

Научная статья

УДК 579.258

DOI: 10.17586/2310-1164-2023-16-2-3-12

## Анализ геномных вариантов клеток *Escherichia coli* K-12, устойчивых к инфекции фагом T7

Р.Г. Аксенов<sup>1\*</sup>, А.В. Комиссарова<sup>2</sup>, М.А. Скутель<sup>3</sup>, А.Б. Исаев<sup>3</sup><sup>1</sup>Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина, Россия, Москва, \*ubezhishe@bk.ru<sup>2</sup>Финансовый университет при Правительстве РФ, Россия, Москва<sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва

**Аннотация.** В лаборатории анализа метагеномов получены мутанты *Escherichia coli* BW25113, устойчивые к инфекции фагом T7, обладающие мукоидным (слизистым) фенотипом и являющиеся объектами данного исследования, цель которого определить механизм приобретения ими устойчивости к бактериофагам. Сформированы задачи проведения полногеномного высокопроизводительного секвенирования обнаруженных мутантов с последующей обработкой данных, проанализированных на основе методов биоинформатического анализа, заключающихся в поиске геномных вариантов исследуемых штаммов с помощью программного обеспечения bowtie2 и SNP calling, предсказании значимости этих геномных вариантов с использованием IGV-browser, предсказании функций геномных локусов с привлечением открытых баз данных EcoCyc и NCBI. Обнаружены и изучены с опорой на ранее опубликованные научные работы мутации в локусах генов *igaA*, *RcsC*, *yjbF*, *yjbG*, *yjbH*, затрагивающие компоненты каскада передачи сигнала Rcs – основного регулятора экспрессии генного кластера *yjbEFGH*, ответственного за синтез колановой кислоты. Доказано, что обнаруженная устойчивость возникла в ходе отбора мутантов, образующих колановую капсулу, предотвращающую адсорбцию фаговых частиц за счет создания физического барьера перед фаговым рецептором на поверхности клетки. Генетические скрининги, масштабируемые на новые комбинации атак фагов на бактерии, очень ценны для более глубокого понимания путей заражения фагов и фенотипов, и генотипов устойчивости к ним. В настоящее время общее понимание механизмов устойчивости бактерий к фагам остается ограниченным, и данная работа посвящена устранению пробелов в этом разделе науки.

**Ключевые слова:** прикладная геномика; молекулярная биология прокариот; генетика мукоидной резистентности; полногеномное высокопроизводительное секвенирование; Rcs каскад; колановая кислота; *E. coli* K-12; фаг T7

**Финансирование:** работа поддержана грантами Минобрнауки РФ (проект 075-10-2021-114) и грантом Российского научного фонда (проект 22-14-00004)

Original article

## Genomic variants' analysis of *Escherichia coli* K-12 cells resistant to phage T7 infection

Roman G. Aksenov<sup>1\*</sup>, Anna V. Komissarova<sup>2</sup>, Mikhail A. Skutel<sup>3</sup>, Artem B. Isaev<sup>3</sup><sup>1</sup>Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA n. a. K.I. Skryabin, Moscow, Russia, \*ubezhishe@bk.ru<sup>2</sup>Financial University under the Government of the Russian Federation, Moscow, Russia<sup>3</sup>Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

**Abstract.** In the laboratory of metagenome analysis there were obtained *Escherichia coli* BW25113 mutants resistant to infection with the T7 phage and possessing a mucoid phenotype. Tasks were set in carrying out whole genome sequencing of mutants and their further bioinformatic processing on the basis of bioinformatic analysis in order to determine the mechanism of acquiring resistance to bacteriophages. Bioinformatic analysis included searching genome variants for the strains under investigation by Bowtie2 and SNP calling software, prediction the importance of genome variants by IGV-browser, and predicting functions of the variants by the use of EcoCyc and NCBI open databases. As a result, mutations in the locus of genes *igaA*, *RcsC*, *yjbF*, *yjbG*, and *yjbH* affecting the components of the Rcs signal transmission cascade, the main regulator of the expression of the *yjbEFGH* gene cluster, responsible for the synthesis of colanic acid, were detected taking into account the results of previous research. Thus, it was proved that the discovered resistance arose during the selection of mutants forming a colane capsule that prevents the adsorption of phage particles by creating a physical barrier in front of the phage receptor on the cell surface. Genetic screenings adjusted to new combinations of phage attacks on bacteria are of great importance to get an insight into the ways of phages' and phenotypes' infecting and resistance genotypes. Currently, the insight into the reasons of bacteria resistance to phages is insufficient, therefore, the paper is aimed at filling the gap.

**Keywords:** applied microbiology; molecular biology of prokaryotes; genetics of mucoid resistance; genome-wide sequencing; Rcs cascade; collanic acid; *E. coli* K-12; phage T7

**Financing:** The work was supported by grants from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (project 075-10-2021-114), as well as a grant from the Russian Science Foundation (project 22-14-00004)

**Введение**

Вирусы бактерий или бактериофаги (фаги) являются паразитами бактерий и играют важную роль в регуляции численности этих организмов. Фаги представляют собой наиболее распространенные биологические объекты на Земле и влияют на состав и структуру микробных сообществ. Таким образом, фаговая инфекция прямо или косвенно затрагивает циклы обмена питательных веществ в окружающей среде, биопroduкцию и здоровье человека и животных. Эволюционная гонка между фагами и бактериями является одной из движущих сил изменения этих сообществ и источником возникновения новых молекулярных механизмов защиты и контрзащиты [1].

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

Миллиарды лет коэволюции привели к разработке широкого спектра стратегий атаки и защиты, используемых вирусами и бактериями. Гены, связанные с фаговой резистентностью, могут составлять до 10% микробного генома [3]. Отдельный бактериальный геном может содержать несколько областей защиты. Часто в их состав входят мобильные генетические элементы, способствующие экстенсивному горизонтальному переносу генов защитных систем [4, 5].



Рисунок 1 – Антифаговые механизмы на разных стадиях жизненного цикла фага [8]  
 Figure 1. Anti-phage mechanisms at different stages of the phage life cycle [8]

Раннее открытие систем защиты фагов было связано с селекцией фагорезистентных штаммов и характеристикой их специфических признаков. Недавнее увеличение доступности геномных данных и применение подходов биоинформатики значительно расширили данную область, позволив постоянно прогнозировать появление новых кластеров генов защиты от фагов. Так систематический анализ всех белковых доменов базы данных rfam, обнаруженных на фагорезистентных участках в микробном пангеноме, привел к предсказанию почти 300 семейств генов, которые были представлены вокруг известных защитных генов. Это привело к валидации десятка новых типов противовирусных систем [6, 7]. Наиболее хорошо изученные из них представлены на рисунке 1, 2 и 3.

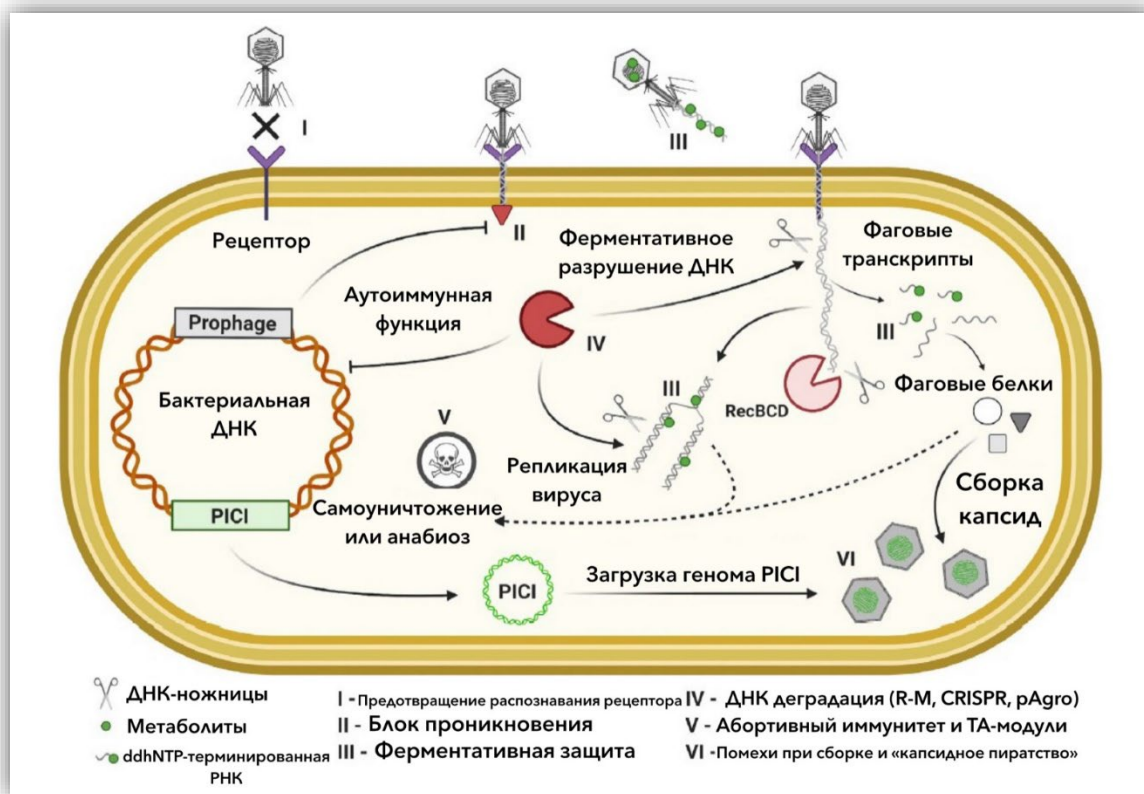


Рисунок 2 – Общее описание стратегий бактериальной защиты, нацеленных на различные стадии жизненного цикла вируса [9]

Figure 2. General description of microbiological protection strategies aimed at different stages of the virus life cycle [9]

a | Рестрикция-модификации (R-M) и другие родственные системы модифицируют специфические последовательности в геноме бактерии и расщепляют немодифицированные, т. е. чужеродные.

b | CRISPR–Cas работают в две основные фазы: первая – адаптация, когда комплекс белков Cas управляет получением новых бактериофаговых спейсеров; вторая – взаимодействие, когда белки Cas в комплексе с полученной из спейсера CRISPR-РНК (crRNA) нацеливаются на фаговые нуклеиновые кислоты и разрушают их.

c | Химическая защита была описана у *Streptomyces spp.*, у которых бактерии продуцируют небольшую антифаговую молекулу, которая интеркалируется в фаг ДНК и подавляет ее репликацию.

d | Система abortивного иммунитета. Совместно с кодируемыми фагом холинами и лизинами фага Phі31, AbiZ из *Lactococcus lactis* ускоряют лизис до завершения сборки фага. При экспрессии фагового белка T4 Gol белок *Escherichia coli* Lit ингибируют трансляцию посредством расщепления фактора элонгации EF-Tu. Белок *E. coli* RexA распознает специфический ДНК-белковый комплекс, образованный λ-фагом, и активирует RexB, ионный канал, который деполаризует мембрану, приводя к гибели фага.

e | CBASS (антифаговая сигнальная система на основе циклических олигонуклеотидов) распознает присутствие фага и генерирует низкомолекулярный сигнал циклического олигонуклеотида, который активирует эффектор, приводящий к гибели фага.



f | Недавно было продемонстрировано, что множественные системы играют антифаговую роль, но их механизмы пока остаются неизвестными.

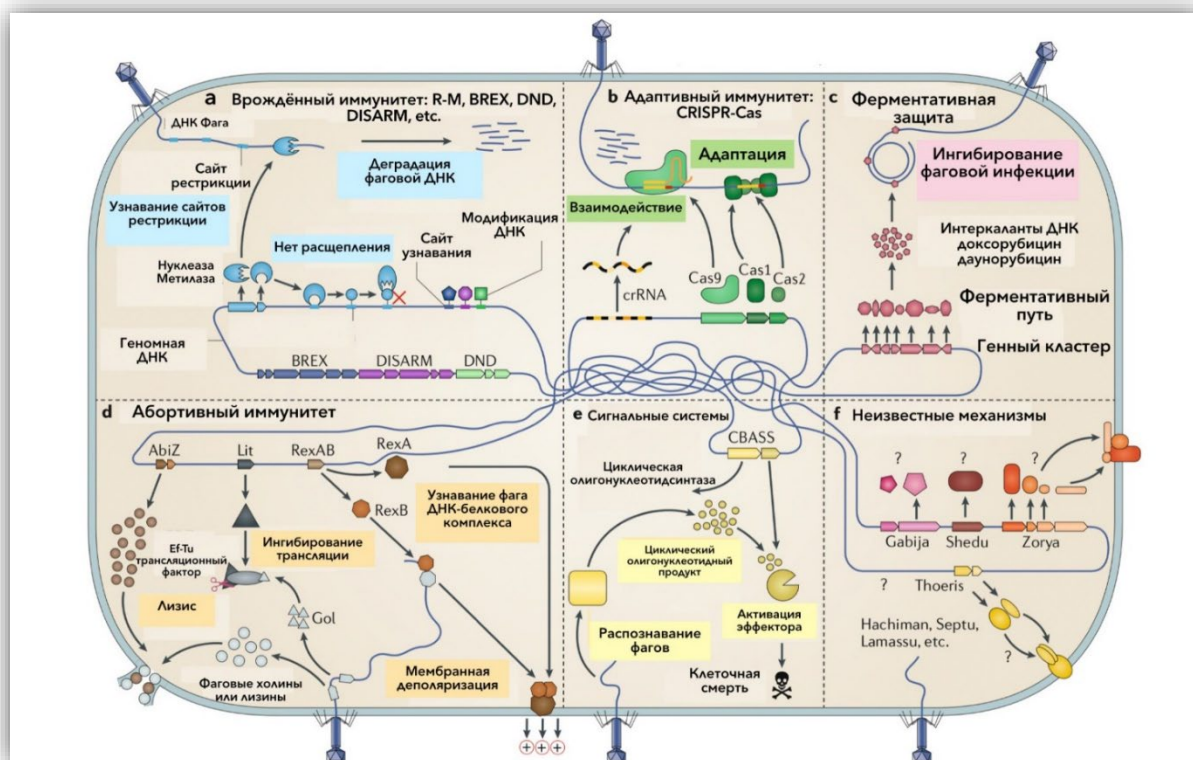


Рисунок 3 – Противовирусные защитные системы бактерий [10]

Figure 3. Antiviral protective systems of bacteria [10]

Фаговая инфекция инициируется бактериями при распознавании специфических рецепторов на поверхности клетки белками, связывающими фаговые рецепторы (RBP). Различные типы поверхностных молекул могут использоваться фагами в качестве рецепторов, включая жгутики, белки, липополисахариды (ЛПС) или углеводы. Взаимодействие между фаговыми рецепторами (RBP) и рецептором бактерий может рассматриваться как начальная стадия атаки и считается ответственным за определение диапазона восприимчивых к инфекции бактерий [8, 9].

Во избежание распознавания фагами бактерии благодаря накопленному багажу мутаций в процессе эволюции научились модифицировать рецепторы в маскировочные формы, секретировать высокомолекулярные полимеры, образуя биопленки [10, 11].

Так, маскировка включает синтез молекул, которые связываются с рецепторами бактерии и физически блокируют взаимодействие с фаговыми RBP, как в случае связывания белка *TraT* с рецептором *OmpA* у *E. Coli* [12]. Временные химические модификации рецепторов также препятствуют их распознаванию: примеры включают гликозилирование пилуса у *P. Aeruginosa* или глюкозилирование O-антигена у *Salmonella enterica* [13, 14].

Недавний высокопроизводительный скрининг химических библиотек выявил молекулы, способные препятствовать фаговой инфекции  $\lambda$  в *E. coli*, не влияя на рост бактерий. Антифаговая активность была показана в биологически значимом контексте: добавление отработанной среды, собранной после роста доксорубицин- и даунорубицин-продуцирующего штамма *Streptomyces peucetius*, способно ингибировать инфекцию фаг-чувствительного штамма *S. coelicolor*.

Микробная резистентность к фаговой инфекции также может быть связана с активностью специфических иммунных систем, основной функцией которых является ингибирование размножения чужеродного генетического материала, таких как PLE (фаг-индуцируемый островоподобный элемент) и PIC1 (фаг-индуцируемые хромосомные острова) [15, 16]. Иммунные системы часто полагаются на распознавание определенных участков во вторгшейся нуклеиновой кислоте, чтобы инициировать ингибирующую реакцию. Их можно дополнительно классифицировать как «врожденный иммунитет»

(включая различные типы рестрикционных модификаций (R-M), BREX-системы, защитные комплексные системы (DISARM), токсин-антитоксин (ТА), abortивная система (Abi) и прочие менее изученные системы) и «адаптивный иммунитет», опосредованный кластеризованными регулярно пересекающимися повторами (CRISPR) и CRISPR-ассоциированными белками (CRISPR-Cas).

С течением времени для каждой известной стратегии микробной защиты фаги эволюционировали средства контрзащиты. В итоге это стало только вопросом времени, когда будут описаны фаг-кодируемые ингибиторы новых защитных систем бактерий [17–19].

Несмотря на то, что в последние годы представления об изобилии типов защитных бактериальных систем значительно расширились, они остаются лишь небольшой частью их реального разнообразия [20]. Понимание полного спектра возможных способов предотвращения фаговой инфекции бактериями все еще остается ограниченным. Проведение данных исследований особенно важно для развития новых методов фаговой терапии — перспективного способа лечения бактериальных болезней человека в эпоху возрастающего риска возникновения множественно лекарственно устойчивых вариантов патогенов [21]. В связи с этим цель исследования — объяснить возникновение механизма фагоустойчивости у мутированной популяции клеток кишечной палочки.

## Материалы и методы исследований

В ходе работы отобраны мутанты клеток *E. coli* K-12 BW25113, которые демонстрировали рост в культуре клеток спустя более 20 ч после инфекции бактериофагом T7. Полученные мутанты обладали слизистым фенотипом, что позволило предположить появление мутаций, приводящих к усиленному синтезу клеточной капсулы или других способов модификации поверхности клетки. С целью идентификации конкретных мутаций, произошедших в клетках, осуществляли полногеномное секвенирование бактериальной ДНК на платформе Illumina.

Алгоритм анализа данных был следующим: прочтения Illumina были процессированы для удаления адаптера и оснований с низким качеством сигнала (>2 оснований с оценкой Phred <20) с помощью Trimmomatic v0.36 и проведена оценка качества с помощью FASTQC. Обрезанные прочтения были картированы на референсный геном *E. coli* BW25113 (NCBI: CP009273) с использованием программы bowtie2 (максимум 3 несовпадения на прочтение). Были получены sam файлы, содержащие координаты картированных прочтений, которые оценили по качеству с помощью BAMQC. SNP calling (детекция несовпадающих позиций, т. е. установление мутаций) был выполнен с использованием SAMtools и BCFtools. Для визуализации положения трех типов мутаций (single nucleotide polymorphisms, indels, deletions, insertions) с порогом качества FQ <80 использовали программу IGV-browser. Учитывались мутации в открытых рамках считывания (согласно принципу аминокислотной синонимичности) или некодирующей области (для учета возможных эффектов на экспрессию генов).

## Результаты и их обсуждение

В результате удалось обнаружить ряд несинонимичных мутаций в генах регуляторного Rcs каскада передачи сигнала, представленных в таблице 1.

Известно, что активация генного каскада Rcs (регулятор биосинтеза капсул) необходима для выживания энтеробактерий в стрессовых условиях окружающей среды, при повреждении мембран или пептидогликанового слоя и при обработке антибиотиками.

В *Escherichia coli* K-12 путь передачи сигнала Rcs представляет собой сложную систему детекции повреждений клеточной оболочки (envelope stress response systems – ESRS), которая передает сигнал путем фосфорилирования компонентов каскада. Ранее наблюдались многочисленные условия, которые активируют фосфорилирование Rcs, включая осмотический и кислотный шок, высыхание и нарушения целостности клеточной оболочки. Регуляторная активность Rcs включает гены, ответственные за синтез колановой кислоты, повышение кислотоустойчивости, регулирующие деление клеток и подвижность, а также образование биопленок. Система Rcs функционирует как глобальный регулятор, контролирующей состав клеточной поверхности в ответ на изменение окружающей среды [22, 23].

Таблица 1. Детекция несинонимичных мутаций  
Table 1. Detection of non-synonymous mutations

Мутанты клеток <i>E. coli</i> K-12 BW25113	E11	D6	D11	B7-1	B11	G4	G8	G3	F11	F10
RcsC 2310582	T	T	T	T	T	G	T	T	T	T
RcsC 2310645	G	G	G	A	A	G	G	G	G	G
RcsC 2311764	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A
igaA 3519759	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A
igaA 3519760	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C
igaA 3519762	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G
igaA 3519763	C	A	A	C	C	C	C	C	C	C
igaA 3519813	G	T	T	T	T	T	T	G	G	T
igaA 3521338	G	G	G	G	G	A	G	G	G	A
yjbF 4226214	A	A	A	AC	A	A	A	A	A	A
yjbG 4226844	T	T	T	T	T	T	A	T	T	T
yjbG 4227332	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T
yjbG 4227467	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A
yjbG 4227496	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G
yjbG 4227499	T	T	T	T	C/G	T	T	T	T	T
yjbG 4227500	G	G	G	G	T	G	G	G	G	G
yjbG 4227502	G	G	G	G	C	G	G	G	G	G
yjbH 4228522	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C
waaC 3790245	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A
fepA 606500	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C
sohB 1324172	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C
hldE 3189763	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T
mdtP 4290335	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C

В состав Rcs-комплекса входят липопротеин внешней мембраны *RcsF* и основной белок внутренней мембраны *IgaA* (аттенуатор), а также четыре отдельных белка: *RcsA*, *RcsB*, *RcsC* и *RcsD*. *RcsF* и *IgaA*, расположенные «выше» фосфорелирующего модуля, необходимы для нормального функционирования Rcs, который контролирует экспрессию генов посредством каскада реакций переноса фосфатной группы. Перенос фосфата происходит от гибридной гистидинкиназы *RcsC* к *RcsD*, а затем к цитоплазматическому фактору транскрипции и глобальному регулятору *RcsB*. Фосфорилированный *RcsB* либо отдельно, либо в комбинации со вспомогательным белком *RcsA*, регулирует транскрипцию ряда генов, включая кластер *yjbEFGH*. Липопротеин внешней мембраны *RcsF* обнаруживает дефекты липополисахаридов и/или нарушение пептидогликана, взаимодействует с периплазматическим доменом *IgaA*, образует комплекс *RcsF-IgaA* и запускает систему Rcs [24, 25].

Следовательно, ген *IgaA* является отрицательным регулятором пути фосфорилирования и передачи сигнала Rcs. В состоянии покоя белок *IgaA* блокирует белки *RcsC/D*. В ответ на раздражитель *IgaA* перестает действовать, и активируется каскад *RcsC/D*, передающий сигнал белкам *RcsB* и *RcsA*, активирующих экспрессию Rcs регулона. После прекращения действия стрессового фактора активность каскада снижается.

Регуляция активации пути Rcs геном *IgaA* необходима для выживания бактерии в различных стрессовых условиях окружающей среды, при повреждении мембран и при воздействии антибиотиков, что можно наблюдать на рисунке 4 и 5 [26].



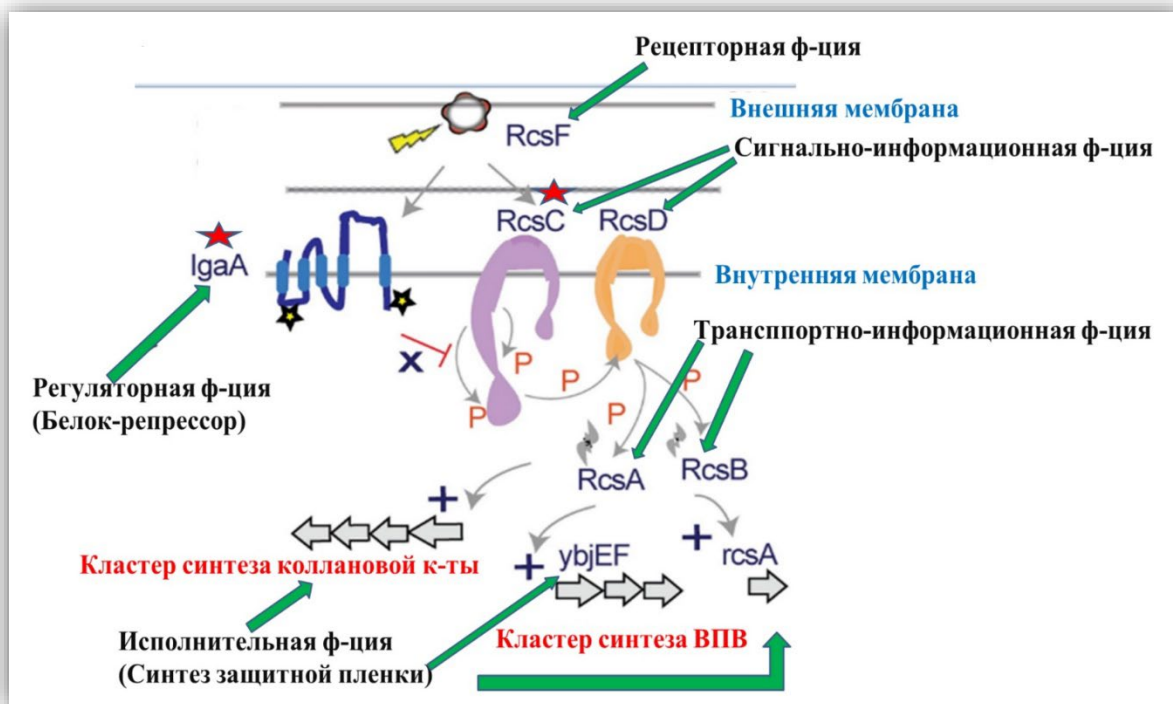


Рисунок 4 – Принцип активации Rcs сигнального каскада в условиях клеточного стресса  
 Figure 4. The principle of activation of the Rcs signaling cascade under conditions of cellular stress

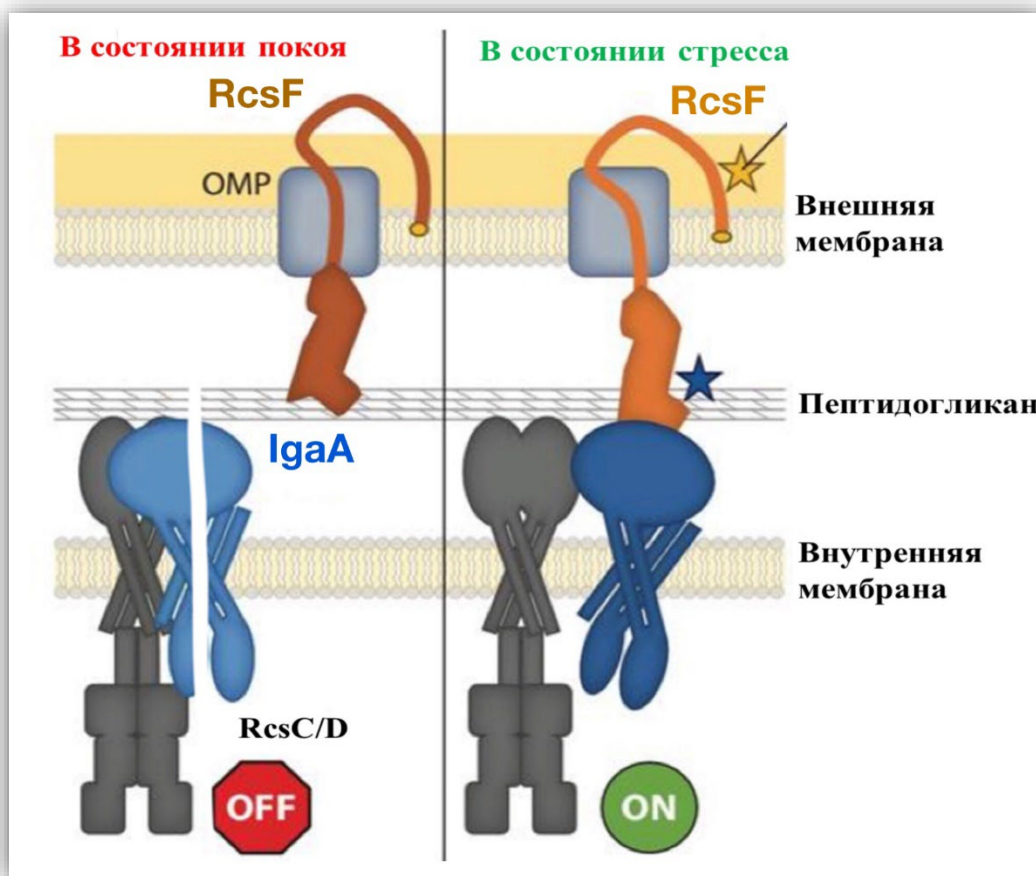


Рисунок 5 – Схема устройства Rcs сигнального каскада и активации Rcs регулона  
 Figure 5. Scheme of the Rcs signal cascade device and activation of the Rcs regulon

Исходя из этого мы предполагаем, что обнаруженная нами точечная мутация в гене *IgaA*, вероятно, привела к конститутивной активации Rcs-каскада, способствовавшей повышенному биосинтезу колановой кислоты. В то же время мутации в гене *RcsC* вероятно привели к gain-of-function фенотипу, т. е. отключили негативную *IgaA* регуляцию. За счет этого клетки приобрели капсулу, которая стала физическим барьером между бактериофагами и рецепторами, необходимым фагам для начала инфекции и локализующихся на внешней мембране бактерий. В итоге физическая изоляция фаговых рецепторов привела к блокировке адсорбции фаговых частиц к поверхности клетки, а значит позволила *E. coli* приобрести резистентность к фагу T7.

Интересно, что помимо мутаций в регуляторном каскаде в некоторых клонах были обнаружены мутации в разных генах *yjbEFGH* оперона – биосинтетического кластера колановой кислоты, ключевого компонента колановой капсулы, защищающей бактериальную клетку от вышеупомянутых факторов. Важно, что Rcs-каскад является ключевым регулятором экспрессии *yjbEFGH* оперона, включающего гены *yjbE*, *yjbF*, *yjbG* и *yjbH*, поэтому идентифицированные мутации связаны в одном биохимическом пути, представленном на рисунке 2. Ранее также были представлены сведения о том, что сверхэкспрессия *yjbEFGH* и *waaC* приводит к продукции внеклеточного полисахарида [27, 28], а *hldE* [29], *fepA* [30], *sohB* [31] и *mdtP* [32] могут быть потенциально задействованы в образовании защитных мембранных биопленок, механизм образования которой данным рядом генов предстоит еще выяснить.

## Заключение

Таким образом, в ходе работы были изолированы штаммы клеток *E. coli* K-12 BW25113, устойчивые к инфекции фага T7 (и другими фагами) и обладающие мукоидным фенотипом, затем идентифицированы мутации в генах Rcs регуляторного каскада и генах синтеза колановой кислоты, приводящие к продукции капсулы. Появление резистентности может быть объяснено образованием капсулы, предотвращающей адсорбцию фагов на поверхности клеток.

Ряд более ранних исследований также выявил генерацию мукоидного фенотипа, который, вероятно, обеспечивает преимущество в приспособленности, блокируя адсорбцию фагов [33]. Результаты показывают, что это может быть общим механизмом приобретения перекрестной устойчивости к различным фагам. Данные этого исследования и будущие усилия по поиску механизмов устойчивости бактерий к фагам расширяют наше понимание коэволюции бактерий и фагов и может быть использовано в процессе разработки более эффективных фаготерапевтических методов лечения бактериальных инфекций человека и инструментов для геной инженерии микробиома.

## Литература/ References

1. Liu B., Furevi A., Perepelov A., Guo X., Cao H., Wang Q., Reeves P.R., Knirel Y., Wang L., Widmalm G. Structure and genetics of Escherichia coli O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*. 2020, V. 44, Is. 6, pp. 655–683. DOI: 10.1093/femsre/fuzo28
2. Tamar E.S., Kishony R. Multistep diversification in spatiotemporal bacterial-phage coevolution. *Nature Communications*. 2022, V. 13, Is. 6, article 7971. DOI: 10.1038/s41467-022-35351-w
3. Wein T., Sorek R. Bacterial origins of human cell-autonomous innate immune mechanisms. *Nature Reviews Immunology*. 2022, V. 22, Is. 10, pp. 629–638. DOI: 10.1038/s41577-022-00705-4
4. Koonin E.V., Makarova K.S., Wolf Yu.I., Krupovic V. Evolutionary entanglement of mobile genetic elements and host defence systems: guns for hire. *Nature Reviews Genetics*. 2020, V. 21, no. 2, pp. 119–131. DOI: 10.1038/s41576-019-0172-9
5. Doron S., Melamed S., Ofir G., Leavitt A., Lopatina A., Keren M., Amitai G. and Sorek R. Systematic discovery of anti-phage defense systems in the microbial pangenome. *Science*. 2018, V. 359, Is. 6379, article eaar4120. DOI: 10.1126/science.aar4120
6. Gao L., Altae-Tran H., Böhning F., Makarova K.S., Segel M., Schmid-Burgk J.L., Koob J., Wolf Yu.I., Koonin E.V., Zhang F. Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes. *Science*. 2020, V. 369, Is. 6507, pp. 1077–1084. DOI: 10.1126/science.aba0372
7. Bertozzi S.J., Storms Z., Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters*. 2016, V. 363, Is. 4, article fnw002. DOI: 10.1093/femsle/fnw002
8. Stone E., Campbell K., Grant I., McAuliffe O. Understanding and exploiting phage–host interactions. *Viruses*. 2019, V. 11, Is. 6, article 567. DOI: 10.3390/v11060567



9. Dragoš A., Kovács Á.T. The peculiar functions of the bacterial extracellular matrix. *Trends in microbiology*. 2017, V. 25, Is. 4, pp. 257–266. DOI: 10.1016/j.tim.2016.12.010
10. Hansen M.F., Svenningsen S.L., Røder H.L., Middelboe M., Burmølle M. Big impact of the tiny: bacteriophage–bacteria interactions in biofilms. *Trends in Microbiology*. 2019, V. 27, Is. 9, pp. 739–752. DOI: 10.1016/j.tim.2019.04.006
11. Hampton H.G., Watson B.N.J., Fineran P.C. The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*. 2020, V. 577, Is. 7790, pp. 327–336. DOI: 10.1038/s41586-019-1894-8
12. Harvey H., Bondy-Denomy J., Marquis H., Sztanko K.M., Davidson A.R., Burrows L.L. *Pseudomonas aeruginosa* defends against phages through type IV pilus glycosylation. *Nature Microbiology*. 2018, V. 3, pp. 47–52. DOI: 10.1038/s41564-017-0061-y
13. Kim M., Ryu S. Spontaneous and transient defence against bacteriophage by phase-variable glycosylation of O-antigen in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*. 2012, V. 86, Is. 2, pp. 411–425. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08202.x
14. Fillol-Salom A., Miguel-Romero L., Marina A., Chen J., Penadés J.R. Beyond the CRISPR-Cas safeguard: PICI-encoded innate immune systems protect bacteria from bacteriophage predation. *Current Opinion in Microbiology*. 2020, V. 56, pp. 52–58. DOI: 10.1016/j.mib.2020.06.002
15. O'Hara B.J., Barth Z.K., McKitterick A.C., Seed K.D. A highly specific phage defense system is a conserved feature of the *Vibrio cholerae* mobilome. *PLoS Genetics*. 2017, V. 13, Is. 6, article e1006838. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006838
16. Eitzinger S., Asif A., Watters K.E., Iavarone A.T., Knott G.J., Doudna J.A., Minhas F.A.A. Machine learning predicts new anti-CRISPR proteins. *Nucleic Acids Research*. 2020, V. 48, Is. 9, pp. 4698–4708. DOI: 10.1093/nar/gkaa219
17. Gussow A.B., Park A.E., Borges A.L., Shmakov S.A., Makarova K.S., Wolf Y.I., Bondy-Denomy J., Koonin E.V. Machine-learning approach expands the repertoire of anti-CRISPR protein families. *Nature Communications*. 2020, V. 11, Is. 1, article 3784. DOI: 10.1038/s41467-020-17652-0
18. Bernheim A., Sorek R. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nature Reviews Microbiology*. 2020, V. 18, Is. 2, pp. 113–119. DOI: 10.1038/s41579-019-0278-2
19. Makarova K.S., Wolf Yu.I., Koonin E.V. Towards functional characterization of archaeal genomic dark matter. *Biochemical Society Transactions*. 2019, V. 47, no. 1, pp. 389–398. DOI:10.1042/BST20180560
20. Mutalik V.K., Adler B.A., Rishi H.S., Piya D., Zhong C., Koskella B., Kutter E.M., Calendar R., Novichkov P.S., Price M.N., Deutschbauer A.M., Arkin A.P. High-throughput mapping of the phage resistance landscape in *E. coli*. *PLoS Biology*. 2020, V. 18, Is. 10, article e3000877. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000877
21. Wall E., Majdalani N., Gottesman S. The complex Rcs regulatory cascade. *Annual Review of Microbiology*. 2018, V. 72, pp. 111–139. DOI: 10.1146/annurev-micro-090817-062640
22. Meng J., Young G., Chen J. The Rcs system in Enterobacteriaceae: envelope stress responses and virulence regulation. *Frontiers in Microbiology*. 2021, V. 12, article 627104. DOI: 10.3389/fmicb.2021.627104
23. Hussein N.A., Cho S.H., Laloux G., Siam R., Collet J.F. Distinct domains of *Escherichia coli* IgaA connect envelope stress sensing and down-regulation of the Rcs phosphorelay across subcellular compartments. *PLoS Genetics*. 2018, V. 14, Is. 5, article E1007398. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007398
24. Dekoninck K., Létoquart J., Laguri C., Demange P., Bevernaegie R., Simorre J.P., Dehu O., Iorga B.I., Elias B., Cho S.H., Collet J.F. Defining the function of OmpA in the Rcs stress response. *Elife*. 2020, V. 9, article e60861. DOI: 10.7554/eLife.60861
25. Guo X.P., Sun Y.C. New insights into the non-orthodox two component Rcs phosphorelay system. *Frontiers in Microbiology*. 2017, V. 8, article 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02014
26. Ferrières L., Aslam S.N., Cooper R.M., Clarke D.J. The yjbEFGH locus in *Escherichia coli* K-12 is an operon encoding proteins involved in exopolysaccharide production. *Microbiology*. 2007, V. 153, Is. 4, pp. 1070–1080. DOI: 10.1099/mic.0.2006/002907-0
27. Wang Z., Wang J., Ren G., Li Y., Wang X. Deletion of the genes waaC, waaF, or waaG in *Escherichia coli* W3110 disables the flagella biosynthesis. *Journal of Basic Microbiology*. 2016, V. 56, Is. 9, pp. 1021–1035. DOI: 10.1002/jobm.201600065
28. Hermansen G.M.M., Boysen A., Krogh T.J., Nawrocki A., Jelsbak L., Møller-Jensen J. HldE Is Important for Virulence Phenotypes in Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018, V. 8, article 253. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00253
29. Barnard T.J., Watson Jr.M.E., McIntosh M.A. Mutations in the *Escherichia coli* receptor FepA reveal residues involved in ligand binding and transport. *Molecular Microbiology*. 2001, V. 41, Is. 3, pp. 527–536. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02473.x
30. Baird L., Lipinska B., Raina S., Georgopoulos C. Identification of the *Escherichia coli* sohB gene, a multicopy suppressor of the HtrA (DegP) null phenotype. *Journal of Bacteriology*. 1991, V. 173, Is. 18, pp. 5763–5770. DOI: 10.1128/jb.173.18.5763-5770.1991

31. Radi M.S, Munro L.J., Salcedo-Sora J.E., Kim S.H., Feist A.M., Kell D.B. Understanding functional redundancy and promiscuity of multidrug transporters in *E. coli* under lipophilic cation stress. *Membranes*. 2022, V. 12, Is. 12, article 1264. DOI: 10.3390/membranes12121264
32. Wang C., Zhang H., Wang J., Chen S., Wang Z., Zhao L., Wang X. Colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli* is dependent on lipopolysaccharide structure and glucose availability. *Microbiological Research*. 2020, V. 239, article 126527. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126527

#### *Информация об авторах*

Роман Григорьевич Аксенов – студент факультета зоотехнологий и агробизнеса

Анна Владимировна Комиссарова – студентка факультета экономики и бизнеса

Михаил Андреевич Скутель – аспирант, научный сотрудник лаборатории анализа метабеномов

Артем Борисович Исаев – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории анализа метабеномов

#### *Information about the authors*

Roman G. Aksenov, student of the Faculty of Zootechnology and Agrobusiness

Anna V. Komissarova, student of the Faculty of Economics and Business

Mikhail A. Skutel, Postgraduate Student, Researcher of the Metagenome Analysis Laboratory

Artem B. Isaev, Ph.D. (Biol.), Researcher of the Metagenome Analysis Laboratory

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflicts of interests

*Статья поступила в редакцию 30.04.2023*

*Одобрена после рецензирования 06.06.2023*

*Принята к публикации 08.06.2023*

*The article was submitted 30.04.2023*

*Approved after reviewing 06.06.2023*

*Accepted for publication 08.06.2023*