


НОВЫЙ ВИРУЛЕНТНЫЙ БАКТЕРИОФАГ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* KPPK108.1, ИНФИЦИРУЮЩИЙ ШТАММЫ СЕРОТИПА K108

П. В. Евсеев¹, М. М. Шнейдер¹ , Ю. В. Михайлова², А. А. Шеленков², Ю. Г. Янушевич³, М. Г. Карлова⁴, А. В. Моисеенко⁴, О. С. Соколова⁴, Д. А. Шагин³

¹ Институт биохимии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

² Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Мультирезистентные штаммы *Klebsiella pneumoniae* являются одной из самых серьезных причин внутрибольничных инфекций, вызванных бактериями, устойчивыми к антибиотикам. Существуют различные варианты борьбы с этой угрозой, один из них — клиническое использование бактериофагов. Целью работы было выделить и детально охарактеризовать вирулентный бактериофаг, имеющий потенциал для терапевтического применения. Использовали стандартные методы фаговой биологии, биоинформатики, включая современные способы предсказания белковых структур (программа AlphaFold), электронную микроскопию. Из образцов сточных вод был выделен вирулентный подовирус KPPK108.1, относящийся к роду *Drulisvirus*, специфично инфицирующий штаммы *K. pneumoniae*, имеющие капсулярный полисахарид типа KL108, определена последовательность его генома, исследованы его биологические свойства и дана генетическая характеристика.

Ключевые слова: бактериофаг, *Klebsiella pneumoniae*, капсулярный полисахарид, деполимераза

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (ЕГИСУ НИОКТР № 121052800048-3).

Благодарности: авторы благодарят Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова за консультации по методической части исследования.

Вклад авторов: Д. А. Шагин — концептуализация, руководство исследованием, редактирование рукописи; П. В. Евсеев, А. А. Шеленков — формальный анализ данных секвенирования, редактирование рукописи; М. М. Шнейдер — методология, руководство исследованием; Ю. В. Михайлова — секвенирование, валидация данных; Ю. Г. Янушевич, А. Моисеенко, М. Г. Карлова — методология; О. С. Соколова — электронная микроскопия, методология.

✉ **Для корреспонденции:** Михаил Маркович Шнейдер
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997, Россия; mm_shn@mail.ru

Статья получена: 08.12.2021 **Статья принята к печати:** 22.12.2021 **Опубликована онлайн:** 30.12.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.068

NOVEL *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* VIRULENT BACTERIOPHAGE KPPK108.1 CAPABLE OF INFECTING THE K108 SEROTYPE STRAINS

Evseev PV¹, Shneider MM¹ , Mikhailova YuV², Shelenkov AA², Yanushevich YuG³, Karlova MG⁴, Moiseenko AV⁴, Sokolova OS⁴, Shagin DA³

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

² Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains are one of the major causes of nosocomial infections caused by the antibiotic-resistant bacteria. There are different options for dealing with this threat, among which is the clinical application of bacteriophages. The study was aimed to isolate and describe a virulent bacteriophage, having the potential for therapeutic use. The standard phage biology and bioinformatic methods were used, which included the advanced techniques for protein structure prediction (AlphaFold software), and electron microscopy. The virulent podovirus KPPK108.1, being the member of genus *Drulisvirus*, which is able to specifically infect the *K. pneumoniae* strains with the KL108 type capsular polysaccharide, has been isolated from the wastewater. The sequence of the bacteriophage genome has been defined, the biological properties have been investigated, and the genetic features have been described.

Keywords: bacteriophage, *Klebsiella pneumoniae*, capsular polysaccharide, depolymerase

Funding: the study was funded by the Ministry of Health of the Russian Federation (EGISU R&D № 121052800048-3).

Acknowledgements: the authors wish to thank the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, for advice on research methods.

Author contribution: Shagin DA — research conceptualization, study management, manuscript writing; Evseev PV, Shelenkov AA — formal analysis of sequencing data, manuscript editing; Shneider MM — methodology, study management; Mikhailova YuV — sequencing, data validation; Yanushevich YuG, Moiseenko AV, Karlova MG — methodology; Sokolova OS — electron microscopy, methodology.

✉ **Correspondence should be addressed:** Mikhail M. Shneider
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997, Russia; mm_shn@mail.ru

Received: 08.12.2021 **Accepted:** 22.12.2021 **Published online:** 30.12.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.068

Современная фаготерапия с ее персонализированным подходом основана на детальном исследовании взаимодействия фагов и бактериальных клеток. Одной из важнейших детерминант специфичности в отношении фаг-клетка являются бактериальные углеводы,

экспонированные на клеточной поверхности: О-антигены и капсулярные полисахариды. Капсулярные полисахариды *K. pneumoniae*, являющиеся фактором вирулентности [1], весьма разнообразны по своей структуре. В настоящий момент биоинформационные базы указывают на наличие

не менее 134 генетических вариантов [2]. Для решения задач терапевтической практики необходимо создание коллекции фагов, имеющих преохарактеризованную специфичность, в том числе по способности адсорбции через распознавание капсулярных полисахаридов определенной структуры. Целью исследования было выделить вирулентный фаг, специфически инфицирующий ранее охарактеризованные штаммы *K. pneumoniae*, имеющие капсулярный полисахарид KL108, и всесторонне изучить его с точки зрения биологии и генетики. Для создания всеобъемлющей характеристики вируса были использованы стандартные методы фаговой биологии, электронная микроскопия, а также биоинформатика, включая современные методы предсказания белковых структур (программа AlphaFold).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические штаммы *K. pneumoniae* P224 (1732) и P225 (1333), имеющие капсулярный полисахарид типа K108, были получены из коллекции Института эпидемиологии (Москва, Россия). Для выделения бактериофагов использовали образцы сточных вод из очистных сооружений г. Москвы. К предварительно осветленным центрифугированием образцам сточных вод добавляли сухие компоненты среды для культивирования бактерий (10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта и 5 г/л NaCl), затем среды инокулировали культурой бактериальных клеток в экспоненциальной фазе роста. Культивирование проводили в течение 16 ч при 37 °С, после чего бактериальную культуру инактивировали хлороформом и образцы осветляли центрифугированием. Наличие фагов определяли титрованием по методу агаровых слоев. Выделенный фаг титровали до единичных негативных колоний дважды последовательно. Препаративное наращивание бактериофага проводили в 1 л культуры штамма P224 при 37 °С. Бактериофаг осаждали полиэтиленгликолем и очищали ультрацентрифугированием в градиенте хлористого цезия [3].

Геномную ДНК фага выделяли из очищенного препарата фага путем инкубации в растворе 100 мМ Tris-HCl (рН 7,5), 25 мМ EDTA, 1,5 М NaCl, 2% (w/v) СТАВ, 0,3% (v/v) β-меркаптоэтанола и 50 мг/мл протеиназы К при 50 °С 30 мин, с последующей экстракцией ДНК хлороформом и осаждением путем добавления 0,6 объема изопропилового спирта. Секвенирование генома выполняли на платформе MiSeq, используя набор Nextera DNA library preparation kit (Illumina; USA). Полученные последовательности собирали в единый контиг программой SPAdes v. 3.13 [4].

Эксперимент по оценке продукции фаговых частиц выполнен по описанному ранее протоколу [5].

Фаговые частицы визуализировали методом электронной микроскопии с негативным контрастированием. Препарат фага объемом 3 мкл наносили на покрытую углеродом сеточку 400 mesh. Препарат негативно контрастировали 1%-м уранилацетатом в течение 30 с, изображения получали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEOL JEM-2100 200 kV (JEOL USA Inc., США) при увеличении ×30 000.

Геном бактериофага *Klebsiella phage* KPPK108.1 аннотировали с помощью Prokka [6], используя встроенные базы данных. Предсказание функций закодированных в геноме белков выполняли с помощью поиска BLAST [7] по известным гомологам и сравнения схожих мотивов HMM с помощью онлайн-сервисов HHpred [8] и Phyre2

[9] с использованием баз данных SCOPe70_2.07, ECOD_ECOD_F70 и UniProt-SwissProt-viral70. В качестве критерия достоверного сходства BLAST использовали величину E value < 10⁻⁵, в качестве критерия достоверного сходства сравнения HMM — величины Phyre2 «confidence» и HHpred «probability» более 95%. Генетическую карту формировали с помощью программы Geneious Prime [10].

Последовательности геномов бактериофагов, использовавшиеся для сравнения с фагом KPPK108.1, были загружены из базы данных NCBI Genome [11]. Среднегеномное сходство рассчитывали с помощью онлайн-сервиса VIRIDIC [12] и программы orthoANIu [13]. Филогенетический анализ выполняли методом максимального правдоподобия, реализованным в программе RAXML [14], с применением модели замещения аминокислот GAMMA LG [15] и использованием конкатенированных выравниваний аминокислотных последовательностей основного капсидного белка, большой субъединицы терминазы, ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы. Выравнивания были получены с помощью программы MAFFT [16] и конкатенированы с помощью Geneious Prime [10]. Диаграмму межгеномного сравнения выполняли в программе Easyfig [17] с использованием TBLASTX [7] для нахождения гомологичных областей в геномах.

Модель третичной структуры продукта гена 8 и четвертичной структуры белка хвостового шипа бактериофага *Klebsiella phage* KPPK108.1 строили с помощью программы AlphaFold-Multimer [18, 19]. Структура белка хвостового шипа фага *Enterobacteria phage* φ92 была загружена из базы данных PDB [20]. Расчет электростатического поверхностного заряда белка хвостового шипа проводили с помощью программы APBS [21]. Выравнивание и визуализацию структур выполняли в программе UCSF Chimera [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На бактериальной культуре в агаризованной среде бактериофаг KPPK108.1 образует прозрачные негативные колонии диаметром 5 мм с прозрачным ореолом (рис. 1).

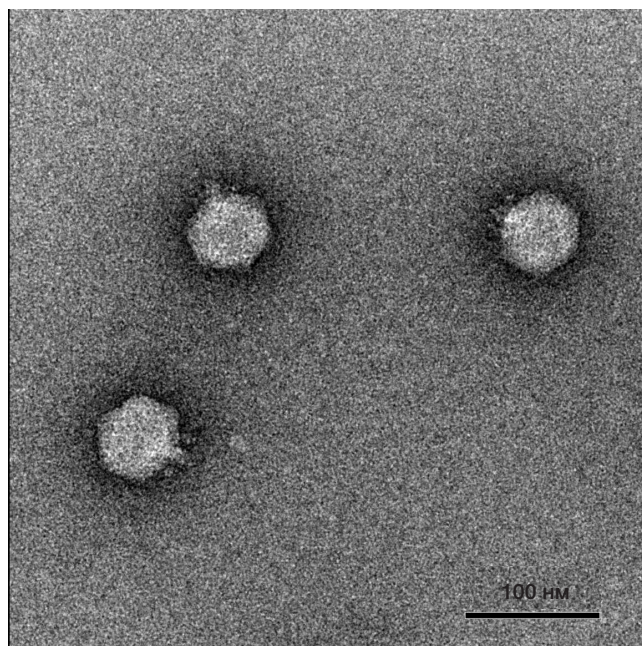


Рис. 1. Электронная микрофотография бактериофага *Klebsiella* KPPK108.1. Негативное контрастирование 1%-м уранилацетатом, увеличение ×30 000

Наличие ореола, как правило, свидетельствует о присутствии фаговой деполимеразы, что в дальнейшем подтвердили генетические исследования. Одностадийная кривая роста продемонстрировала латентный период 15 мин и урожайности фаговых частиц в количестве 46 на одну инфицированную клетку.

Бактериофаг *Klebsiella* KPPK108.1 имеет типичный для фагов семейства *Autographiviridae* геном, состоящий из двухцепочечной ДНК размером 43 755 п.н. с прямыми концевыми повторами размером 244 п.н. ГЦ-состав генома — 53,6%, что несколько ниже значения 57,5%, характерного для отсеквенированного штамма *K. pneumoniae* HS11286 (GenBank Accession CP003200.1). При поиске кодирующих последовательностей в геноме выявлено 56 генов, кодирующих белки, и не обнаружены гены, кодирующие тРНК (рис. 2). Поиск гомологичных и схожих последовательностей с применением алгоритмов BLAST и сравнения мотивов HMM, с использованием публичных баз данных и серверов, позволил предсказать функции 29 белков, закодированных в геноме. Функции 27 белков определить не удалось. Гены интегразы и других белков, присущих умеренным фагам, в геноме обнаружены не были.

Сравнение среднего общегеномного сходства (ANI) с использованием всех 14 923 генов хвостатых бактериофагов, депонированных в базу данных NCBI Genome, выявило группу бактериофагов *Klebsiella*, относящихся к роду *Drulisvirus*, наиболее близких по этому параметру к фагу KPPK108.1 (рис. 3). Значение ANI фага KPPK108.1 и

типичного фага рода *Drulisvirus* *Klebsiella* phage KP34 составляет 73,0%. Филогенетический анализ, проведенный с использованием конкатенированных аминокислотных последовательностей основного капсидного белка, большой субъединицы терминазы, ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы, кластеризует бактериофаги *Drulisvirus* и фаг KPPK108.1 в одну монофилетическую группу (рис. 4). Состав генов и организация генома фага KPPK108.1 в целом напоминают бактериофаг *Escherichia* phage T7 и другие фаги семейства *Autographiviridae* (рис. 5) и практически идентичны таковым у других представителей *Drulisvirus*. Интересной особенностью обладает продукт гена 8. Структурное моделирование показало необычную Г-образную форму белка с С-концевой тубулообразной частью (рис. 6.1). Эта часть характеризуется увеличенным по сравнению со средним количеством положительно заряженных аминокислотных остатков. Моделирование электростатического поля продемонстрировало существенный (до -5) отрицательный поверхностный заряд С-концевой части продукта гена 8 (рис. 6.2).

Биоинформатический анализ генома фага KPPK108.1 выявил наличие генов, кодирующих белки хвостового адаптора и хвостового шипа. Структура белка хвостового шипа была моделирована и проанализирована (рис. 6). Поиск похожих структур показал высокую степень сходства хвостового шипа фага KPPK108.1 и хвостового шипа фага *Enterobacteria* phage -92 (PDB структура 6E0V) (рис. 6), обладающего коланидазной активностью, подтвержденной экспериментально [23].



Рис. 2. Генетическая карта бактериофага *Klebsiella* KPPK108.1. Гены окрашены в цвета в соответствии с функцией их продуктов, указанных в подписи. Стрелки указывают на направление генов в соответствии с их кодирующей функцией

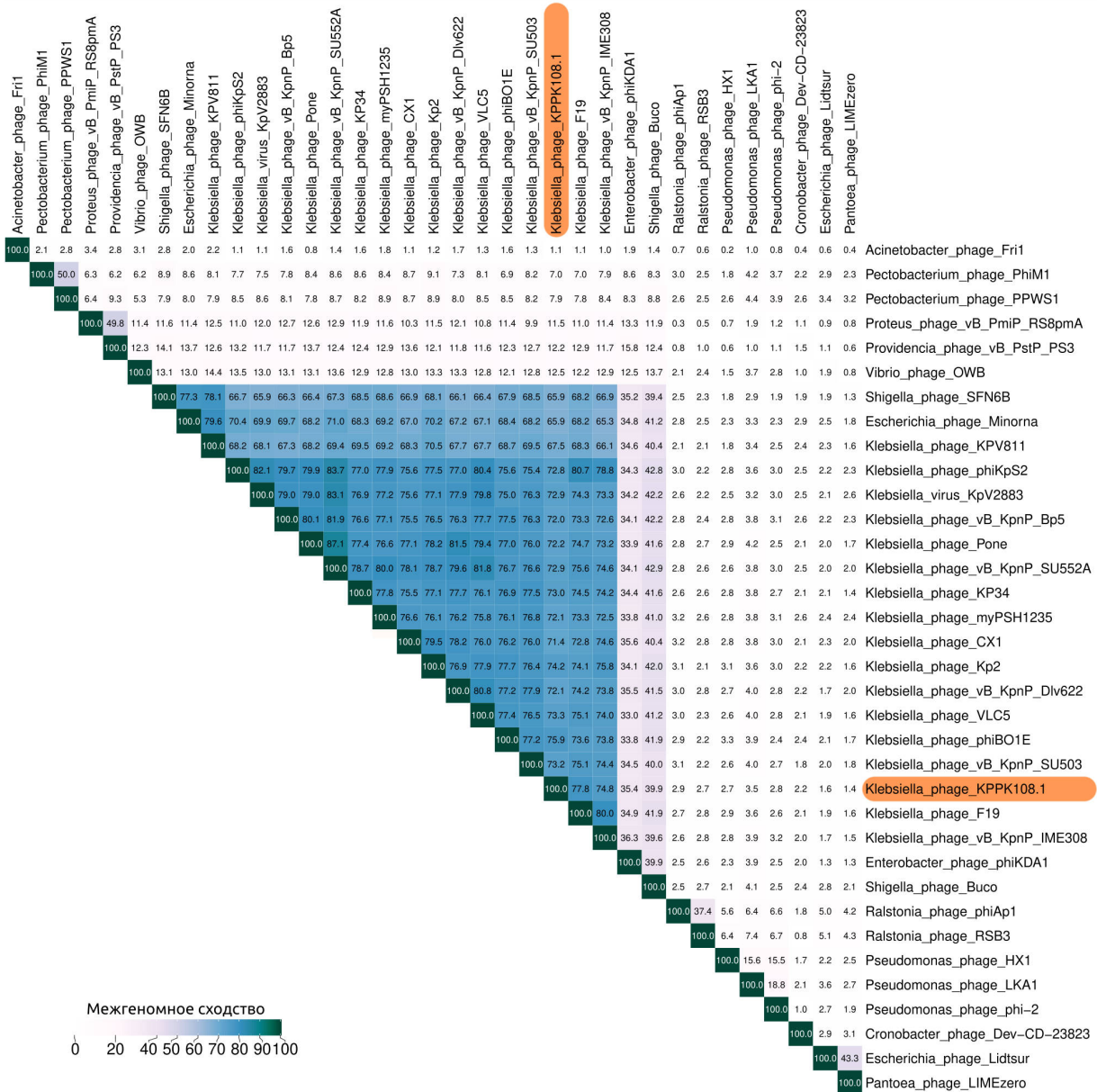


Рис. 3. Матрица среднегеномного сходства фага *Klebsiella* KPPK108.1, полученная с помощью онлайн-сервиса VIRIDIC с использованием геномов различных представителей семейства *Autographiviridae*

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значение общегеномного сходства фагов KPPK108.1 и KP34 выше 70% границы рода вместе с результатами филогенетического анализа с использованием конкатенированных последовательностей консервативных генов указывает на принадлежность бактериофага *Klebsiella* phage KPPK108.1 к роду *Drulivirus* подсемейства *Slopekvirinae* семейства *Autographiviridae*. Этот вывод подтверждают и результаты межгеномного сравнения. Небольшие различия в организации геномов могут быть объяснены рекомбинационными событиями, сопровождавшими эволюцию бактериофагов *Klebsiella*, что подтверждается присутствием в геноме KPPK108.1 и других родственных бактериофагов генов NHN-эндонуклеазы. Строение генома фага KPPK108.1 типично для бактериофагов семейства *Autographivirinae* и характеризуется наличием региона «ранних генов» [24], который включает ген 8, кодирующий гипотетический белок с необычной Г-образной третичной структурой.

Хотя функция этого белка была определена не поиском гомологов с помощью BLAST или схожих белков с помощью сравнения мотивов HMM, исходя из распределения поверхностного заряда можно было бы предположить, что этот белок мимикрирует нуклеиновую кислоту, как это встречается у белков Ocr, также расположенных в раннем регионе геномов других автографивиридов и мимикрирующих ДНК [25, 26]. Было показано, что белок Ocr эффективно ингибирует систему рестрикции-модификации BREX, облегчая течение фаговой инфекции [27].

Биоинформатический анализ генома фага KPPK108.1 позволяет предсказать состав адсорбционного аппарата, который включает адаптор хвостового шипа и основной белок хвостового шипа, обладающий ферментативной активностью. По всей видимости, белок хвостового шипа является рецептор-связывающим белком (receptor-binding protein, RBP), определяющим специфичность и спектр хозяев фага [28]. Структурный анализ белка хвостового шипа свидетельствует о наличии деполимеризующей активности в отношении полисахарида, предположительно родственного

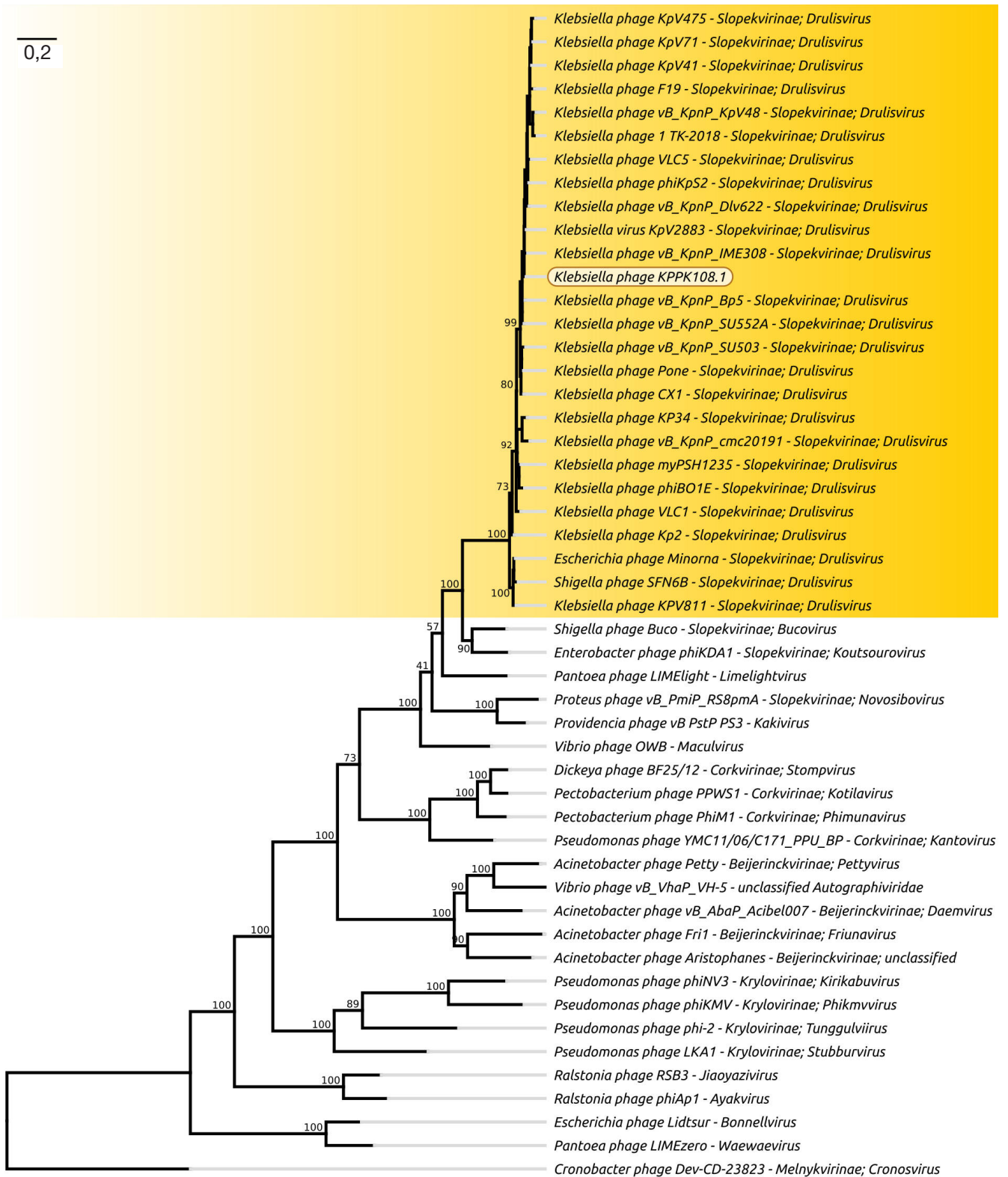


Рис. 4. Филогенетическое древо фага *Klebsiella* KPPK108.1 и других фагов семейства *Autographiviridae*, полученное с помощью программы RAxML с использованием конкатенированных аминокислотных последовательностей основного капсидного белка, большой субъединицы терминазы, ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы

колановой кислоте *E. coli*. Субстратом коланидаз является колановая кислота — внеклеточный полисахарид, состоящий из нескольких видов углеводных остатков (например, L-фукозы, D-глюкозы, D-галактозы и D-глюкуроновой кислоты), секретируемый в среду бактериями семейства *Enterobacteriaceae* [29]. Коланидазы были обнаружены в составе фаговых RBP сравнительно недавно [30], и

присутствуют в ряду вирулентных бактериофагов, относящихся к эволюционно далеким группам, включая подо- и миовирусы [23, 30], часть из которых показала высокую эффективность в составе фаговых коктейлей для фаговой терапии [30]. Необходимо установить структуру капсулярного полисахарида *K. pneumoniae* типа K108, чтобы прояснить вопрос о сходстве этого полимера с колановой кислотой.

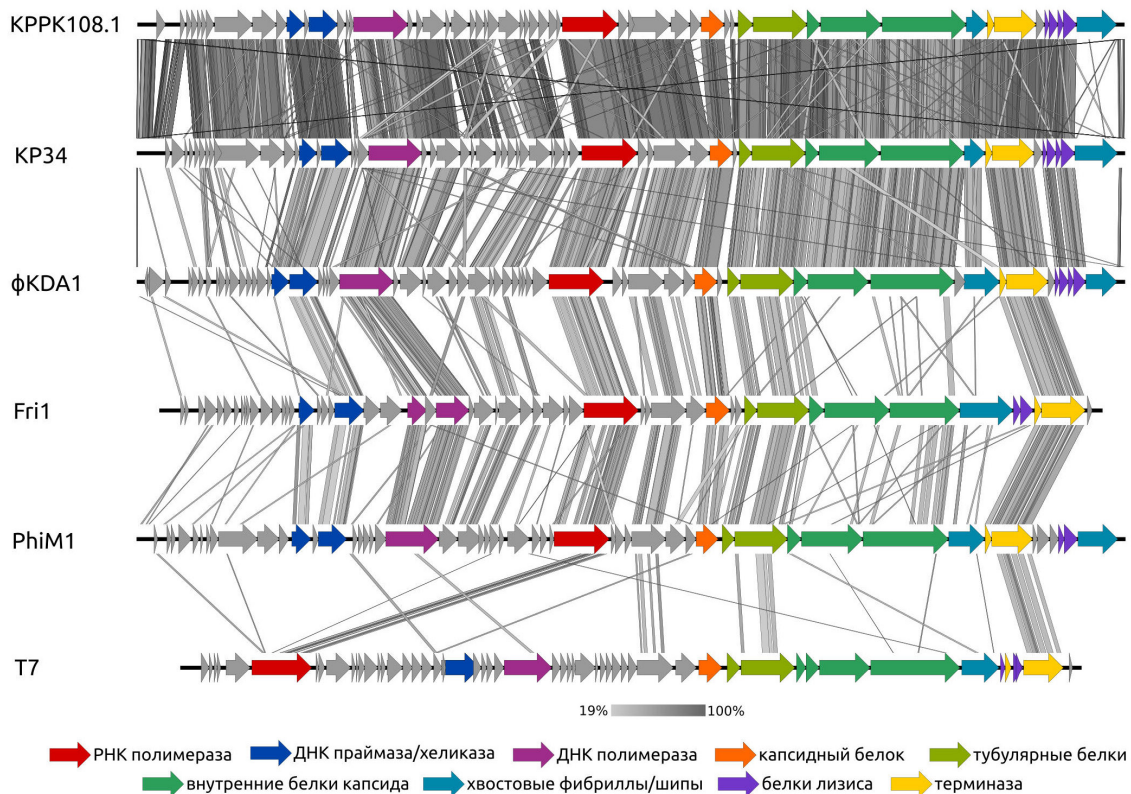


Рис. 5. Диаграмма межгеномного сравнения с использованием геномов фага *Klebsiella* KPPK108.1 и других фагов семейства *Autographiviridae*, полученная с помощью EasyFig и TBLASTX. Вертикальные линии окрашены в соответствии со шкалой внизу диаграммы, демонстрирующей степень их сходства

ВЫВОДЫ

Бактериофаг *Klebsiella* KPPK108.1 представляет собой вирулентный бактериофаг, относящийся к роду *Drulisvirus* семейства *Autographiviridae*. Детальный биоинформатический анализ свидетельствует о литическом образе инфекционного цикла фага и позволяет предсказать структуру адсорбционного

аппарата фага из адаптора хвостового шипа и белка хвостового шипа, обладающего коланидазной активностью. Предсказанные характеристики бактериофага KPPK108.1 свидетельствуют о перспективности его применения в составе фаговых коктейлей в целях фаговой терапии. Насколько нам известно, это первый полностью охарактеризованный фаг, специфичный капсулярному типу KL108.

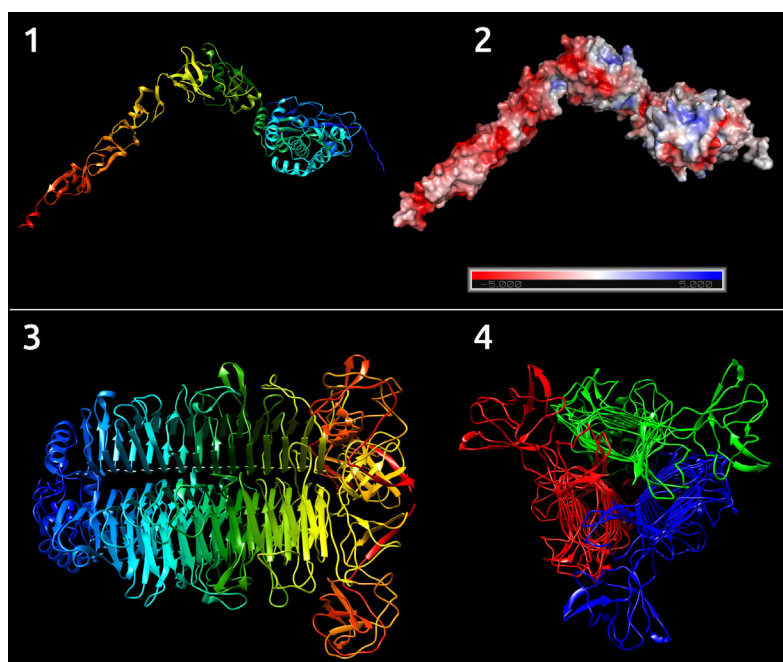


Рис. 6. Предсказанная третичная структура продукта гена 8 фага KPPK108.1, окрашенная в цвета радуги, где синий цвет соответствует N-концевой части белка, а красный — C-концевой части белка (1). Предсказанная третичная структура продукта гена 8, окрашенная в соответствии с величиной заряда электростатического поверхностного поля белка (2). Предсказанная третичная структура тримера хвостового шипа фага KPPK108.1, окрашенная в цвета радуги, где синий цвет соответствует N-концевой части белка, а красный — C-концевой части белка, вид вдоль продольной оси (3). Предсказанная третичная структура тримера хвостового шипа фага KPPK108.1 с мономерами, окрашенными в разные цвета со стороны поперечной оси (4)

Литература

- Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80 (3): 629–61.
- Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR, et al. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microb Genom.* 2016; 2 (12): e000102.
- Colombet J, Robin A, Lavie L, Bettarel Y, Cauchie HM, Sime- Ngando T. Virioplankton “pegylation”: use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems. *J Microbiol Methods.* 2007; 71 (3): 212–9.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012; 19 (5): 455–77.
- Drulis-Kawa Z, Mackiewicz P, Kęsik-Szeloch A, Maciaszczyk-Dziubinska E, Weber-Dąbrowska B, Dorotkiewicz-Jach A, et al. Isolation and characterisation of KP34 — a novel ϕ KMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 90 (4): 1333–45.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014; 30 (14): 2068–9.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215 (3): 403–10.
- Gabler F, Nam S-Z, Till S, Mirdita M, Steinegger M, Söding J, et al. Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit. *Current Protocols in Bioinformatics.* 2020; 72 (1): e108.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 2015; 10 (6): 845–58.
- Geneious. Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis. Geneious [cited 2021 Nov 11]. Available from: <https://www.geneious.com/>
- Home — Genome — NCBI [cited 2021 Nov 11]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>.
- Moraru C, Varsani A, Kropinski AM. VIRIDIC — A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-Infecting Viruses. *Viruses.* 2020; 12 (11): 1268.
- Lee I, Ouk Kim Y, Park S-C, Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016; 66 (2): 1100–3.
- Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014; 30 (9): 1312–3.
- Le SQ, Gascuel O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol.* 2008; 25 (7): 1307–20.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research.* 2002; 30 (14): 3059–66.
- Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics.* 2011; 27 (7): 1009–10.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021; 596 (7873): 583–9.
- Evans R, O’Neill M, Pritzel A, Antropova N, Senior A, Green T, et al. Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. 2021 [cited 2021 Dec 6]. 2021.10.04.463034. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.04.463034v1>.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research.* 2000; 28 (1): 235–42.
- Jurrus E, Engel D, Star K, Monson K, Brandi J, Felberg LE, et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science.* 2018; 27 (1): 112–28.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004; 25 (13): 1605–12.
- Schwarzer D, Buettner FFR, Browning C, Nazarov S, Rabsch W, Bethe A, et al. A Multivalent Adsorption Apparatus Explains the Broad Host Range of Phage phi92: a Comprehensive Genomic and Structural Analysis. *Journal of Virology.* 2012; 86 (19): 10384–98.
- Evseev PV, Lukianova AA, Shneider MM, Korzhenkov AA, Bugaeva EN, Kabanova AP, et al. Origin and Evolution of Studiuvirinae Bacteriophages Infecting *Pectobacterium*: Horizontal Transfer Assists Adaptation to New Niches. *Microorganisms.* 2020; 8 (11): 1707.
- Roberts GA, Stephanou AS, Kanwar N, Dawson A, Cooper LP, Chen K, et al. Exploring the DNA mimicry of the Ocr protein of phage T7. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40 (16): 8129–43.
- Zavilgelsky GB, Rastorguev SM. Antirestriction proteins ArdA and Ocr as efficient inhibitors of type I restriction-modification enzymes. *Mol Biol.* 2009; 43 (2): 241.
- Isaev A, Drobiazko A, Sierro N, Gordeeva J, Yosef I, Qimron U, et al. Phage T7 DNA mimic protein Ocr is a potent inhibitor of BREX defence. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48 (10): 5397–406.
- Zampara A, Sørensen MCH, Grimon D, Antenucci F, Vitt AR, Bortolaia V, et al. Exploiting phage receptor binding proteins to enable endolysins to kill Gram-negative bacteria. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 12087.
- Stevenson G, Andrianopoulos K, Hobbs M, Reeves PR. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol.* 1996; 178 (16): 4885–93.
- Kim H, Kim M, Bai J, Lim J-A, Heu S, Ryu S. Colanic Acid Is a Novel Phage Receptor of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Phage POP72. *Frontiers in Microbiology.* 2019; 10: 143.

References

- Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80 (3): 629–61.
- Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR, et al. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microb Genom.* 2016; 2 (12): e000102.
- Colombet J, Robin A, Lavie L, Bettarel Y, Cauchie HM, Sime- Ngando T. Virioplankton “pegylation”: use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems. *J Microbiol Methods.* 2007; 71 (3): 212–9.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012; 19 (5): 455–77.
- Drulis-Kawa Z, Mackiewicz P, Kęsik-Szeloch A, Maciaszczyk-Dziubinska E, Weber-Dąbrowska B, Dorotkiewicz-Jach A, et al. Isolation and characterisation of KP34 — a novel ϕ KMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 90 (4): 1333–45.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014; 30 (14): 2068–9.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215 (3): 403–10.
- Gabler F, Nam S-Z, Till S, Mirdita M, Steinegger M, Söding J, et al. Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit. *Current Protocols in Bioinformatics.* 2020; 72 (1): e108.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 2015; 10 (6): 845–58.
- Geneious. Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis. Geneious [cited 2021 Nov 11]. Available from: <https://www.geneious.com/>
- Home — Genome — NCBI [cited 2021 Nov 11]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>.

12. Moraru C, Varsani A, Kropinski AM. VIRIDIC — A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-Infecting Viruses. *Viruses*. 2020; 12 (11): 1268.
13. Lee I, Ouk Kim Y, Park S-C, Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016; 66 (2): 1100–3.
14. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014; 30 (9): 1312–3.
15. Le SQ, Gascuel O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol*. 2008; 25 (7): 1307–20.
16. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*. 2002; 30 (14): 3059–66.
17. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*. 2011; 27 (7): 1009–10.
18. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021; 596 (7873): 583–9.
19. Evans R, O'Neill M, Pritzel A, Antropova N, Senior A, Green T, et al. Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. 2021 [cited 2021 Dec 6]. 2021.10.04.463034. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.04.463034v1>.
20. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 2000; 28 (1): 235–42.
21. Jurrus E, Engel D, Star K, Monson K, Brandi J, Felberg LE, et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*. 2018; 27 (1): 112–28.
22. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004; 25 (13): 1605–12.
23. Schwarzer D, Buettner FFR, Browning C, Nazarov S, Rabsch W, Bethe A, et al. A Multivalent Adsorption Apparatus Explains the Broad Host Range of Phage phi92: a Comprehensive Genomic and Structural Analysis. *Journal of Virology*. 2012; 86 (19): 10384–98.
24. Evseev PV, Lukianova AA, Shneider MM, Korzhenkov AA, Bugaeva EN, Kabanova AP, et al. Origin and Evolution of Studiervirinae Bacteriophages Infecting *Pectobacterium*: Horizontal Transfer Assists Adaptation to New Niches. *Microorganisms*. 2020; 8 (11): 1707.
25. Roberts GA, Stephanou AS, Kanwar N, Dawson A, Cooper LP, Chen K, et al. Exploring the DNA mimicry of the Ocr protein of phage T7. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40 (16): 8129–43.
26. Zavilgelsky GB, Rastorguev SM. Antirestriction proteins ArdA and Ocr as efficient inhibitors of type I restriction-modification enzymes. *Mol Biol*. 2009; 43 (2): 241.
27. Isaev A, Drobiazko A, Sierro N, Gordeeva J, Yosef I, Qimron U, et al. Phage T7 DNA mimic protein Ocr is a potent inhibitor of BREX defence. *Nucleic Acids Res*. 2020; 48 (10): 5397–406.
28. Zampara A, Sørensen MCH, Grimmon D, Antenucci F, Vitt AR, Bortolaia V, et al. Exploiting phage receptor binding proteins to enable endolysins to kill Gram-negative bacteria. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 12087.
29. Stevenson G, Andrianopoulos K, Hobbs M, Reeves PR. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol*. 1996; 178 (16): 4885–93.
30. Kim H, Kim M, Bai J, Lim J-A, Heu S, Ryu S. Colanic Acid Is a Novel Phage Receptor of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Phage POP72. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10: 143.