogold labelling, RaK2 infection-blocking and adsorption assays suggest that gp098 likely does not integrate into LTF structure but is instead bound separately to the baseplate, functioning as a short tail fibre, similar to T4 gp12⁵⁰. Furthermore, bioinformatic analysis of gp098 did not predict any homologous domain responsible for protein-protein binding, as observed in phages forming branched LTFs, such as CBA120¹⁴¹.

However, the remaining nine RaK2 proteins are predicted to have N-terminal protein-binding and/ or branching domains, suggesting possible assembly among them. In addition, TSP catalytic domains^{21,23,169,35,37,136,141,165–168} were detected in seven of these proteins (with depolymerase activity shown only for gp531; see the next section), indicating architectural similarities to CBA120¹⁴¹ LTFs.

Hence, the primary protein, acting as a platform for LTF assembly, shows proximal immunogold labelling with the highest molecular mass comparable to gp30 from ϕ Kp24⁶⁹ and TSP4 from CBA120¹⁴¹, both of which are involved in the proposed architectures of branched fibres, and it contains five putative branching domains (XD2–3) homologous to T4 gp10 D2–3, is gp528. Since AFM shows an unoccupied proximal area of the branched fibre, the first one out

of five XDs from gp528 is not bound to any other proteins, similarly functioning to the CBA120 TSP4 XD1¹⁴¹, which has a trimerisation axis overlapping with the AD domain, stabilising it. The remaining 2–5 XDs attach to four proteins: gp526, gp527, gp532, which are observed in the medial area, and gp531, which is detected in the distal part of the RaK2 LTFs. Gp532 and gp531 have branching domains (XD2) to which gp529 and gp533 bind. The latter two do not bind any other proteins, and that increases their structural lability, resulting in a distribution of gold nanoparticles observed without a defined tendency. The second XD2 domain in the gp531 protein attaches the gp530, without manifesting structural lability, as gp530 shows a defined labelling tendency at the distal region of the LTFs. That is likely due to the smaller size of gp530 after the removal of its endochaperone. The gp533 with the most distant XD domain is bind by the terminal LTF protein gp534, which is observed as the LTF protrusion in AFM analysis. In this potential manner, the RaK2 branched long tail fibre is assembled, containing seven TSP-like depolymerases (CD domains), which are likely responsible for degrading different polysaccharides.

RaK2 depolymerase specificity characterisation

Purified full-sequence RaK2 proteins were evaluated for depolymerase activity using a spot test, revealing that only gp531 exhibited activity solely against *Klebsiella* KV-3 bacteria, sustaining its activity even after a 15-min heat treatment at 52°C. The other RaK2 proteins, gp529, gp532, and gp533, demonstrated no depolymerase activity despite testing on different *Klebsiella* strains (KV-1, ATCC 8724, ATCC BAA-1705 ir 279). Notably, the intensity of the transparent zones produced during gp531 spot testing depends on the protein amount and treatment temperature. This phenomenon may be related to bacterial growth inhibition even though the depolymerase does not lyse the cells to produce transparent spots. As cryo-EM studies of phage SP6¹⁵⁶ have shown, the LPS-degrading depolymerase also interacts with lipid A, which is vital for bacterial integrity. It is likely that gp531 exerts a similar effect by interacting with additional bacterial component and strongly inhibiting it, leading to stalled cell development and ultimately death, with the depolymerase's 'lytic' activity proportionally manifesting according to the active protein dose.

It was not surprising that other RaK2 porteins did not show depolymerase activity, since phages containing different TSPs usually infect a broader range of bacteria, as shown in multiple studies involving bacteriophages such as 0507-KN2-1²⁴⁸, phiK64-1⁶³, K5³², or IME200²⁴⁹. In addition, phages undergo intense evolutionary selection due to their small genomes, reliance on the host's transcription/ translation machinery, and the fact that changes in RBP genes are crucially detrimental, therefore, containing multiple copies of the same gene is not evolutionarily advantageous^{250,251}.

To determine the enzymatic specificity of gp531, a set of 27 compounds (various saccharides and chromogenic derivatives) was tested as substrates for gp531. Unfortunately, none of them were found to be suitable, which is unsurprising, as phage-borne depolymerases are typically known for their remarkable specificity. Their active site is intricately formed by neatly associated β -helices from each subunit, creating a cleft that precisely coordinates at least one repeating unit of the substrate, essential for catalysis to occur^{38,165}. Previous studies on phages, such as HK620 p57 and EP75 gp167²⁰⁴, have demonstrated that different glycosyl substituents within the polysaccharide and structural variations in the active site can limit the depolymerase's catalytic range.

To further investigate gp531's enzymatic specificity, the capsular polysaccharide isolated from *Klebsiella* sp. KV-3 bacteria was used as a substrate. The composition of the polysaccharide was investigated by analysing the *cps* gene cluster of *Klebsiella* sp. KV-3, revealing it to be of the K54 serotype with already established structure^{233,267}. Interestingly, the KV-3 polysaccharide undergoes deacetylation depending on cultivation duration, while acetyl modifications do not affect gp531's activity. This aligns with previous research, showing that acetylation does not impact the phage F34 depolymerase with fucosidase activity against the *E. coli* K27 and *Klebsiella aerogenes* K54 polysaccharides²⁵².

Upon investigating K-type of *Klebsiella* KV-3 using HPLC-MS, it was also found that gp531 hydrolyses K54 polysaccharide into oligosaccharides of varying sizes, including tetrasaccharide (monomer), octasaccharide (dimer), and dodecasaccharide (trimer), indicating an endogenous glycosyl hydrolysis reaction. Similar enzymatic activity was observed in APC phages infecting *Acinetobacter baumannii*³⁰, and in viruses KpV79 and KpV767 targeting *Klebsiella*⁷⁰, which hydrolyse the polysaccharide into monomers and dimers.

Two separate approaches were employed to investigate gp531's enzymatic specificity due to analytical limitations in analysing the hydrolysed glycosidic bond. The reducing end of the product-tetrasaccharide at the cleaved site was modified either by reduction with NaBH₄ or by derivatisation with the ANTS fluorophore. Subsequently, modified compounds were subjected to hydrolysis with TFA to degrade into smaller degree saccharides, followed by TLC and HPLC-MS analyses.

Both approaches provided complementary results, successfully identifying the enzymatic specificity of gp531 as the β -(1 $\rightarrow$ 4)-endoglucosidase targeting the capsular polysaccharide of serotype K54. Notably, this is the first report in the literature describing a phage-borne protein with such enzymatic specificity, a known amino acid sequence, and targeting this substrate. Previously discovered phages, ϕ 54²³³ and ϕ 31²⁵⁸, exhibited identical gp531 activity, but the genes, encoding these depolymerases remain unknown. Interestingly, bacteriophage

F32 contains a fucosidase capable of hydrolysing both *K. aerogenes* K54 and *E. coli* K27 (E56b) polysaccharides. Structurally, the two polysaccharides differ only in the side monosaccharide substitution: K27 has β -D-galactose instead of glucose^{252,262–264}. This suggests that the K27 polysaccharide may serve as another potential substrate for gp531.

Finally, the investigation into relative activity under varying pH and temperature conditions revealed that gp531 is more active in acidic buffer solutions (pH 3–5) while sustaining high activity at temperatures up to 50°C. Similarly, *Klebsiella* phage KP36 depolymerase gp50 shows high activity at lower pH (4–7), and a decrease of 30% in activity is observed at 55°C, akin to gp531²⁶⁵. The optimum pH of gp531 is comparable to that of the *Erwinia amylovora* phage ϕ -Ea1h depolymerase, which is highly active at pH 4 or 5²⁶⁶.

Overall study of RaK2 provides additional insights into the properties of the adsorption complex of *Alcyoneusvirus* jumbo bacteriophages, including: the potential architecture of the branched long tail fibres (LTFs); the likely two-component mechanism of infection initiation; the structure of the LTFs, which comprise proteins with depolymerase activity; the highly distinctive enzymatic specificity of the depolymerases in the LTFs (targeting only one out of all the possible glycosidic bonds in the bacterial capsular polysaccharide); and their stability over a wide range of temperature and pH conditions. These discoveries contribute not only to the fundamental knowledge of jumbo phages but also to the potential application of their proteins as biocatalysts in chemical syntheses under physiological conditions in various fields, including medicine, food, and the carbohydrate chemistry.

CONCLUSIONS

1. Bioinformatic analysis of the RaK2 gp098 and gp526–534 proteins revealed that domains responsible for protein binding (D, XD) and depolymerase activity (CD) are also found in jumbo phages, indicating a high structural conservation of these domains.

2. It has been demonstrated that bacteriophages (RaK2) with branched long tail fibres recognise bacteria (*Klebsiella* sp. KV-3) using two proteins (gp531 and gp098).

3. It has been empirically shown that the RaK2 branched long tail fibre consists of gp526–534. Based on the results of our study, a possible and the first model of the fibre architecture belonging to viruses of the *Alcyoneusvirus* genus is proposed.

4. Using genotyping of the *Klebsiella* sp. KV-3 *cps* region, the K-serotype of the capsule was found to be K54. It has been shown that the level of acetylation of its polysaccharide depends on the bacterial growth phase.

5. Using chemical modification of the hydrolysis product of the *K. pneumoniae* K54-serotype capsule polysaccharide, catalysed by RaK2 gp531, and HPLC-MS method, the enzymatic specificity of gp531 was determined to be an acidic β -(1→4)-D-endoglucosidase – the first depolymerase characterised to target this polysaccharide as a substrate.

SCIENTIFIC ACHIEVEMENTS

Published Articles

- ✳ Noreika A, Stankevičiūtė J, Rutkienė R, Meškys R, Kalinienė L. Exploring the enzymatic activity of depolymerase gp531 from *Klebsiella pneumoniae* jumbo phage RaK2. *Virus Res.* 2023; 336: 199225, 1–10. Doi: **10.1016/j.virusres.2023.199225**.
- ✳ Noreika A, Rutkienė R, Dumalakienė I, Vilienė R, Lauryšnėnas A, Povilonienė S, Skapas M, Meškys R, Kalinienė L. Insights into the Alcynovirus Adsorption Complex. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(11): 9320, 1–22. Doi: **10.3390/ijms24119320**.

Articles, not Related to Dissertation

- ✳ Noreika A, Meškys R, Lazutka J, Kalinienė L. Complete genome sequence of *Buttiauxella* phage vB_ButM_GuL6. *Arch Virol.* 2020; 165(11): 2685–7. Doi: 10.1007/s00705-020-04780-7.
- ✳ Labutytė G, Povilonienė S, Šimoliūnas E, Gabrielaitis D, Skapas M, Noreika A, Meškys R, Časaitė V. Functionalized Protein Nanotubes Based on the Bacteriophage vB_KleM-RaK2 Tail Sheath Protein. *Nanomaterials.* 2021; 11(11):3031, 1–14. Doi: 10.3390/nano11113031.
- ✳ Kalinienė L, Noreika A, Kaupinis A, Valius M, Jurgelaitis E, Lazutka J, Meškienė R, Meškys R. Analysis of a Novel Bacteriophage vB_AchrS_AchV4 Highlights the Diversity of Achromobacter Viruses. *Viruses.* 2021;13(3):374, 1–19. Doi: 10.3390/v13030374.
- ✳ Zajančkauskaitė A, Noreika A, Rutkienė R, Meškys R, Kalinienė L. Low-Temperature Virus vB_EcoM_VR26 Shows Potential in Biocontrol of STEC O26:H11. *Foods.* 2021; 10(7):1500, 1–19. Doi: 10.3390/foods10071500.

Conferences

- ✳ Noreika A, Rutkienė R, Dumalakienė I, Povilonienė S, Meškys R, and Kalinienė L. Investigation of the Adsorption Complex of the Giant Phage vB_KleM-RaK2 Infecting *Klebsiella*. Viruses of Microbes. EMBO Workshop. 9–13 July 2018. Wrocław, Poland.
- ✳ Noreika A, Rutkienė R, Stanislauskienė R, Meškys R, Kalinienė L. Towards the Elucidation of the Molecular Mechanisms Underlying the Cold Adaptation of Low-Temperature Viruses Specific for a Mesophilic Host. 45th FEBS Congress. Molecules of Life: Towards New Horizons. 3–8 July 2021. Ljubljana, Slovenia.

Workshop

Integrated Methodologies and Approaches for Structural Biology. Central European Institute of Technology. iNEXT Workshop. 29–31 May 2019. Brno, Czech Republic.

Other Contributions

In 2020, my contribution of core ideas and biological components to the iGEM team of the *FlavoFlow* project has promoted their success and ultimately led to the victory of the grand prize out of 256 teams from around the globe.

Curriculum Vitae

Work Experience

2017–2024: Junior Scientist and PhD student at the Department of Molecular Microbiology and Biotechnology, Institute of Biochemistry, VU, Life Sciences Center.

2015–2017: Junior Biotechnologist at Northway Biotechpharma, Downstream Processing Department.

2014: Six-month professional internship organized by the Research Council of Lithuania.

2012: Three-month professional internship organized by Thermo Fisher Scientific, R&D Department.

Education

2015: Master's Degree in Genetics – Vilnius University.

2013: Bachelor's Degree in Biochemistry – Vilnius University.

2009: High School Diploma – Vidzgiris Secondary School, Alytus.

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
el. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.