

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Molekulinės biologijos studijų magistrantūros programos II kurso studentas

Paulius Vytautas Sungaila

Magistro baigiamasis darbas

Naujai izoliuotų *Myoviridae* šeimos virusų fiziocheminių bei genetinių savybių tyrimas

Darbo vadovė: Dr. Laura Kalinienė

Vilnius

2021

Naujai izoliuotų *Myoviridae* šeimos virusų fiziocheminių bei genetinių savybių tyrimas

Magistrinis darbas atliktas Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje.

Paulius Vytautas Sungaila

/parašas/

Darbo vadovė dr. Laura Kalinienė

/parašas/

TURINYS

Santrumpos	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1 Bakteriofagų įvairovės tyrimai, reikšmė ir panaudojimas	8
1.2 <i>Myoviridae</i> šeimos virusai	11
1.2.1 Miovirusų paieškos ir charakterizavimo svarba.....	13
1.2.2 <i>Myoviridae</i> šeimos virusų genomai	14
1.2.3 Miovirusų fiziocheminės savybės	14
1.3 Fiziocheminių savybių tyrimų reikšmė	15
1.4 Fagų geno modifikacijos	16
1.5 Bakteriofagų depolimerazinis aktyvumas	17
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	19
2.1 Tyrimo objektai	19
2.2 Mitybinės terpės ir tirpalai	19
2.3 Reagentai	20
2.4 Bakterijų kamienai ir plazmidės.....	20
2.5 Prietaisai	20
2.6 METODAI	21
2.6.1 Bakteriofagų šeimininkų auginimas.....	21
2.6.2 Bakteriofagų dauginimas	21
2.6.3 Fagų titro nustatymas	21
2.6.4 Fagų gryninimas cezio chlorido gradiente	22
2.6.5 Terminės inaktyvacijos įvertinimas	22
2.6.6 Skirtingo pH poveikio viriono stabilumui testas.....	23

2.6.7 Osmosinio šoko tyrimas	23
2.6.8 Detergentų ir organinių tirpiklių poveikio tyrimas	23
2.6.9 Genominės DNR išskyrimas ir hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis	23
2.7 DNR sintezė in vitro naudojant <i>phi29</i> polimerazę	24
2.7.1 DNR fragmentų ligavimas	24
2.7.2 <i>E. coli</i> ląstelių transformacija.....	25
2.7.3 Patikros PGR	25
2.7.4 Plazmidinės DNR išskyrimas.....	25
2.7.5 Atsitiktinių genomo sekų analizė bioinformatiniais metodais	25
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	26
3.1 Depolimerazinio aktyvumo tyrimas	26
3.2 Terminės inaktyvacijos poveikis.....	27
3.3 Osmosinio šoko tyrimas	28
3.4 Skirtingo pH poveikis virionų stabilumui	29
3.5 Detergentų ir organinių tirpiklių poveikis.....	29
3.6 Restrikcinė genomų analizė	30
3.7 Genomo fragmentų klonavimas ir sekų analizė bioinformatiniais metodais	36
IŠVADOS.....	40
SANTRAUKA	41
SUMMARY	42
PADĖKA	43
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	44

Santrumpos

ICTV – Tarptautinis virusų taksonomijos (nomenklatūros) komitetas

LPS – lipopolisacharidai

vgDNR – viengrandė DNR (deoksiribonuklearūgštis) molekulė

vgRNR – viengrandė RNR (ribonukleorūgštis) molekulė

dgRNR – dvigrandė RNR (ribonukleorūgštis) molekulė

gDNR – genominė bakteriofagų DNR

16S rRNR – 16S (S – Svedbergo vienetai) ribosominė ribonukleorūgštis

CRISPR – taisyklingai pertraukti trumpi susitelkę palindrominiai pasikartojimai (angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

kb - kilobazė

UV – ultravioletinė spinduliuotė

Tris – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

PBS – fagų praskiedimo buferinis tirpalas

PGR – polimerazės grandininė reakcija

aps. – apsisukimai

a.r – aminorūgštys

LB – mitybinė terpė (angl. Luria-Bertani medium)

NCBI – nacionalinis biotechnologijos informacijos centras (angl. National Center for Biotechnology Information)

OD – optinis tankis (angl. optical density)

PFU – infekcinį centrą formuojantis vienetas (angl. plaque-forming unit)

mL – mililitras

CpG – citozinas, po kurio seka guaninas (angl. cytosine proceeded by guanine)

Dam / dcm – DNR adenino metiltransferazė arba DNR adenino metilinimas / citozino metilinimas

BLASTn – lokalaus nukleorūgščių sugretinimo paieškos įrankis (angl. basic local nucleotide alignment search tool)

BLASTp – lokalaus baltymų sugretinimo paieškos įrankis (angl. basic local protein alignment search tool)

CPS / K antigenas – bakterijų kapsulės polisacharidai

EPS – bakterijos egzopolisacharidai

O antigenas – glikano polimeras, esantis lipopolisacharidų sudėtyje

IVADAS

Bakterijas užkrečiantys virusai vadinami bakteriofagais. Bakteriofagai yra skaitlingiausia ir labiausiai paplitusi virusų grupė biosferoje (Harada, Silva et al. 2018). Naujausi metagenomikos tyrimai rodo, jog 99% žemėje egzistuojančių bakteriofagų yra neištirti, todėl tūkstančiai naujai izoliuotų bakteriofagų genomų neturi aptinkamos homologijos su šiuo metu duomenų bazėse pateiktais virusais (Gregory, Zayed et al. 2019). Daugelis šiuo metu žinomų bakteriofagų priklauso uodeguotųjų fagų būriui – *Caudovirales* (Barylski, Enault et al. 2020). Šiam būriui, remiantis fagų uodegėlės morfologija, priskiriama bent 10 šeimų, iš kurių viena – *Myoviridae*, kurios atstovams būdingos ilgos, susitraukiančios uodegėlės (Adriaenssens, Sullivan et al. 2020), Šiuo metu *Myoviridae* šeimai priskiriama apie 17% identifikuotų uodeguotųjų bakteriofagų (Dion, Oechslin et al. 2020).

Naujų miovirusų paieškos ir charakterizavimo svarbą rodo didėjantis patogeniškų bakterijų atsparumas antibiotikams, skatinantis ieškoti naujų antimikrobinių medžiagų. Miovirusai yra potencialūs kandidatai naujų antimikrobinių baltymų (pvz. endolizinių) paieškai (Matamp and Bhat 2020). Miovirusai dėl savo griežtai virulentiško vystymosi ciklo bei didelio atsparumo įvairiems aplinkos veiksniams galėtų būti naudojami bakteriofagų terapijoje, žemės ūkyje bei maisto pramonėje (Kornienko, Kuptsov et al. 2020). Bakteriofagų pritaikymą šiose srityse iš dalies riboja šiuolaikiniuose tyrimuose skiriamas santykinai didesnis dėmesys fagų genominei analizei, kuri suteikia daugiau žinių apie bakteriofagų genetinę įvairovę bei filogenetinius ryšius ir leidžia ieškoti naujų fermentų, naudojamų biotechnologijose (Jurczak-Kurek, Gąsior et al. 2016). Vis dėlto, siekiant panaudoti bakteriofagus maisto pramonėje, žemės ūkyje bei medicinoje reikėtų įvertinti ir aplinkos veiksnius, kurie gali turėti įtakos bakteriofagų stabilumui bei infekuojamos ląstelės fiziologinei būklei, nes abiotinių veiksnių svyravimai gali sumažinti viruso infekcijos efektyvumą (Fister, Robben et al. 2016). Dėl šios priežasties aprašant naujus bakteriofagus rekomenduojama atlikti išsamesnę fiziocheminių rodiklių analizę (Jurczak-Kurek, Gąsior et al. 2016). Fiziocheminių veiksnių poveikio tyrimai leistų išsamiau iširti bakteriofagų stabilumo ir infektyvumo rodiklius atkuriant ribines bakteriofagų vystymosi sąlygas (Alič, Naglič et al. 2017). Bakteriofagų-bakterijų tarpusavio sąveikos tyrimai, kurie atliekami atsižvelgiant į galimus aplinkos sąlygų pokyčius, gali būti naudingi ne tik plėtojant bakteriofagų terapiją, tačiau siekiant sustabdyti patogeniškų bakterijų protrūkius, prognozuojant bakterijų-virusų koevoliucijos kryptį bei nustatant bakteriofagų sukeltų infekcijų įtaką ekologiniams ciklams bei klimato kaitai (Surgucheva, Filippova et al. 2019).

Magistrinio darbo tikslas: ištirti naujai izoliuotų *Myoviridae* šeimos virusų fiziochemines bei genetines savybes.

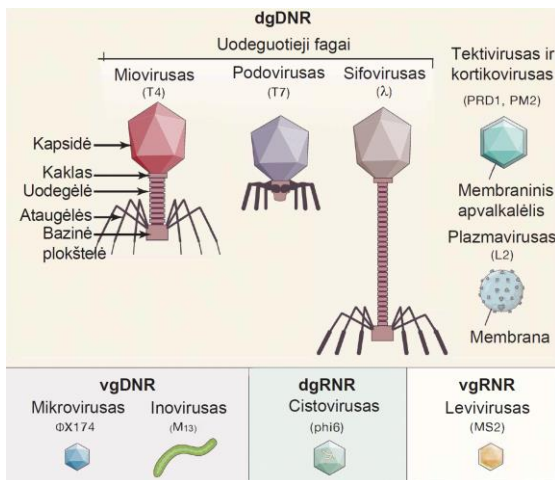
Magistrinio darbo uždaviniai:

1. Atlikti depolimerazinio aktyvumo bakteriofaguose analizę;
2. Atlikti išsamią bakteriofagų infektyvumo rodiklių analizę;
3. Išaiškinti galimas bakteriofagų genomo modifikacijas panaudojant restrikcinę fagų genomines DNR analizę;
4. Ištirti naujai izoliuotų fagų genomų sekų giminingumą duomenų bazėse esantiems virusams.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Bakteriofagų įvairovės tyrimai, reikšmė ir panaudojimas

Bakteriofagai, arba bakterijų virusai, sudaro gausiausią organizmų grupę žemėje (Vlassov, Tikunova et al. 2020). Daugelis šiuo metu žinomų fagų (>85%), turinčių ikosaedrinę galvutę bei dgDNR molekulę, priklauso uodeguotųjų fagų būriui *Caudovirales* (Dion, Oechslin et al. 2020). Remiantis naujausiais ICTV duomenimis, *Caudovirales* būriui priskiriama bent 10 šeimų, tačiau šiuo metu išsamiausiai ištirtos 3 uodeguotųjų fagų šeimos: *Siphoviridae* (ilgos, nesusitraukiančios uodegėlės), *Myoviridae* (ilgos, susitraukiančios uodegėlės) ir *Podoviridae* (trumpos uodegėlės) (Adriaenssens, Sullivan et al. 2020). Naujausi tyrimai rodo, jog vandenyno biomuose taip pat gausu ir filamentinių (*Inoviridae*), pleomorfinių (*Plasmaviridae*) bei diaugiasienių (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* ir *Cystoviridae*) bakteriofagų, kurių genomai sudaryti iš vgDNR, vgRNR bei dgRNR molekulių (Dion, Oechslin et al. 2020).



1 pav. Bakteriofagų morfologinė bei genominė įvairovė (Ofir and Sorek 2018).

Bakteriofagai pasižymi didele genetinė įvairove bei sudėtingais, fagų geno mozaikiškumo nulemtais, tarpusavio evoliuciniais ryšiais, kurių analizavimui negali būti pasitelkiami standartiniai filogenetikos principai (Dion, Oechslin et al. 2020). Bakteriofagai nepasižymi universaliais genų žymekliais, analogiškais 16S rRNR genams bakterijose (López-Pérez, Haro-Moreno et al. 2017).

Pastarųjų metų metagenomikos tyrimai rodo, jog tūkstančiai naujai atrastų bakteriofagų genomų sekų neturi aptinkamos homologijos su duomenų bazėse pateiktais virusais (Gregory, Zayed et al. 2019). Šie rezultatai rodo, jog pagausėję bakteriofagų geno mo sekų nustatymo tyrimai yra ribojami mažo kiekio virusų genomų, kurie šiuo metu pateikti duomenų bazėse (Hurwitz,

Ponsero et al. 2018). Maždaug 60–99% naujai izoliuotų bakteriofagų genomo sekų neturi atitikmenų duomenų bazėse nei aminorūgščių, nei nukleorūgščių lygyje (Casey, Coffey et al. 2017). Nuo bakterijų kultūros nepriklausomi metagenominiai tyrimai su bakteriofagais nors ir leidžia ištirti labai dideles bakteriofagų populiacijas, tačiau fagus bei jų genomus rekomenduojama ištirti įvairiais metodais (1 lentelė) (Hurwitz, Ponsero et al. 2018).

1 lentelė. Bakteriofagų genomų analizės būdai pagal (Hurwitz, Ponsero et al. 2018) ir (Dion, Oechslin et al. 2020).

Bakteriofagų genomų analizės būdai	Metodo principas	Metodo privalumai	Metodo trūkumai
Bakterijų genomo tyrimai	DNR išskiriama iš kultivuojamų bakterijų ir analizuojama ieškant profaginių sekų.	Aptinkamos profago sekos, todėl išsamiau tiriami į bakterijų genomą įsiterpę bakteriofagai.	Profaginės sekos gali turėti netipinę G + C kompoziciją. Profago paieškai gali prireikti iš anksto nustatytų atviro skaitymo rėmelių. Profaginių sekų aptikimo programos nėra tinkamos metagenominei analizei. Didelis kiekis bakterijų yra nekultivuojamos.
Bakterijų metagenomika	Tiriamas vandens, dirvožemio, žarnyno mėginys išskiriant didelį kiekį bakterinės DNR, kurioje ieškoma profaginių sekų.	Aptinkamos profaginės sekos, todėl išsamiau tiriami į bakterijų genomą įsiterpę virusai. Gali būti analizuojami nekultivuojamų bakterijų genomai.	Profago paieškai gali prireikti iš anksto nustatytų bent 3 atviro skaitymo rėmelių. Trumpesnių bakteriofagų genomų sekų lyginimas su žinomais virusais dažnai nerodo jokios homologijos.
Vieno viruso genomo pagausinimo tyrimai	DNR išskiriama iš vieno bakterijose pagausinto bakteriofago, analizuojant pilną viruso genomą arba atsitiktines genomo sekas.	Galimi vieno bakteriofago mikroįvairovės tyrimai. Pavienių bakteriofagų izoliavimas leidžia atlikti išsamesnius genetinių, biocheminių savybių tyrimus, kurie prisideda prie metagenomikos tyrimų. Nustatomas bakteriofagų infekuojamų šeimininkų spektras.	Trumpesnių bakteriofagų genomų sekų lyginimas su žinomais virusais dažnai nerodo jokios homologijos. Didelis kiekis bakterijų išlieka nekultivuojamos, todėl sudėtinga pagausinti virusus.

Virusų metagenomika (viriomas)	DNR išskiriama iš didelio kiekio virusų, surinktų iš dirvožemio, vandens, žarnyno mėginių. Analizuojami bakteriofagų genomai.	Suteikia labai išsamią kiekybinę genomų analizę, todėl leidžia tirti fagų genotipų įvairovę, replikacijos mechanizmus, parodo bakteriofagų gausumą skirtingose populiacijose.	Analizei reikalingi ilgi geno fragmentai. Trumpesnių bakteriofagų genomų sekų lyginimas su žinomais virusais dažnai nerodo jokios homologijos.
--------------------------------	---	---	--

Manoma, jog bakteriofagų įvairovės tyrimus galėtų pagerinti metagenomikos, pavienių virusų genomikos bei nuo bakterijų kultūros priklausomų tyrimų su bakteriofagais tarpusavio sujungimas (Dion, Oechslin et al. 2020). Metagenominiai tyrimai šiuo metu leidžia greitai apibūdinti labai didelį bakteriofagų skaičių, atskleidžiant šių virusų genetinę įvairovę bei gausumą skirtingose populiacijose (Olsen, Forero-Junco et al. 2020). Vieno viruso genomika leidžia atlikti pavienių virusų geno sekoskaitą, todėl, daugėjant duomenų apie genetinę heterogeniškumą vienoje virusų populiacijoje, gali būti palengvinamas bakteriofagų genomų surinkimas metagenominiuose tyrimuose (Imamovic, Ballesté et al. 2016). Nuo bakterijų kultūros priklausomi metodai leidžia izoliuoti virusus bei atlikti išsamesnius genetinius, biocheminius ir fiziocheminius tyrimus, kurių metų gauti rezultatai reikšmingai prisideda prie bakteriofagų praktinio panaudojimo fagų terapijoje, biotechnologijose bei žemės ūkyje (Jurczak-Kurek, Gašior et al. 2016). Nuo bakterijų kultūros priklausomi tyrimai su fagais leido atrasti šiuo metu mokslinėse laboratorijose naudojamas geno redagavimo bei hidrolizės priemones, pvz. restrikcijos endonukleazes ir CRISPR-Cas sistemos baltymus (Rauch, Silvis et al. 2017).

Bakteriofagai ir iš jų pagaminti produktai taip pat vis dažniau naudojami žemės ūkio, maisto pramonės bei aplinkosaugos sektoriuose (Servick 2016). Bakteriofagus bei jų koduojamus baltymus siekiama pritaikyti kovai prieš patogeniškas bakterijų rūšis, pvz. *Agrobacterium sp*, *Erwinia amylovorum* *Listeria sp* ar *Legionella sp*, kurios sukelia įvairias augalų bei gyvūnų ligas (Vandamme and Mortelmans 2019).

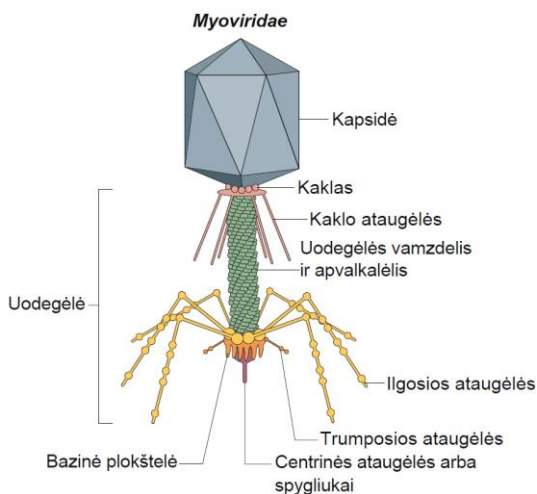
Bakteriofagų aptinkama kiekviename bakterijų turinčiame organizme ir visuose sausumos bei vandenyno biomuose (Nigro, Jungbluth et al. 2017). Vandenynų ekosistemose dėl bakterijoms sukeltos žūties fagai yra laikomi svarbiais ekologinių ciklų (pvz. fosforo, azoto, anglies ciklo) dalyviais (WM Hassan, Abd-ElNaby et al. 2020). Bakteriofagai į šeimininko ląsteles geba įterpti pagalbinius metabolizmo genus AMG (angl. auxiliary metabolic genes), kurie nulemia glikolizės, aminorūgščių sintezės, pentozų fostato ciklo bei kitų biocheminių reakcijų greitį (Hurwitz and

U'Ren 2016). Vadinasi, bakteriofagų sukeltos infekcijos ne tik kontroliuoja bakterinių populiacijų dydį, tačiau taip pat paveikia jų metabolizmą bei fiziologiją, tokiu būdu nulemdamos ir prokariotų evoliucijos kryptį (Vandamme and Mortelmans 2019).

Nepaisant fagų reikšmės ekosistemoms bei milžiniško šių viruso biotechnologinio bei medicininio potencialio, bakteriofagų įvairovė bei šių virusų panaudojimo galimybės šiuo metu yra nepakankamai ištirtos. (Vandamme and Mortelmans 2019). Skaičiuojama, jog bakteriofagų biosferoje galėtų būti randama apie 10^{31} , tačiau šiuo metu duomenų bazėse publikuota tik virš 10000 bakteriofagų genomų, su kuriais yra lyginami naujai izoliuoti bakteriofagai (Olsen, Forero-Junco et al. 2020). Kita vertus, tarptautinis virusų virusų nomenklatūros komitetas (ICTV) nurodo, jog šiuolaikiniuose tyrimuose su naujai izoliuotais bakteriofagais dažnai išvelgiamos pasikartojančios fagų charakterizavimo problemos: neaprašomas fagų vystymosi ciklas, neatliekama išsamesnė morfologinė bei fiziologinių rodiklių analizė (Aziz, Ackermann et al. 2018). Atsižvelgiant į tai, jog bakteriofagai vis dažniau naudojami maisto pramonėje, žemės ūkyje ir medicinoje, svarbu išsamiau ištirti ne tik bakteriofagų genomo savybes, tačiau ir įvairius aplinkos veiksnius, kurie gali turėti įtakos bakteriofagų stabilumui ir infekcijos efektyvumui (Fister, Robben et al. 2016).

1.2 *Myoviridae* šeimos virusai

Remiantis naujausiais *Caudovirales* būriui priklausančių virusų tyrimais, *Myoviridae* virusų šeimai priskiriama apie 17% identifikuotų uodeguotųjų bakteriofagų (Dion, Oechslin et al. 2020). *Myoviridae* šeimai priklausančių bakteriofagų morfotipui būdingos ilgos, susitraukti gebančios ir santykinai storos (80–455 x 16–20 nm) uodegėlės (2 pav.) (Veesler and Cambillau 2011). Pastarųjų metų metagenomikos tyrimai rodo, jog miovirusų morfotipas būdingas ir *Herelleviridae* virusų šeimos atstovams, kurie pasižymi griežtai virulentišku gyvenimo ciklu ir turi maždaug 125–170 kb dydžio genomus (Barylski, Kropinski et al. 2020). Taigi, klasifikuojant naujai izoliuotus miovirusus rekomenduojama remtis ne tik viruso morfotipu, tačiau ir lyginamosios genomikos bei viso genomo analizės duomenimis (Barylski, Enault et al. 2020).



2 pav. *Myoviridae* šeimai priklausančių virusų morfologija (Nobrega, Vlot et al. 2018).

Miovirusų uodegėlė yra prisitvirtinusi prie kapsidės bei bazinės plokštelės. Miovirusų uodegėlės turi susitraukti gebantį apvaskalėlį, kuris palengvina šeimininko ląstelės pradūrimą infekcijos metu (Nováček, Šiborová et al. 2016). Uodegėlės apatinėje dalyje yra bazinė plokštelė, prie kurios prisitvirtinusių šešios ilgosios ir trumposios ataugėlės (Francki, Fauquet et al. 2012). Žinoma, jog sąveika tarp miovirusų ilgųjų bei trumpųjų ataugėlių su bakterijos paviršiuje esančiais receptoriais (pvz. LPS) skatina uodegėlės susitraukimą (Nobrega, Vlot et al. 2018). Miovirusams būdingos susitraukiančios uodegėlės yra laikomos sudėtingiausiomis genomo perdavimo struktūromis iš visų bakteriofagų (Nobrega, Vlot et al. 2018).

Miovirusai infekuoja plataus spektro bakterijų rūšis, gyvenančias ir vandens (pvz. cianobakterijos), ir sausumos ekosistemose, taip pat patogeniškas bakterijas, kurios siejamos su įvairiomis žmogaus ir gyvūnų ligomis (pvz. patogeniški *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Klebsiella* kamienai) (Šimoliūnas, Kaliniene et al. 2013). Miovirusai gali infekuoti ir gram-teigiamas, ir gram-neigiamas bakterijų rūšis (O'Flaherty, Coffey et al. 2004).

Pasitelkus kiekybinę elektroninę mikroskopiją nustatyta, jog skirtinguose vandenyno regionuose miovirusai yra santykinai gausiausia uodeguotųjų bakteriofagų grupė (López-Pérez, Haro-Moreno et al. 2017). Sausumos ekosistemose (pvz. arktiniame dirvožemyje) miovirusų paplitimas priklauso nuo dirvožemio pH bei kitų, *Siphoviridae* šeimai priklausančių, bakteriofagų kiekio (Adriaenssens, Kramer et al. 2017).

1.2.1 Miovirusų paieškos ir charakterizavimo svarba

Tikimasi, jog per artimiausius kelerius metus smarkiai išaugs bakteriofagų pagrindu pagamintų produktų komercializacija, nes bakteriofagus siekiama panaudoti infekcinių ligų gydymui bei antimikrobinių medžiagų kūrimui maisto pramonėje (Gonzalez-Menendez, Fernandez et al. 2018). Naujai izoliuotus bakteriofagus siekiama pritaikyti maiste esančių patogenų kontrolei, fermose esančių zoonotinių bakterijų skaičiaus mažinimui ir bioplėvelių, susiformuojančių ant pramonės įrenginių, suardymui (Gonzalez-Menendez, Fernandez et al. 2018).

Miovirusų paieškos ir charakterizavimo svarbą rodo didėjantis patogeniškų bakterijų atsparumas antibiotikams, kuris skatina ieškoti naujų antimikrobinių medžiagų. Nustatyta, jog *Myoviridae* šeimos virusų koduojami endolizainai (pvz. LysAm24, LysECD7, ir LysSi3) pasižymi baktericidiniu poveikiu prieš patogeniškus *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, ir *Salmonella typhi* kamienus (Antonova, Vasina et al. 2019). Miovirusai dėl savo griežtai virulentiško vystymosi ciklo, kuris lemia aukštą bakterijų lizės efektyvumą, gali būti naudojami bakteriofagų terapijoje prieš daugybinių atsparumą antibiotikams turinčius *Staphylococcus aureus* kamienus (Kornienko, Kuptsov et al. 2020). Naujausi tyrimai rodo, jog miovirusų koduojami baltymai geba suardyti patogeniškų bakterijų (pvz. *Vibrio parahaemolyticus*) formuojamas bioplėveles (Matamp and Bhat 2020).

Naujai izoliuotų miovirusų charakterizavimas taip pat gali prisidėti prie virusų-bakterijų koevoliucijos tyrimų, nes antagonistinė bakterijų-virusų koevoliucija yra pagrindinis šių organizmų genetinę įvairovę nulemiantis veiksnys, leidžiantis tiksliau nustatyti ne tik mikroorganizmų kilmę, tačiau taip pat išsamiau ištirti bioįvairovės palaikymo mechanizmus skirtingose ekosistemose (Svircev, Roach et al. 2018). Bakterijų koevoliucija su bakteriofagais lemia svarbius fenotipo pokyčius, susijusius su priešvirusinių sistemų susiformavimu (Scanlan, Hall et al. 2015). Nors žinomos daugiau nei 9 priešvirusinės sistemos, šiuo metu išsamiau ištirtos tik 3 priešfaginės sistemos: restrikcijos endonukleazų sistema, leidžiant hidrolizuoti bakteriofagų genomą, CRISPR-Cas, leidžianti apsisaugoti nuo pakartotinės bakteriofago infekcijos, bei nutrauktos infekcijos sistema Abi (angl. abortive infection system), leidžianti virusinės infekcijos metu sukelti ląstelės žūtį (Doron, Melamed et al. 2018). Priešvirusinės sistemos nulemia bakteriofagų geno evoliucijos kryptį, todėl tiriant naujai izoliuotus bakteriofagus rekomenduojama įvertinti ne tik galimas bakteriofagų geno modifikacijas, tačiau išsamiau ištirti bakteriofagų genomo sekas, nes fagai gali koduoti atsparumą antibiotikams suteikiančius genus ar integraciją į bakterijos chromosomą lemiančius genus (Colavecchio, Cadieux et al. 2017). Šios

genomo savybės riboja bakteriofagų pritaikymą medicinoje, žemės ūkyje bei biotechnologijose, todėl turi būti įvertintos eksperimentiškai (Svircev, Roach et al. 2018).

1.2.2 *Myoviridae* šeimos virusų genomai

Myoviridae šeimai priklausantys bakteriofagai apibūdinami kaip nesegmentuotą, linijinę dgDNR turintys virusai (Accetto and Janež 2018). Lyginant su kitais uodeguotaisiais fagais, *Myoviridae* šeimos virusams būdingos didžiausio skermens kapsidės. Dėl šios priežasties miovirusų galvutėse gali būti talpinami didesni nei 200 kb dydžio genomai. Miovirusai, turintys didesnius nei 200 kb dydžio genomus, formuoja atskirą bakteriofagų grupę, kuri vadinama *jumbo* fagais (Hua, Huet et al. 2017). Šiai virusų grupei priskiriamas G bakteriofagas, kurio kapsidės diametras yra 180 nm, o genomo dydis siekia 626 kb, laikomas vienu didžiausiu *Myoviridae* šeimos atstovu (Gonzalez, Monroe et al. 2020). Mažiausias šiuo metu žinomas miovirusas ϕ 1402, užkrečiantis *Bdellovibrio bacteriovorus* bakterijas turi 23 kb dydžio genomą (Ackermann, Krisch et al. 2011). Bakteriofagai, lyginant su kitais organizmais, pasižymi didžiausia genetinė įvairove, todėl naujai izoliuotų miovirusų genomo tyrimai leidžia ieškoti ne tik naujų genų, tačiau taip pat ir naujų fermentų, kurie galėtų būti panaudojami biotechnologijose. Šiuo metu daugelis mokslinėse laboratorijose naudojamų fermentų yra gauti iš nedidelio kiekio kultivuojamų bakteriofagų, pvz. T4, T7, λ , ir Φ 29 (Schoenfeld, Liles et al. 2010). Tyrimai su šiais bakteriofagais leido genų inžinerijoje panaudoti tokius fermentus kaip T4 DNR ligazė ar DNR polimerazė. Šiuo metu mokslininkai yra ištyrę tik apie 1% bakteriofagų genomų, todėl naujai izoliuoti bakteriofagai turi milžinišką potencialą naujų fermentų paieškai (Kropinski 2018). Metagenominiuose tyrimuose dažniausiai analizuojamos geresnėmis savybėmis (pvz. didesniu termostabilumu) pasižyminčios DNR ar RNR polimerazės, tačiau naujų fermentų paieška neturėtų apsiriboti tik su replikacija susijusiais genais ar baltymais (Hayes, Mahony et al. 2017). Šiuo metu siekiama iširti bei atrasti daugiau baltymų, pvz. fagų koduojamų lizinių, kurie galėtų būti panaudojami kaip antimikrobiniai vaistai (Vázquez, García et al. 2018). Miovirusai yra potencialūs kandidatai naujų lizinių paieškai (Antonova, Vasina et al. 2019).

1.2.3 Miovirusų fiziokeminės savybės

Myoviridae šeimai priklausantys fagai, lyginat su sifovirusais ir podovirusais, yra jautresni užšaldymui ir osmosiniam šokui (King, Lefkowitz et al. 2011). Užšaldymo metu susidarę ledo kristalai gali mechaniškai pažeisti bakteriofagus (Alič, Naglič et al. 2017). Naujesni tyrimai rodo, jog kai kurie *Myoviridae* šeimai priklausantys virusai gali būti visiškai atsparūs osmosiniam šokui

(Jurczak-Kurek, Gašior et al. 2016). Miovirusai taip pat pasižymi dideliu jautrumu UV spinduliuotei. Nustatyta, jog kai kurie miovirusai praranda gebėjimą infekuoti ląsteles, jei yra veikiami UV spinduliuote 5-10 minučių (Czajkowski, Ozymko et al. 2014). Lyginant su *Siphoviridae* šeimos bakteriofagais, miovirusai yra atsparesni rūgštims (Brown, Ku et al. 2020). Nors bakteriofagų stabilumo rodikliai skirtingose *Caudovirales* būrio šeimose yra labai skirtingi, iš visų uodeguotųjų fagų miovirusai išsiskiria didžiausiu stabilumu ir atsparumu keičiantis aplinkos sąlygoms (Hassim, Lekota et al. 2020).

1.3 Fiziocheminių savybių tyrimų reikšmė

Skirtingi fiziniai ir cheminiai veiksniai, pvz. temperatūra, rūgštingumas ir druskingumas gali sukelti neigiamus pokyčius viruso struktūrinėse dalyse (pvz. galvutėje bei uodegėlėje) ar viruso genome, todėl bakteriofagai gali prarasti gebėjimą infekuoti ląstelę šeimininkę (Hussein, El-Masry et al. 2019). Šių fiziocheminių veiksnių poveikio tyrimai leistų išsamiau ištirti bakteriofagų stabilumo ir infektyvumo rodiklius keičiantis įvairioms aplinkos sąlygoms (Jurczak-Kurek, Gašior et al. 2016). Eksperimentiškai patvirtinta, jog įvairių abiotinių veiksnių pokyčiai gali neigiamai paveikti bakteriofagų gebėjimą absorbuotis prie bakterijų ir sukelti infekciją (Weynberg 2018). Tokie tyrimai, leidžiantys tiksliau įvertinti bakteriofagų stabilumo rodiklius bei infekuojamos ląstelės fiziologinę būklę (keičiantis aplinkos sąlygoms), yra svarbūs siekiant panaudoti bakteriofagus maisto pramonėje, žemės ūkyje ir medicinoje (Fister, Robben et al. 2016). Viena iš problemų, kylančių šiuolaikiniuose tyrimuose su naujai izoliuotais bakteriofagais, jog nuo bakterijų kultūros priklausomi eksperimentai su fagais dažniausiai yra atliekami laboratorinėmis sąlygomis užtikrinant optimalias bakteriofagų vystymosi sąlygas (Lázaro, Arribas et al. 2018). Tokiu būdu (optimaliose sąlygose) apskaičiuotas bakteriofagų titras nėra patikimas fagų stabilumo rodiklis (Casey, van Sinderen et al. 2018). Išsamesni fiziocheminiai tyrimai su bakteriofagais yra svarbūs, siekiant atkurti ribines bakteriofagų vystymosi sąlygas (Alič, Naglič et al. 2017). Bakteriofagų-bakterijų tarpusavio sąveikos tyrimai, kurie atliekami atsižvelgiant į galimus aplinkos sąlygų pokyčius, gali būti naudingi siekiant sustabdyti patogeniškų bakterijų (pvz. *Vibrio cholerae*) protrūkius (Silva-Valenzuela and Camilli 2019).

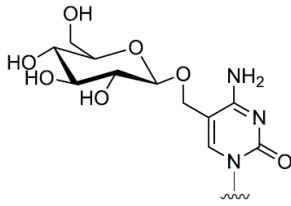
Išsamesni bakteriofagų stabilumo ir vystymosi priklausomybės nuo aplinkos sąlygos pokyčių tyrimai galėtų prisidėti ir prie bakterinių populiacijų ekologijos tyrimų (Shan, Korbsrisate et al. 2014). Žinoma, jog bakteriofagai, infekuodami bakterijas, gali paveikti prokariotinių populiacijų dinamiką, sukelti bakterijų metabolizmo pokyčius bei paveikti įvairių ekosistemų

biogeochemiją (Howard-Varona, Hargreaves et al. 2017). Dėl savo sugebėjimo infekuoti bakterijas ir sukelti jų žūtį bakteriofagai laikomi vienais svarbiausių įvairių ekologinių procesų (pvz. anglies apykaitos ciklo) dalyviais, kurie tiesiogiai nulemia organinių ir neorganinių medžiagų santykį vandenyno ir dirvožemio ekosistemose (Emerson, Roux et al. 2018). Vadinasi, išsamesnis bakteriofagų fiziocheminių rodiklių charakterizavimas leistų išsamiau iširti šių virusų įtaką klimato kaitai (Danovaro, Corinaldesi et al. 2011). Manoma, jog dėl klimato kaitos gali pasikeisti bakterijų ir fagų bakterijų-virusų koevoliucijos kryptis (Surgucheva, Filippova et al. 2019). Tikslus klimato pokyčių poveikis bakteriofagų populiacijoms išlieka nežinomas, tačiau kai kurie tyrimai rodo, jog temperatūriniai pokyčiai turi įtakos nuosaikiams fagams pereinant iš lizogeninio į lizinį ciklą (Lara, Arrieta et al. 2013).

1.4 Fagų genomo modifikacijos

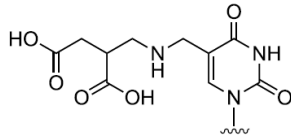
Bakteriofagams būdingos įvairios genomo modifikavimo strategijos, siekiant apsisaugoti nuo bakterijos priešvirusinių sistemų, pvz. R-M (Liu, Dai et al. 2020). Ši II tipo restrikcijos ir modifikavimo sistema (R-M) bakterijose koduoja restrikcijos endonukleazes, kurios hidrolizuoja į ląstelę patekusios svetimės DNR fragmentus (Pingoud, Wilson et al. 2016). Manoma, jog *Caudovirales* būriui priklausantiems bakteriofagams lyginat su kitais organizmais būdinga didžiausia DNR molekulės modifikacijų įvairovė gamtoje (Lee, Dai et al. 2018).

Miovirusų, pvz. T4 bakteriofagų, genome citozinai gali būti modifikuojami vykstant dviems biocheminėms reakcijoms: 5-hidroksimetilnimui bei glikozilnimui. Dėl šių modifikacijų T4 bakteriofagų genomai gali būti visiškai atsparūs daugeliui restrikcijos endonukleazių bei CRISPR-Cas sistemos baltymų (Liu, Dai et al. 2020). Pastaraisiais metais, be metilintų azotinių bazių, bakteriofagų genome nustatomas ir įvairios pirimidinų hipermodifikacijos, pvz. α -glutamildeoksimidinas (α -gluT), α -putrecinildeoksimidinas (α -putT) ar 5-(1-gliukoziloksi)metildeoksicitidinas (5-gmdC) (3 pav.) (Lee, Dai et al. 2018).



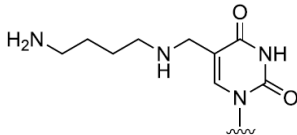
5-(1-gliukozioksi)metildeoksicitidinas (5-gmdC)

Escherichia coli bakteriofagas T4



α -glutamildeoksitimidinas (α -gluT)

Bacillus subtilis bakteriofagas SP10



α -putrecinildeoksitimidinas (α -putT)

Delftia acidovorans bakteriofagas ϕ W-14

3 pav. Pirimidinų hipermodifikacijos skirtinguose bakteriofaguose (Lee, Dai et al. 2018)

Didžioji dalis fagų genomo modifikacijų bei jų biocheminių susidarymo kelių išlieka nežinomos, todėl naujų miovirusų paieška bei charakterizavimas yra svarbūs genomo modifikacijų įvairovės bei biologinės reikšmės tyrimams (Lee, Dai et al. 2018). Pastaraisiais metais atrandama vis daugiau naujų genomo modifikacijų *Myoviridae* šeimos atstovuose, pvz. 2-deoksi-7-amido-7-deazaguaninas (Hutinet, Kot et al. 2019).

1.5 Bakteriofagų depolimerazinis aktyvumas

Bakterijų paviršiuje esantys polisacharidai atlieka svarbią funkciją bioplėvelių susidaryme ir nulemia bakterijų virulentiškumą bei sąveikos su bakteriofagais būdus (Schmelcher and Loessner 2016). Skirtingų bakterijų lipopolisacharidai dažnai yra atpažįstami bakteriofagų uodegėlės ataugėlių baltymų tokiu būdu prisitvirtinant prie šeimininko ląstelės (Knecht, Veljkovic et al. 2020). Bakterijų paviršiniai polisacharidai, pvz. kapsulės polisacharidai (CPS), egzopolisacharidai (EPS), gali sumažinti bakteriofagų absorbcijos efektyvumą neleidžiant viruso baltymams sąveikauti su pirminiais fagų receptoriais, taip pat slopinti naujų virionų išlaisvinimą iš infekuotos ląstelės (Oliveira, São-José et al. 2018).

Bakteriofagai geba išvengti šių ląstelės šeimininkės polisacharidinių barjerų, koduodami depolimerazes. Depolimerazėmis vadinami baltymai, chemiškai prisitvirtinę prie bakteriofagų struktūrinių dalių (pvz. ilgųjų uodegėlės ataugėlių) bei bakteriofagų koduojami endolizinais (Knecht, Veljkovic et al. 2020). Endolizinais yra peptidoglikano hidrolazės (PGH), gaminamos bakteriofagų lizinio ciklo pabaigoje siekiant suardyti bakterijų sienelę ir išlaisvinti naujus virionus (Schmelcher and Loessner 2016). Depolimerazės, priklausomai nuo katalizinio mechanizmo, skirstomos į dvi grupes: liazes ir hidrolazes. Dauguma šiuo metu aprašytų depolimerazių priklauso liazėms ir yra nukreiptos į EPS arba LPS suardymą (Olszak, Shneider et al. 2017). Depolimerazinis aktyvumas nuo bakterijų kultūros priklausomuose eksperimentuose su bakteriofagais atpažįstamas, kai aplink fagų infekcinius centrus susiformuoja aureolės pavidalo sritys, kurių skersmuo didėja ilginant inkubacinį infekcijos laikotarpį (Pires, Oliveira et al. 2016).

Bakteriofagų koduojamos depolimerazės galėtų būti plačiai pritaikomos medicinoje ir biotechnologijose, siekiant identifikuoti patogeniškas bakterijas (pvz. *Klebsiella pneumoniae*) ar atliekant jų molekulinį tipavimą, kuris pagrįstas atrankia depolimerazių sąveika su bakterijos paviršiuje išsidėsčiusiais antigenais (V Volozhantsev, M Shpirt et al. 2020). Pastaraisiais metais atrandama vis daugiau endolizinus koduojančių miovirusų, kas rodo šių virusų paieškos bei charakterizavimo svarbą (Antonova, Vasina et al. 2019). Iš 160 depolimerazių, nustatytų įvairiose uodeguotųjų bakteriofagų šeimose, bent 43 depolimerazės koduojamos *Myoviridae* šeimos atstovų (Pires, Oliveira et al. 2016).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Tyrimo objektai

Šiame darbe aprašyti *Myoviridae* šeimos bakteriofagai vB_LadM-OB5, vB_ValM-AVI3, vB_LniM-OBL4A ir vB_LniM-OBL4D buvo atrasti ir išskirti iš Lietuvoje surinktų gamtinių pavyzdžių (obuolių, obuolių lapų ir aviečių) ankstesnių eksperimentų metu. vB_LadM-OB5 bakteriofagas išskirtas iš obuolių. vB_LniM-OBL4A ir vB_LniM-OBL4D fagai išskirti iš obuolių lapų, o vB_ValM-AVI3 fagas išskirtas iš aviečių gamtinių mėginių.

2.2 Mitybinės terpės ir tirpalai

Terpės ar tirpalo pavadinimas	Sudėtis	Gamintojas
LB terpė	Triptonas – 10 g/l, bakto-mielų ekstraktas – 5 g/l, NaCl – 10 g/l, pH 7,0 su 1 N NaOH (~2 mL/l).	Oxoid, Anglija
Agarizuota LB terpė	Bakto-agaras – 12 g/l, bakto-triptonas- 10 g/l, bakto-mielų ekstraktas – 5 g/l, NaCl – 10 g/l, pH 7,0 su 1 N NaOH (~2 mL/l).	Oxoid, Anglija
Minkštas agaras fagams	Bakto-agaras – 6 g/l, bakto-triptonas- 10 g/l, bakto-mielų ekstraktas – 5 g/l, NaCl – 10 g/l.	Merck, Vokietija
Fagų praskiedimo buferinis tirpalas PBS	Na ₂ HPO ₄ – 7 g/l, KH ₂ PO ₄ – 3 g/l, NaCl – 4 g/l, MgSO ₄ × 7 H ₂ O – 0,2 g/l	Merck, Vokietija
TM buferis	10mM Tris-HCl, 10mM MgSO ₄ ; pH 7.2)	Pagaminta Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje
TAE buferinis tirpalas	Tris – 24.4 g/l, ledinė acto rūgštis – 5.71 mL/L, 0,5 EDTA (pH 8,0) – 4 mL/L	Merck, Vokietija
Fagų dializės buferinis tirpalas I	NaCl (3 M), Tris-HCl (50 mM, pH 7,5).	Merck, Vokietija
Fagų dializės buferinis tirpalas II	NaCl (300 mM), Tris-HCl (50 mM, pH 7,5).	Merck, Vokietija
Fagų dializės buferinis tirpalas SM	NaCl (100 mM), Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), MgSO ₄ (8 mM).	Merck, Vokietija

2.3 Reagentai

Reagentai	Gamintojas
DNA Cleanup Micro Kit, CloneJET PCR Cloning Kit ir GeneJET Plasmid Miniprep Kit rinkiniai, natrio acetatas, natrio chloridas, kalcio chloridas, natrio dodecilsulfatas, acetonas, DNR ladder Mix, MassRuler High range DNA Ladder, Dream Taq PCR Master Mix, phi29 DNR polimerazė, DNazė ir RNazė, T4 ligazė, restrikcijos endonukleazės: DraI, DpnI SmaI, EcoRI, EcoRII, Ecl136II, NaeI, HpaI, AluI, ScaI, MssI, MboI PvuII, StuI, SnaBI, EheI, SwaI, PsyI, NruI, NotI, NsbI, HindII, BoxI, Psy, XhoI, BglI, NcoI, Pfl23II, NdeI, SspI, KpnI, BamHI, XhoI, SacI, AlwI, XbaI ir HindIII, oligonukleotidai: pJET1.2F, pJET1.2R ir atsitiktiniai heksameriniai pradmenys	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
Agarozė, etidžio bromidas	Serva, Vokietija
Ampicilinas, etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA), fenolis, formaldehididas	Roth, Vokietija
Chloroformas	Reachim, Rusija
Etanolis	Vilniaus degtinė, Lietuva

2.4 Bakterijų kamienai ir plazmidės

Bakterijų kamienas	Ypatybės	Šaltinis
<i>E. coli DH10B</i>	F ⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 n upG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ-	Stratagene
<i>Leclercia adecarboxylata</i> OB5	Gamtinis kamienas	Išskirtas šio darbo metu
<i>Vibrio alginolyticus</i> AV	Gamtinis kamienas	Išskirtas šio darbo metu
<i>Lelliottia nimipressuralis</i> O4	Gamtinis kamienas	Išskirtas šio darbo metu
<i>Enterobacter soli</i> O7	Gamtinis kamienas	Išskirtas šio darbo metu
Plazmidės	Savybės	Šaltinis
pJET1.2/blunt	Ap ^r , ori, T7pro	Thermo Fisher Scientific, Lietuva

2.5 Prietaisai

Šio darbo metu naudoti prietaisai: vandeninė purtyklė OLS 200 (Grant, Jungtinė karalystė), orinė purtyklė KS 4000 ic control (IKA, Kinija), centrifugos: *Centrifuge 5804* (Eppendorf, Vokietija) *R*, *Centrifuge 5424* (Eppendorf, Vokietija), centrifuga „Beckman“, rotorius SW40 (Beckman,

Jungtinė karalystė), PGR aparatas *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Vokietija), spektrofotometras *BioPhotometer* (Eppendorf, Vokietija), šildoma purtyklė *Thermomixer compact* (Eppendorf, Vokietija), maišyklė *Mixer 5432* (Eppendorf, Vokietija), laminarinė traukos spinta Biowizard Standard Std-130 (Kojair, Suomija), UV šviesos transiluminatorius (Herolab, Vokietija).

2.6 METODAI

2.6.1 Bakteriofagų šeimininkų kultivavimas

Bakterinių ląstelių kultūros (*Leclercia adecarboxylata* gamtinis kamienas OB5, *Lelliottia nimipressuralis* gamtinis kamienas O4 ir *Vibrio alginolyticus* gamtinis kamienas AV) buvo auginamos LB terpėje 37°C, kol optinis tankis (OD₆₀₀) pasiekė 0,4-0,8. Užaugintos bakterijų kultūros buvo naudojamos bakteriofagų vB_LadM-OB5, vB_LniM-OBL4A, vB_LniM-OBL4D ir vB_ValM-AVI3 padauginimui ir fiziocheminių bei genetinių savybių nustatymui.

2.6.2 Bakteriofagų dauginimas

Fagų padauginimas buvo atliekamas dvisluoksnio agarų metodu (Adams 1959). Iki tinkamo optinio tankio užaugintos 0.5 mL bakterijų kultūros sumaišoma su 0,1 mL atitinkamo skiedimo fagų lizės zonos suspensijos ir 3 mL išlydytos 51 °C, 0,5 % LB agarizuotos terpės. Susidaręs mišinys paskirstomas ant 1,0 % agarizuotos terpės Petri lėkštelėje. Tokiu būdu gaunamas dvisluoksnis agaras, kurio viršutiniame sluoksnyje pasiskirsto bakterijos ir fagai, o apatiniame mitybinis agaras. Petri lėkštelės, atsižvelgiant į optimalias bakteriofagų vystymosi temperatūras, inkubuojamos 21°C (vB_ValM-AVI3), 30°C (vB_LadM-OB5 ir vB_LniM-OBL4A) ir 37°C (vB_LniM-OBL4D) 24 val. Po inkubacijos fagų kolonijos atpažįstamos iš skaidrių arba drumstų lizės zonų viršutiniame agarų sluoksnyje. Viršutinis agarų sluoksnis surenkamas sterilia stikline plokštele į atskirus mėgintuvėlius ir suspenduojamas 1-2 mL PBS (su MgSO₄). Į mėgintuvėlius papildomai įdedama 200 µl chloroformo bei 2 µl Dnazės/Rnazės mišinio. Tokie mėgintuvėliai laikomi 1 val., 20-25 °C vandens purtyklėje. Po valandos visi mėgintuvėliai centrifuguojami 12 min, 12 °C, 4200 aps./min. Po centrifugavimo į atskirus 1,5 mL mėgintuvėlius surenkamas susidaręs supernatantas, kuris yra titruojamas.

2.6.3 Fagų titro nustatymas

Tiriamų bakteriofagų titro nustatymui į 51 °C termostate laikomus mėgintuvėlius su 3 mL minkšto agarą įpilama 0,5 mL bakterijų kultūros, užaugintos iki $OD_{600}=0,4-0,5$. Į šiuos mėgintuvėlius įnešamos skirtingo skiedimo (10^6-10^9) fagų suspensijos. Susidaręs mišinys paskirstomas ant agarizuotos LB terpės Petri lėkštelėje, kuri vėliau inkubuojama termostate 12-14 val., fago vystymuisi tinkamoje temperatūroje. Po inkubacijos skaičiuojamos pavienės fagų lizės zonos viršutiniame agarų sluoksnyje. Bakteriofagų titras apskaičiuojamas atsižvelgiant į skiedimo laipsnį ir lizės zonų skaičių. Pagausintų bakteriofagų, kurie toliau bus naudojami fiziocheminei analizei, suspensijos titras siekia apie $1 \times 10^{10-11}$ PFU/mL.

2.6.4 Fagų gryninimas cezio chlorido gradientu

Padaugintų bakteriofagų suspensijos prieš tolimesnius tyrimus buvo gryninamos naudojant cezio chlorido gradientą pagal (Sambrook, Fritsch et al. 1989) aprašytą metodą su modifikacijomis. Fagų suspensijos buvo pernešamos į mėgintuvėlius su paruoštu 1,1, 0,9, 0,7 ir 0,5 g/mL cezio chlorido gradientu. Tuomet mėgintuvėliai buvo centrifuguojami 2-3 val., 4 °C, 24000 aps./min greičiu (centrifuga „Beckman“, rotorius SW40). Po centrifugavimo iš mėgintuvėlių bakteriofagų suspensija buvo surenkama švirkštu ir dializuojama (4 °C) po 30min buferiniuose tirpaluose (I ir II buferyje) su skirtinga druskų koncentracija. Galiausiai fagų suspensija buvo dializuojama 2-18 val. SM buferyje. Po dializės pakartotinai apskaičiuojamas surinktų bakteriofagų titras.

2.6.5 Terminės inaktyvacijos įvertinimas

Terminės inaktyvacijos tyrimas buvo atliktas pagal (Verma, Harjai et al. 2009) aprašytą metodą su modifikacijomis. 10 µl fagų suspensijos perkeliama į keturis mėgintuvėlius, kurių kiekvienas atitinkamai laikomi -20 °C (12, 24 ir 36 val.), 40 °C (40 min.), 62 °C (40 min.) ir 95 °C (5 min). Po fagų inkubacijos skirtingose temperatūrose, pasirošiamos skirtingo skiedimo (10^6-10^9) fagų suspensijos, kurios naudojamos bakteriofagų padauginimui dvisluoksni agarų metodu. Papildomai pasirošiamas dar vienas mėgintuvėlis, kuris naudojamas kaip kontrolė. Po mišinio su fagais ir bakterijomis inkubacijos 12 val. atliekamas susidariusių infekcinių centrų skaičiavimas. Terminės inaktyvacijos poveikis skirtingiems bakteriofagams įvertinamas apskaičiuojant santykinį (lyginant su kontrole) infekcinių židinių skaičių.

2.6.6 Skirtingo pH poveikio viriono stabilumui testas

Rūgštinio ir šarminio pH poveikis bakteriofagams buvo vertinamas pagal (Jun, Kim et al. 2013) aprašytą metodą su modifikacijomis. Pasiruošiama LB terpė, kurios pH 2, pH 4, pH 10 arba pH 12. Vėliau 10 µl fagų suspensijos perkeliama į keturis mėgintuvėlius su LB terpe (skirtingų pH) ir vykdoma inkubacija 1 val., 37 °C. Po šios inkubacijos paruošiamos skirtingo skiedimo (10^6 - 10^9) fagų suspensijos, kurios naudojamos bakteriofagų padauginimui dvisluoksniu agaru metodu. Papildomai pasiruošiamas dar vienas mėgintuvėlis su LB terpe (pH 7), kuris naudojamas kaip kontrolė. Skirtingo pH poveikis įvertinamas po 12 val. bakteriofagų inkubacijos su bakterijomis, apskaičiuojant santykinį (lyginant su kontrole) infekcinių centrų skaičių.

2.6.7 Osmosinio šoko tyrimas

Bakteriofagų išgyvenamumas sukiant osmosinį šoką buvo matuojamas bakteriofagus inkubuojant TM buferyje (10mM Tris–HCl, 10mM MgSO₄; pH 7.2) su natrio chloridu (galutinė koncentracija 4.5 M) kambario temperatūroje, 15 min., pagal (Anderson 1950) aprašytą metodą su modifikacijomis. Po šios inkubacijos bakteriofagų suspensija buvo perkeliama į TM buferį be natrio chloridu ir atlikus serijinius skiedimus bakteriofagai buvo išsėjami dvisluoksniu agaru metodu. Bakteriofagai, inkubuoti TM buferyje be natrio chlorido, buvo naudojami kaip kontrolė.

2.6.8 Detergentų ir organinių tirpiklių poveikio tyrimas

Bakteriofagų išgyvenamumas paveikus juos detergentais (0.09% SDS) ir organiniais tirpikliais (63% etanolis, 90% acetonas, chloroformas) buvo nustatytas pagal (Jurczak-Kurek, Gašior et al. 2016) aprašytą metodą modifikacijomis. 10 µl fagų suspensijos perkeliama į skirtingus mėgintuvėlius su 0.09% SDS tirpalu ir vykdoma inkubacija 20 min., 45°C. Po fagų inkubacijos SDS tirpale, fagų suspensijos skiestos LB terpe ir išsėtos dvisluoksniu agaru metodu. Taip pat po 10 µl fagų suspensijos perkeliama į mėgintuvėlius su 60% etanoliumi, 90% acetono ir chloroformo tirpalais. Fagų suspensijos etanolio ir acetono tirpaluose inkubuojamos 1 val., 22 °C, o chloroforme 1,5 val., 4 °C. Po fagų inkubacijos organiniuose tirpikliuose pasiruošiamos skirtingo skiedimo (10^6 - 10^9) fagų suspensijos, kurios išsėjamos dvisluoksniu agaru metodu. Bakteriofagai, saugomi PBS buferyje, buvo naudojami kaip kontrolė. Detergentų ir organinių tirpiklių poveikis įvertinamas po 12 val. bakteriofagų inkubacijos su bakterijomis, apskaičiuojant santykinį (lyginant su kontrole) infekcinių zonų skaičių.

2.6.9 Genominės DNR išskyrimas ir hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

Išskirtų ir pagausintų fagų genominė DNR buvo skiriama ekstrahuojant 100-200 µl fagų suspensiją vienoda tūrio dalimi fenolio (šarminio) ir vienoda tūrio dalimi fenolio/chloroformo mišiniu pagal Carlson ir Miller DNR skyrimo metodiką (Carlson and Miller 1994). Po ekstrakcijos DNR išsodinama 1/10 tūrio dalimi 5 M NaCl ir 2 tūriais 96% etanolio ir laikoma 1 val., -20°C. Po inkubacijos DNR surenkama centrifuguojant 20 min., 12 000-13 000 aps/min. Susidariusios nuosėdos praplaunamos 70 % etanoliu, džiovinamos ir ištirpinamos 50 µl vandens be nukleazių. Prieš restrikciją DNR kokybė įvertinama atliekant DNR elektroforezę 0,8–1,0% agarozės gelyje su etidžio bromidu (0,05%) 1×TAE buferyje. DNR toliau naudojama restrikcijoms reakcijoms, kurios atliktos su DraI, DpnI SmaI, EcoRI, EcoRII, Ecl136II, NaeI, HpaI, AluI, ScaI, MssI, MboI PvuII, StuI, SnaBI, EheI, SwaI, PsyI, NruI, NotI, NsbI, HindII, BoxI, Psy, XhoI, BglI, NcoI, Pfl23II, NdeI, SspI, KpnI, BamHI, XhoI, SacI, AlwI, XbaI bei HindIII restrikcijos endonukleazėmis (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas.

2.7 DNR sintezė *in vitro* naudojant *phi29* polimerazę

Bakteriofago vB_ValM-AVI3 genominė DNR buvo padauginta *in vitro* naudojant atsitiktinius heksamerinius pradmenis (Thermo Fisher Scientific) ir *phi29* polimerazę (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas. Susintetinta DNR toliau buvo naudojama restrikcijos reakcijoms, kurios atliktos su DraI, DpnI SmaI, EcoRI, EcoRII, Ecl136II, NaeI, HpaI, AluI, ScaI, MssI, MboI PvuII, StuI, SnaBI, EheI, SwaI, PsyI, NruI, NotI, NsbI, HindII, BoxI, Psy, XhoI, BglI, NcoI, Pfl23II, NdeI, SspI, KpnI, BamHI, XhoI, SacI, AlwI, XbaI ir HindIII restrikcijos endonukleazėmis (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas.

2.7.1 DNR fragmentų ligavimas

Po bakteriofagų genominės DNR restrikcijos susidarę DNR fragmentai yra išvalomi naudojant DNA Cleanup Micro Kit rinkinį (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas. Išvalyti DNR fragmentai toliau naudojami ligavimo reakcijoms, kurios atliktos naudojantis CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkiniu atsižvelgiant į gamintojo nurodytas rekomendacijas. DNR fragmentai liguojami į pJET1.2/blunt vektorių (Thermo Fisher Scientific).

2.7.2 *E. coli* ląstelių transformacija

Imliosios *E. coli* ląstelės buvo paruoštos ligavimo mišinio transformacijai panaudojant CaCl_2 tirpalą pagal (Sambrook, Fritsch et al. 1989) aprašytą metodą. Ligavimo mišinys sumaišomas su 0.1 mL imliųjų *E. coli* ląstelių ir apie 30 min. laikomas ledinėje vonelėje. Po 30 min. imliosioms ląstelėms sukeliamas temperatūrinis šokas – ląstelės perkeliamos iš ledinės vonelės į 42 °C. Po 2 minučių bakterijos perkeliamos atgal į ledų vonelę. Tuomet suspensija sėjama ant Petri lėkštelių su agarizuota LB terpe, kurios sudėtyje yra 40 µg/mL ampicilino. Lėkštelės inkubuojamos 37 °C, 12 val.

2.7.3 Patikros PGR

Tikslinė kolonija sumaišoma su 5 µl skystos LB terpės, o gautos suspensija naudota PGR nuo kolonijos bandymo metu. PGR Reakcijos vykdytos naudojant pJET1.2F ir pJET1.2R pradmenis (Thermo Fisher Scientific) ir DreamTaq Green PCR Master Mix mišinį (Thermo Fisher Scientific) bei atsižvelgiant į pateiktas gamintojo rekomendacijas. PGR sąlygos parenkamos, remiantis pradmenų lydimosi temperatūra. PGR produktai analizuojami elektroforezės agaroziniame gelyje būdu.

2.7.4 Plazmidinės DNR išskyrimas

Plazmidinė DNR iš gautų rekombinantinių *E. coli* ląstelių buvo skiriama naudojantis GeneJET Plasmid Miniprep Kit rinkiniu pagal jame pateiktas gamintojo rekomendacijas. Išskirtų plazmidžių koncentracija įvertinama elektroforezės agaroziniame gelyje būdu, naudojant MassRuler DNR Ladder Mix (High Range) (Thermo Fisher Scientific). Išgrynintos plazmidės laikomos -20°C ir siunčiamos sekoskaitai į Macrogen firmos sekoskaitos centrą (Olandija).

2.7.5 Atsitiktinių genomo sekų analizė bioinformatiniais metodais

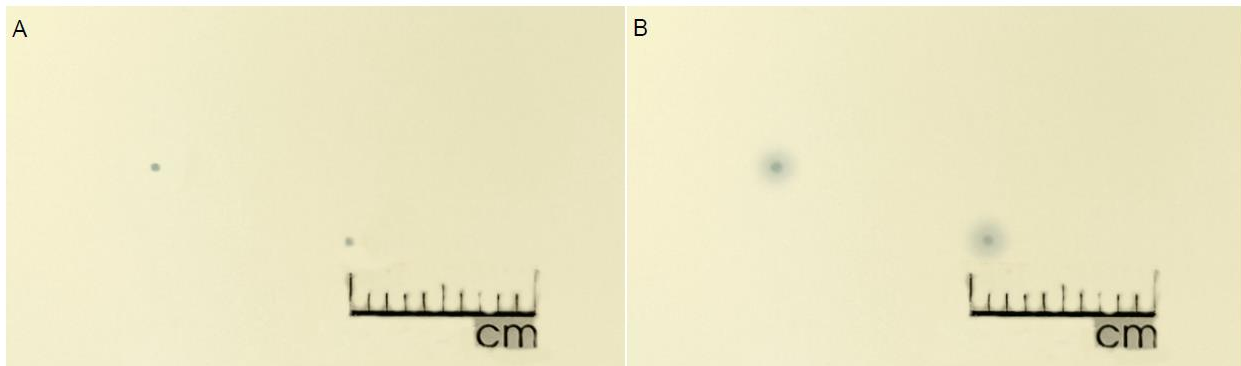
Bakteriofagų vB_LadM-OB5, vB_ValM-AVI3, vB_LniM-OBL4A ir vB_LniM-OBL4D atsitiktinių genomo sekų analizei buvo pasitelktos NCBI duomenų bazės (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) BLASTp, BLASTn ir BLASTx programos.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe aprašyti miovirusai buvo atrasti ir išskirti 2019 metais iš Lietuvoje surinktų gamtinių pavyzdžių: obuolių, obuolių lapų ir aviečių (Vilniaus rajonas). Iš gamtinių mėginių izoliuoti ir charakterizuoti 4 bakteriofagai: vB_LadM-OB5 bakteriofagas išskirtas iš obuolių, vB_LniM-OBL4A ir vB_LniM-OBL4D fagai išskirti iš obuolių lapų, o vB_ValM-AVI3 fagas išskirtas iš aviečių gamtinių mėginių. Ankstesnių tyrimų metu identifikuoti gamtiniai bakterijų kamienai, kuriuos užkrečia šie bakteriofagai, nustatyta infekuojamų šeimininkų spektras bei optimalios fagų vystymosi sąlygos. Šio darbo metu atlikta išsamesnė fiziocheminė, morfologinė bei genomine bakteriofagų analizė: nustatytas galimas depolimerazinio aktyvumo pasireiškimas, iširtas bakteriofagų jautrumas terminei inaktyvacijai, osmosiniam šokui, įvairiems detergentams ir organiniams tirpikliams bei skirtingoms pH, taip pat atlikta išsamesnė bakteriofagų genomines DNR restrikinė analizė, įvertintos galimos bakteriofagų genomo modifikacijos bei atlikta atsitiktinių genomo sekų bioinformatinė analizė.

3.1 Depolimerazinio aktyvumo tyrimas

Analizuojant infekcinių centrų morfologiją buvo pastebėta, jog aplink vB_LniM-OBL4D bakteriofagų lizės zonas, priklausomai nuo infekuojamų bakterijų rūšies kamieno ir inkubacijos trukmės, išsidėsto aureolės pavidalo, skaidrios sritys (4 pav. B), kurios rodo galimą šio viruso depolimerazinį aktyvumą. Šis aktyvumas, priklausomai nuo bakterijų kamienų, kurie buvo infekuojami vB_LniM-OBL4D fagu, pasireiškia skirtingai.



4 pav. A – vB_LniM-OBL4D fago lizės zonų morfologija vystantis *Leclercia adecarboxylata* OB5 kamieno ląstelėse po 12 val. inkubacijos 37 °C. **B** – vB_LniM-OBL4D fago lizės zonų morfologija po 24 val. inkubacijos. Depolimerazinis aktyvumas numanomas iš besiplečiančių, aureolės pavidalo darinių (B).

Depolimerazinis aktyvumas pastebimas vB_LniM-OBL4D bakteriofagais infekuojant *Leclercia adecarboxylata* OB5 bakterijų kamienus po 24 val., tačiau nepasireiškia šiuo virusu užkrečiant *Lelliottia nimipressuralis* O4 ir *Enterobacter soli* O7 bakterijų kamienus. Gauti rezultatai rodo, jog depolimerazinio aktyvumo pasireiškimas yra šeimininkui specifiška savybė. Mokslinėse publikacijose nurodoma, jog depolimerazinis aktyvumas gali priklausyti nuo bakterijų sienelę sudarančių polisacharidų (pvz, K ir O antigenų) (Gallet, Kannoly et al. 2011). Tai patvirtina ir pastarųjų metų tyrimai, kuriuose miovirusų depolimerazinis aktyvumas pasireiškia infekuojant specifiską kapsulės tipą (pvz. K45 ir K30) turinčias *Acinetobacter baumannii* bakterijas (Oliveira, Costa et al. 2019).

Šiuos vB_LniM-OBL4D bakteriofago galimo depolimerazinio aktyvumo pasireiškimo rezultatus ateityje galėtų patvirtintų šio bakteriofago pilno genomo sekoskaita ir analizė, kurios metu vB_LniM-OBL4D fago genome būtų galima aptikti depolimerazes koduojančias genomo sritis.

3.2 Terminės inaktyvacijos poveikis

Šiame tyrime naudoti bakteriofagai buvo inkubuojami skirtingose temperatūrose nuo -20 °C iki 95 °C. Nustatyta, jog visi šiame tyrime naudoti bakteriofagai pasižymi dideliu išgyvenamumu (80-100 proc.) po inkubacijos -20 °C (2 lentelė).

2 lentelė. Terminės inaktyvacijos poveikio įvertinimas

Bakteriofagas	Bakteriofagų išgyvenamumas skirtingose sąlygose (santykinis fagų titras %)					
	-20 °C (12h)	-20 °C (24h)	-20 °C (36h)	40 °C (40 min)	62 °C (40 min)	95°C (40min)
1. vB_LadM-OB5	100	83.4	81.8	8.5	1.8	0
2. vB_LniM-OBL4A	100	87.8	85.6	5.4	0	0
3. vB_LniM-OBL4D	100	85.7	83.1	9.7	2.7	0
4. vB_ValM-AVI3	100	88.9	87.4	1.5	0	0

Taip pat nustatytas didelis tiriamų virionų jautrumas aukštesnei temperatūrai. Didelis fagų titro pokytis stebimas bakteriofagus inkubuojant 40 °C. Šioje temperatūroje bakteriofagų titras sumažėja virš 10 kartų. Didinant temperatūrą iki 62 °C infekcinius centrus dar formavo vB_LadM-OB5 ir vB_LniM-OBL4D bakteriofagai, o didinant temperatūrą iki 95 °C nei vienas šiame tyrime naudotas bakteriofagas nesufurmavo infekcinių centrų.

Šie rezultatai rodo, jog tyrime naudoti bakteriofagai nepasižymi dideliu termostabilumu. Ši bakteriofagų savybė galėtų būti siejama su mažesniu disulfidinių ryšių skaičiumi virione. Panašiuose eksperimentuose būtent gausesnis disulfidinių ryšių skaičius ir specifinės sąveikos tarp polinių arba hidrofobinių aminorūgščių struktūriniuose viruso baltymuose yra siejamos su didesniu virono stabilumu terminės denatūracijos sąlygomis (Ahmadi, Radford et al. 2017).

Siekiant nustatyti tikslus mechanizmus, kurie lemia bakteriofagų jautrumą aukštai temperatūrai, ateityje reikėtų atlikti šiame darbe naudotų virusų proteominę analizę. Kita vertus, gauti rezultatai rodo, jog šiame darbe izoluoti bakteriofagai galėtų būti panaudoti bakteriofagų terapijoje ilgalaikiam saugojimui bei transportavimui dėl savo didelio išgyvenamumo po inkubacijos -20 °C (Vandenheuvel, Lavigne et al. 2015).

3.3 Osmosinio šoko tyrimas

Šiame tyrime naudoti bakteriofagai pasižymėjo dideliu išgyvenamumu (80-100 proc.) po osmosinio šoko sukėlimo virionams. Šie rezultatai nesutampa su literatūriniais duomenimis, nes *Myoviridae* šeimai priklausantys virusai dažnai apibūdinami kaip osmosiniam šokui jautrūs virusai (King, Lefkowitz et al. 2011). Šio ir kitų panašių tyrimų rezultatai rodo, jog kai kurie *Myoviridae* šeimai virusai gali pasižymėti aukštais infektyvumo rodikliais po osmosinio šoko sukėlimo (Jurczak-Kurek, Gąsior et al. 2016).

Osmosinio šoko tyrimo rezultatai rodo, jog tyrime naudotų bakteriofagų kapsidės galimai pasižymi mažesniu pralaidumu vandeniui arba jonams. Jautrumas osmosiniui šokui taip pat galėtų būti siejamas ir su kapsidės morfologija bei jos tvirtumu (Castelnovo and Evilevitch 2007). Vis dėlto, siekiant nustatyti tikslias priežastis, kurios lėmė vB_LadM-OB5, vB_ValM-AVI3, vB_LniM-OBL4A ir vB_LniM-OBL4D fagų aukštą išgyvenamumą po osmosinio šoko, reikalingi išsamesni kapsidės morfologijos ir savybių tyrimai.

3.4 Skirtingo pH poveikis virionų stabilumui

Šiame tyrime naudoti bakteriofagai buvo inkubuojami skirtingose pH, siekiant išsiaiškinti šio veiksnio įtaką virionų stabilumui. Nustatyta, jog visi šiame tyrime naudoti bakteriofagai pasižymi dideliu išgyvenamumu (80-100 proc.) po inkubacijos pH 10 (3 lentelė).

3 lentelė. Skirtingo pH poveikis virionų išgyvenamumui

Bakteriofagas	Bakteriofagų išgyvenamumas skirtingose sąlygose (santykinis fagų titras %)			
	pH 2 37 °C (1h)	pH 4 37 °C (1h)	pH 10 37 °C (1h)	pH 12 37 °C (1h)
1. vB_LadM-OB5	0	73.1	100	6.3
2. vB_LniM-OBL4A	0	65	89.6	8.4
3. vB_LniM-OBL4D	0	63.6	93.6	16.7
4. vB_ValM-AVI3	0	57.1	87.4	2.1

Taip pat nustatytas didelis tiriamų virionų jautrumas rūgštinei pH. Didesnis fagų titro pokytis stebimas bakteriofagus inkubuojant pH 4. Šioje pH buvo stebimas titro sumažėjimas (20-40proc.). Žemesnėje terpėje (pH 2) inkubuoti bakteriofagai nesuformavo nei vieno infekcinio centro. Vis dėlto, šarminėje terpėje (pH 12) inkubuoti bakteriofagai išgyveno formuodami infekcinius centrus. Šioje pH bakteriofagų titras sumažėja nuo 6 (vB_LniM-OBL4D) iki daugiau negu 10 kartų (vB_ValM-AVI3, vB_LniM-OBL4A, vB_LadM-OB5).

Didžiausias išgyvenamumas rūgštinėje terpėje (pH 4) būdingas vB_LadM-OB5 bakteriofagui, o šarminėje (pH 12) vB_LniM-OBL4D bakteriofagui.

Šie rezultatai sutampa su duomenimis, kurie gauti panašiuose moksliniuose tyrimuose. Bakteriofagai, infekuojantys *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijas, dažnai praranda stabilumą rūgštinėse pH (Jończyk, Kłak et al. 2011).

3.5 Detergentų ir organinių tirpiklių poveikis

Šiame tyrime naudoti bakteriofagai buvo inkubuojami tirpaluose su detergentais (0.09% SDS) ir organiniais tirpikliais (63% etanolis, 90% acetonas ir chloroformas). Nustatytas didelis (80-100 proc.) visų tyrime naudotų bakteriofagų išgyvenamumas po inkubacijos etanolio ir chloroformo tirpaluose (4 lentelė).

4 lentelė. Detergentų ir organinių tirpiklių poveikio įvertinimas

Bakteriofagas	Bakteriofagų išgyvenamumas skirtingose sąlygose (santykinis fagų titras %)			
	0.09% SDS 45 °C	63% etanolis (1h)	Chloroformas 4°C (1.5h)	90% acetonas (1h)
1. vB_LadM-OB5	57.1	89.5	100	0
2. vB_LniM-OBL4A	55.4	90.3	100	0.7
3. vB_LniM-OBL4D	63.3	87.4	100	0.9
4. vB_ValM-AVI3	50	88.7	100	0

Didelis bakteriofagų titro sumažėjimas (iki 50%) nustatytas inkubuojant bakteriofagus SDS tirpale. Didžiausias jautrumas SDS būdingas vB_ValM-AVI3 bakteriofagui, kurio titras po virionių inkubacijos SDS tirpale sumažėja 50%. Taip pat nustatyta, jog bakteriofagai vB_ValM-AVI3 ir vB_LadM-OB5 neišgyvena po inkubacijos acetono tirpale, o bakteriofagų vB_LniM-OBL4A ir vB_LniM-OBL4D titras po poveikio acetonu sumažėja virš 99%.

Atsižvelgiant į panašius tyrimus su miovirusais, šio darbo metu nustatytas aukštas vB_LadM-OB5, vB_LniM-OBL4A, vB_LniM-OBL4D ir vB_ValM-AVI3 bakteriofagų išgyvenamumas terpėje su etanolis yra neįprasta bakteriofagų savybė (Jurczak-Kurek, Gašior et al. 2016). Panašiuose tyrimuose didelis bakteriofagų titro sumažėjimas (99 proc.) stebimas bakteriofagus inkubuojant 50% etanolio tirpaluose (Guglielmotti, Mercanti et al. 2012). Šiame darbe nustatytas *Myoviridae* šeimos virusų jautrumas SDS ir acetoniui sutampa su panašių tyrimų duomenis (Jurczak-Kurek, Gašior et al. 2016). Taip pat šiame tyrime naudotas chloroformo tirpalas nepasižymėjo priešvirusiniu poveikiu bakteriofagams. Literatūroje nurodoma, jog apie 30% uodeguotųjų bakteriofagų yra jautrūs chloroformui, nes šis lemia kai kurių virusų infektyvumo sumažėjimą (Hyman 2019). Šie tyrimo rezultatai rodo, jog chloroformo naudojimas tarpiniuose bakteriofagų skyrimo etapuose neturi įtakos galutiniam bakteriofagų stabilumui bei titrui.

3.6 Restrikcinė genomų analizė

Šio darbo metu izoliuotų bakteriofagų genomai buvo hidrolizuojami restrikcijos endonukleazėmis, kurių atpažinimo sekose gausu A/T arba C/G turinčių nukleotidų. Taip pat atsisžvelgta į restrikcijos endonukleazių jautrumą metiliniui bei atpažįstamos sekos ilgį (pvz. heksamerinės, oktamerinės) ir kirpimo pobūdį. Šiame darbe iš viso buvo panaudotos 37 restrikcijos endonukleazės: DraI, DpnI, SmaI, EcoRI, EcoRII, Ecl136II, NaeI, HpaI, AluI, ScaI, MssI, MboI

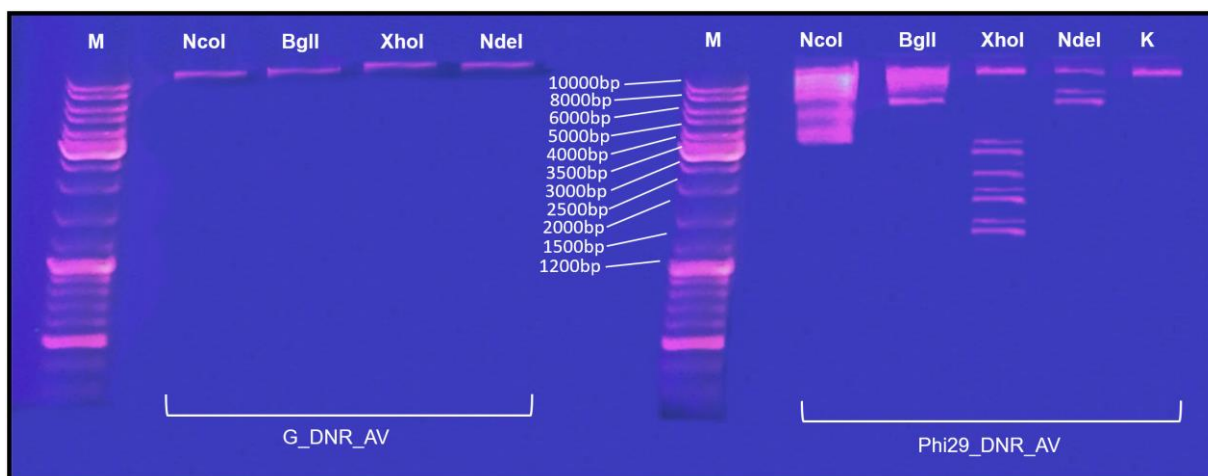
PvuII, StuI, SnaBI, EheI, SwaI, PsyI, NruI, NotI, NsbI, HindII, BoxI, Psy, XhoI, BglI, NcoI, Pfl23II, NdeI, SspI, KpnI, BamHI, XhoI, SacI, AlwI, XbaI, HindIII. Visi bakteriofagų genomų restrikcinės analizės rezultatai pateikti 5 lentelėje.

5 lentelė. Restrikcinės analizės rezultatai.

Fagas	DNR nehidrolizuojančios restriktazės	Restriktazės, hidrolizuojančios išskirtą fagų genomine DNR	Restriktazės, hidrolizuojančios <i>Phi29</i> polimeraze padaugintą DNR
1. vB_ValM-AVI3	DraI, DpnI (jautri dam metilinizacijai), SmaI (jautri CpG metilinizacijai), EcoRI (jautri CpG metilinizacijai), EcoRII (jautri dcm metilinizacijai), Ecl136II (jautri CpG metilinizacijai), NaeI (jautri CpG metilinizacijai), HpaI (jautri CpG metilinizacijai), AluI, ScaI, MssI, MboI (jautri dam metilinizacijai) PvuII, StuI (jautri dcm metilinizacijai), SnaBI (jautri CpG metilinizacijai), EheI (jautri CpG metilinizacijai), SwaI, PsyI, NruI (jautri CpG metilinizacijai), NotI (jautri CpG metilinizacijai), NsbI (jautri CpG metilinizacijai), HindII (jautri CpG metilinizacijai), BoxI (jautri CpG metilinizacijai), PsyI, Pfl23II (jautri CpG metilinizacijai), SspI, KpnI (jautri dcm metilinizacijai), BamHI, SacI, AlwI (jautri dam metilinizacijai), XbaI (jautri dam metilinizacijai), HindIII (jautri dcm metilinizacijai)	-	NcoI, BglI (jautri CpG metilinizacijai), XhoI (jautri CpG metilinizacijai), NdeI
2. vB_LniM-OBL4D	DraI, DpnI, SmaI, EcoRI, EcoRII, Ecl136II, NaeI, HpaI, AluI, ScaI, MssI, MboI, PvuII, StuI, SnaBI, EheI, SwaI, PsyI, NruI, NsbI, HindII, BoxI, PsyI, XhoI, NcoI, Pfl23II, SspI, KpnI, BamHI, XbaI, HindIII	NotI (jautri CpG metilinizacijai), AlwI (jautri dam metilinizacijai), XhoI (jautri CpG metilinizacijai), SacI, NdeI, BglI (jautri CpG metilinizacijai)	
3. vB_LniM-OBL4A	DraI, DpnI, SmaI, EcoRI, EcoRII, Ecl136II, NaeI, HpaI, AluI, MssI, MboI, StuI, SnaBI, SwaI, NruI, NotI, NsbI, HindII, BoxI, PsyI, XhoI, BglI, NcoI, Pfl23II, NdeI, SspI, KpnI, SacI, AlwI, XbaI, HindIII	ScaI, EheI (jautri CpG metilinizacijai), PsyI, PvuII, BamHI ir XhoI (jautri CpG metilinizacijai)	

4. vB_LadM-OB5	DraI, DpnI, SmaI, EcoRI, EcoRII, Ecl136II, HpaI, AluI, MssI, MboI PvuII, StuI, SnaBI, EheI, SwaI, PstI, NruI, NotI, NsbI, HindII, BoxI, XhoI, BglI, NcoI, Pfl23II, NdeI, SspI, KpnI, BamHI, XhoI, SacI, HindIII	ScaI, XbaI (jautri dam metilnimui), AlwI (jautri dam metilnimui), NaeI (jautri CpG metilnimui) ir PstI
-------------------	---	---

Ekperimentų metu nustatyta, jog vB_ValM-AVI3 bakteriofago genomo nehidrolizavo nei viena šiame darbe naudota restrikcijos endonukleazė. Tokius rezultatus galėjo nulėmti dvi priežastys: šio bakteriofago genomas galimai neturi šiame darbe naudotų restrikcijos endonukleazių atpažinimo sričių arba vB_ValM-AVI3 fago genomui būdingos modifikacijos, dėl kurių blokuojama restrikcijos endonukleazių vykdoma DNR hidrolizės reakcija. Siekiant patikrinti galimas genomo modifikacijas, vB_ValM-AVI3 bakteriofago genomo restrikcinė analizė buvo atlikta pakartotinai po šio bakteriofago genomines DNR sintezės *in vitro* su Phi29 DNR polimeraze. Tokiu būdu pagamintą vB_ValM-AVI3 bakteriofago DNR hidrolizavo 4 šiame darbe naudotos restrikcijos endonukleazės: NcoI (C↓CATGG), BglI (GCCNNNN↓NGGC), XhoI (C↓TCGAG), NdeI (CA↓TATG) (5 pav.).

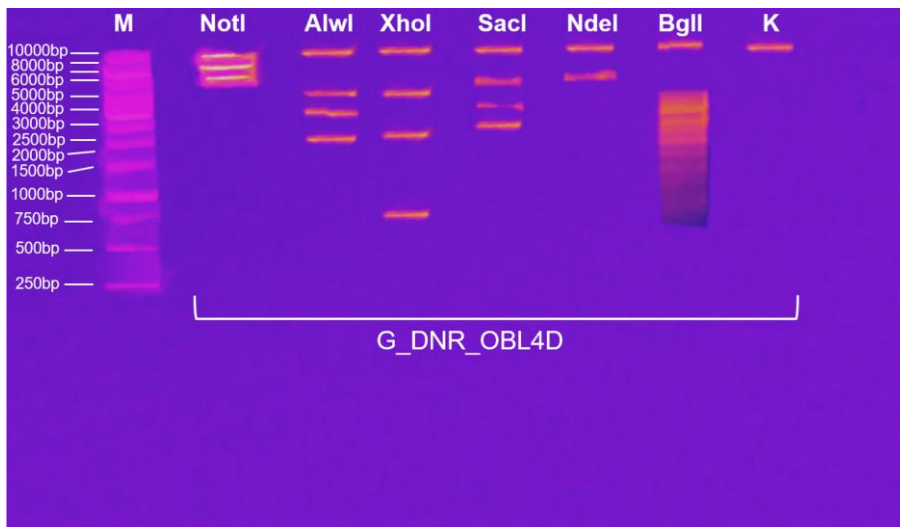


5 pav. vB_ValM-AVI3 bakteriofago genomo restrikcinė analizės rezultatai. Kairėje pusėje: M – markeris (Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix, SM0333), G_DNR_AV – genomine vB_ValM-AVI3 bakteriofago DNR, hidrolizuota NcoI, BglI, XhoI ir NdeI restrikcijos endonukleazėmis. Dešinėje pusėje: M – markeris (Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix SM0333), Phi29_DNR_AV – vB_ValM-AVI3 bakteriofago DNR pagaminta naudojant phi29 polimerazę, hidrolizuota NcoI, BglI, XhoI ir NdeI restrikcijos endonukleazėmis. K – kontrolė, kurioje genomine vB_ValM-AVI3 fago DNR be restrikcijos endonukleazių.

Gauti rezultatai įrodo, jog vB_ValM-AVI3 fagai būdingos genomo modifikacijos. Tiksliai genomo modifikacijų cheminė kilmė nebuvo nustatyta, tačiau atsižvelgiant į XhoI (C↓TCGAG),

jautri CpG metilinimui) restrikcijos endonukleazės jautrumą C ir G metilinimui, genomo modifikacijos galėtų būti susijusios būtent su šių azotinių bazių pakitimais. vB_ValM-AVI3 genomą, pagausintą su phi29 DNR polimeraze, hidrolizavo tik 4 šiame darbe naudotos restrikcijos endonukleazės, kas rodo ne tik galimas šio viruso genomo modifikacijas, bet ir unikalias genomo sekas, kurios leidžia apsisaugoti nuo restrikcijos endonukleazių atpažinimo bei hidrolizės.

Kito bakteriofago, vB_LniM-OBL4D, genomą hidrolizavo 6 šiame darbe naudotos restrikcijos endonukleazės: NotI (GC↓GGCCGC), AlwI (GGATC(4/5)↓), XhoI (C↓TCGAG), SacI (GAGCT↓C), NdeI (CA↓TATG) ir BglI (GCCNNNN↓NGGC) (6 pav.)

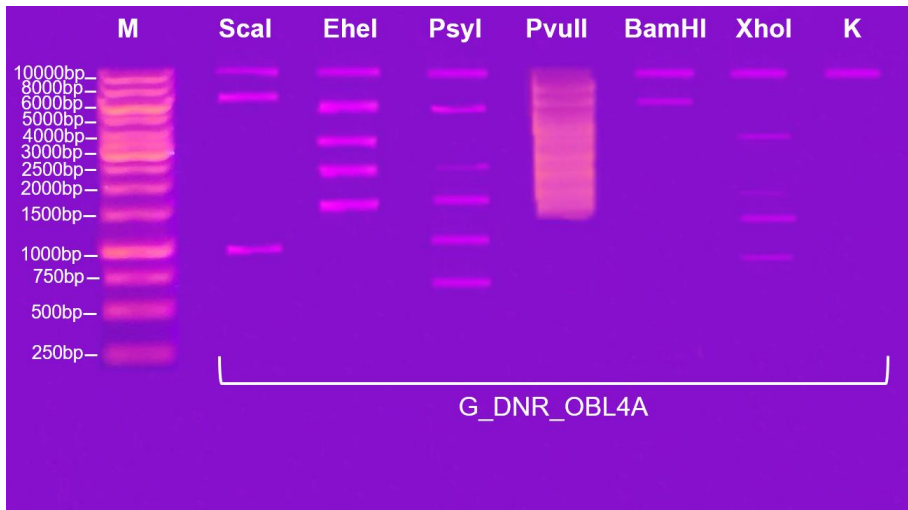


6 pav. vB_LniM-OBL4D bakteriofago genomo restrikcinė analizės rezultatai. M – markeris (Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder, 00643884). G_DNR_OBL4D – genominė vB_LniM-OBL4D bakteriofago DNR, hidrolizuota NotI, AlwI, XhoI, SacI, NdeI ir BglI restrikcijos endonukleazėmis. K – kontrolė, kurioje genominė vB_LniM-OBL4D fago DNR be restrikcijos endonukleazių.

Atsižvelgiant į naudotų restrikcijos endonukleazių jautrumą azotinių bazių metilinimui (NotI ir BglI jautrios CpG metilinimui, AlwI jautri dam metilinimui), restrikcinė bakteriofago vB_LniM-OBL4D genomo analizė rodo, jog šio bakteriofago genomui nebūdingas CpG ir dam metilinimas. Šio bakteriofago (vB_LniM-OBL4D) genominės DNR nejautrumą net 31 šiame darbe naudotai restrikcijos endonukleazei galėjo nulemti dvi priežastys: vB_LniM-OBL4D fago genomas neturi restrikcijos endonukleazių atpažinimo sričių daugeliui šiame darbo naudotų DNR hidrolizuojančių fermentų arba vB_LniM-OBL4D fago genomui būdingos netipinės genomo modifikacijos. Atsižvelgiant į panašius tyrimus su bakteriofagais, pastaraisiais metais atrandama vis daugiau naujų genomo modifikacijų *Myoviridae* šeimos atstovuose, pvz. 7-deazaguanino

modifikacijos, kurios apsaugo fago genomą nuo restrikcijos endonukleazių poveikio. (Hutinet, Kot et al. 2019).

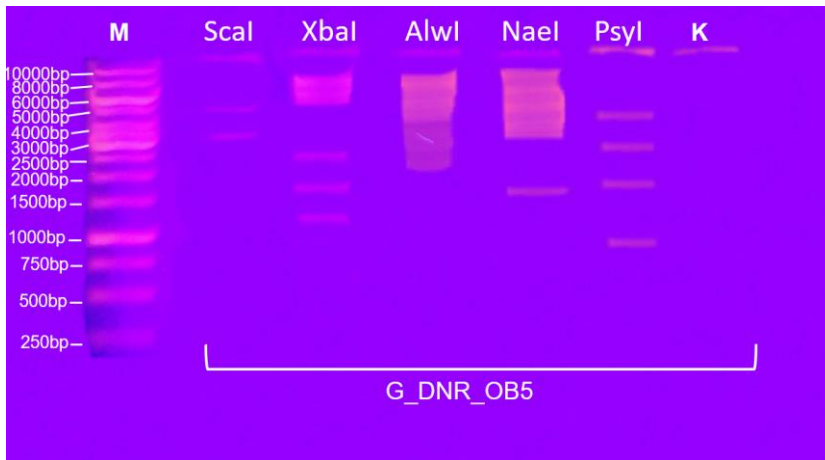
vB_LniM-OBL4A bakteriofago genomą taip pat hidrolizavo 6 šiame darbe naudotos restrikcijos endonukleazės: ScaI (AGT↓ACT), EheI (GGC↓GCC), PstI (GACN↓NNGTC), PvuII (CAG↓CTG), BamHI (G↓GATCC) ir XhoI (C↓TCGAG) (7 pav.)



7 pav. vB_LniM-OBL4A bakteriofago genomu restrikcinė analizės rezultatai. M – markeris (Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder, 00643884). G_DNR_OBL4A – genomine vB_LniM-OBL4A bakteriofago DNR, hidrolizuota ScaI, EheI, PstI, PvuII, BamHI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis. K – kontrolė, kurioje genomine vB_LniM-OBL4A fago DNR be restrikcijos endonukleazių.

Gauti rezultatai rodo, jog vB_LniM-OBL4A bakteriofago genomui nėra būdingas C ir G metilinimas, nes šio fago genomą hidrolizavo EheI restrikcijos endonukleazė, kuri yra jautri CpG metilinimui. vB_LniM-OBL4A bakteriofago genomu restrikcinė analizė rezultatai taip pat rodo ir galimas dam modifikacijas, tačiau gautų rezultatų nepakanka šios modifikacijos buvimui pagrįsti. Nors dam modifikacijoms jautrios restrikcijos endonukleazės (pvz. AlwI) nehidrolizavo vB_LniM-OBL4A genomines DNR, tačiau šiuo atveju išlieka neaišku, ar hidrolizė nevyko dėl dam arba kitos cheminės kilmės modifikacijų, ar unikalių genomu sekų, kurių neatpažino dam metilinimui jautrios restrikcijos endonukleazės. Kaip ir prieš tai buvusių fagų (vB_LniM-OBL4D ir vB_ValM-AVI3) atveju, vB_LniM-OBL4A bakteriofago genomu nehidrolizavo didžioji dalis (31 iš 37) šiame naudotų restrikcijos endonukleazių, kas leidžia manyti, jog šiam bakteriofagui taip pat būdingos arba unikalios, restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekomis nepasižyminčios nukleotidų sekos genome, arba netipinės genomu modifikacijos.

vB_LadM-OB5 bakteriofago genomą hidrolizavo 5 šiame darbe naudotos restrikcijos endonukleazės: ScaI (AGT↓ACT), XbaI (T↓CTAGA), AlwI (GGATC(4/5)↓), NaeI (GCC↓GGC) ir PstI (GACN↓NNGTC). (8 pav.)



8 pav. vB_LadM-OB5 bakteriofago geno restrikcinė analizės rezultatai. M – markeris (Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder, 00643884). G_DNR_OB5 – genomine vB_LniM-OBL4D bakteriofago DNR, hidrolizuota ScaI, XbaI, AlwI, NaeI ir PstI restrikcijos endonukleazėmis. K – kontrolė, kurioje genomine vB_LadM-OB5 fago DNR be restrikcijos endonukleazių.

Restrikcinė analizė rodo, jog šio bakteriofago (vB_LadM-OB5) genomui nėra būdingas dam metilinimas, nes genomą hidrolizavavo dam metilinimui jautrios restrikcijos endonukleazės XbaI ir AlwI. Taip pat nustatyta, jog šio fago genomui nebūdingas CpG metilinimas, nes genomą hidrolizavo CpG metilinimui jautri restrikcijos endonukleazė NaeI. Šio darbo metu nustatyta, jog vB_LadM-OB5 genomas yra apsaugotas nuo 32 iš 37 skirtingomis savybėmis pasižyminčių, šiame darbe naudotų restrikcijos endonukleazių poveikio.

Šiame darbe aprašytų miovirusų restrikcinės analizės rezultatai rodo galimą priešrestrikcinių sistemų buvimą, kuris yra nulemtas geno modifikacijų arba unikalių geno sekų. Šie rezultatai gali reikšmingai prisidėti prieš miovirusų įvairovės tyrimų, nes šiuo metu vis dar trūksta daugiau sisteminių duomenų apie R-E sistemos išvengimo bakteriofaguose strategijas bei paplitimą (Rusinov, Ershova et al. 2018). Tolimesni šiame darbe aprašytų bakteriofagų pilno geno tyrimai leistų tiksliau geno modifikavimo molekulinis mechanizmus, pvz. ieškant miovirusų geno modifikuojančių fermentų. Atsižvelgiant į tai, jog pastaraisiais metais atrandama vis daugiau bakteriofagų, kuriems būdingos netipinės geno modifikacijos (pvz. 5-hidroksimetildeoksiuracilas, 5-dihidroksipentauracilas ar N6-karbamoil-metiladeninas), labiausiai tikėtina, jog šiame darbe aprašytų miovirusų atsparumas restrikcijoms endonukleazėms galimai yra

susijęs su genomo modifikacijomis (Weigele and Raleigh 2016). Tolimesniuose tyrimuose galimos miovirusų genomo modifikacijos galėtų būti nustatytos panaudojant kapiliarinės elektroforezės bei masių spektrometrijos metodus (Rusinov, Ershova et al. 2018).

3.7 Genomo fragmentų klonavimas ir sekų analizė bioinformatiniais metodais

Šiame darbe, siekiant nustatyti preliminarių vB_ValM-AVI3, vB_LniM-OBL4A, vB_LniM-OBL4D ir vB_LadM-OB5 bakteriofagų genomo sekų panašumą su jau žinomais fagais, buvo atlikta klonuotų genomo fragmentų sekų bioinformatinė analizė. Į pJET1.2/blunt plazmidinį vektorių buvo atrinkti ir įterpti atsitiktiniai, 1500-3500 bp dydžio restrikciniai fragmentai, gauti po visų 4 šiame darbe izoliuotų bakteriofagų genomų hidrolizės.

vB_LniM-OBL4A bakteriofago atsitiktinių genomo fragmentų sekų BLASTp bioinformatinė analizė rodo, jog šio fago genome koduojami baltymai (uodegėlės ataugėlės baltymas, N-acetiltransferazė, hipotetinis baltymas pf16_91 bei centrinis ataugėlės baltymas) yra panašūs į baltymus, aptinkamus *Klebsiella* 48ST307 (*Siphoviridae* šeima), NG55 (*Myoviridae* šeima), *Pseudomonas* pf16 (*Myoviridae* šeima) ir *Escherichia* HK633 (*Siphoviridae* šeima) bakteriofaguose (6 lentelė). Šie bakteriofagai užkrečia *Enterobacteriaceae* ir *Pseudomonadaceae* šeimai priklausančias bakterijas. Pirminė vB_LniM-OBL4A bakteriofago atsitiktinių genomo sekų bioinformatinė analizė rodo, jog didesnė dalis šio viruso genomo sekų yra pakankamai unikalios, nes jų homologija su kitų virusų (*Klebsiella* 48ST307, NG55, *Pseudomonas* pf16 fagų) baltymais 48ST307 tesiekia ~39%. Vis dėlto, viena šio bakteriofago atsitiktinė genomo seka rodo didelį panašumą (~98%) į *Escherichia* fago HK633, priklausančio *Siphoviridae* šeimai, koduojamą centrinį ataugėlės baltymą. Nors šis bakteriofagas (HK633) ir priklauso *Siphoviridae* šeimai, šio darbo metu gauti rezultatai sutampa su bakteriofagų proteominės analizės duomenimis, kuriuose nurodoma, jog kai kurie miovirusų baltymai (pvz. centriniai ataugėlės baltymai) gali turėti didelį panašumą į sifovirusų koduojamus baltymus (Veesler and Cambillau 2011). Galimą vB_LniM-OBL4A genomo unikalumą taip pat pagrindžia BLASTn analizės rezultatai, kurie rodo, jog dalis vB_LniM-OBL4A bakteriofago atsitiktinių genomo sekų neturi jokio panašumo į šiuo metu žinomus virusus nukleorūgščių lygyje.

6 lentelė. Bakteriofagų vB_LniM-OBL4A, vB_LniM-OBL4D ir vB_LadM-OB5 genomo fragmentų sekų bioinformatinė analizė

Bakteriofagas	Homologinis baltymas	Organizmas	Baltymų panašumas (tiriama baltymo a.r seka/ homologinio baltymo a.r seka)	Baltymų persidengimas (tiriama baltymo persidengiančių a.r dalis/homologinio baltymo a.r seka)	E-įvertis
vB_LniM-OBL4A	Uodegėlės ataugėlės baltymas	Klebsiella fagas 48ST307	47/163(29%)	65/163(39%)	1e-06
vB_LniM-OBL4A	N-acetiltransferazė	NG55 fagas	62/158(39%)	102/158(64%)	1e-36
vB_LniM-OBL4A	Hipotetinis baltymas pf16_91	Pseudomonas fagas pf16	55/213(26%)	103/213(48%)	7e-52
vB_LniM-OBL4A	Centrinis ataugėlės baltymas	Escherichia fagas HK633	369/376(98%)	370/376(98%)	0.0
vB_LniM-OBL4D	Numanoma integrazė	Cronobacter fagas phiES15	253/317(80%)	270/317(85%)	2e-177
vB_LniM-OBL4D	Uodegėlės ataugėlės baltymas	Escherichia fagas HK97	288/293(98%)	291/293(99%)	0.0
vB_LniM-OBL4D	Hipotetinis baltymas KPP56652_39	Klebsiella fagas KPP5665-2	72/81(89%)	76/81(93%)	6e-41
vB_LniM-OBL4D	Numanoma helikazė	Cronobacter fagas ENT39118	318/410(78%)	346/410(84%)	0.0
vB_LadM-OB5	Egzonukleazė A	Acinetobacter fagas AbTZA1	48/162(30%)	74/162(45%)	0.0
vB_LadM-OB5	Gp43 baltymas	Bacillus fagas G	63/191(33%)	92/191(48%)	2e-18
vB_LadM-OB5	Su sigma veiksnio sąveikaujantis baltymas	Citrobacter fagas Margaery	153/174(88%)	160/174(91%)	8e-92

Kito bakteriofago, vB_LniM-OBL4D, atsitiktinių genomo fragmentų sekų BLASTp bioinformatinė analizė rodo, jog šio fago genome koduojami baltymai (numanoma integrazė, uodegėlės ataugėlės baltymas, hipotetinis baltymas KPP56652_39 ir numanoma helikazė) yra homologiški baltymams, kuriuos turi Cronobacter phiES15 (*Siphoviridae* šeima), Escherichia HK97 (*Siphoviridae* šeima), Klebsiella KPP5665-2 (*Siphoviridae* šeima) bei Cronobacter ENT39118 (*Siphoviridae* šeima) bakteriofagai (6 lentelė). Šie bakteriofagai užkrečia

Enterobacteriaceae šeimai priklausančias bakterijas. Pirminė vB_LniM-OBL4D bakteriofago atsitiktinių genomo sekų bioinformatinė analizė rodo, jog šis virusas koduoja baltymus, homologiškus kitų fagų baltymams ribose nuo nuo ~78% iki ~98%. Šie rezultatai rodo pakankamai didelį vB_LniM-OBL4D bakteriofago atsitiktinių genomo panašumą bent į keturis šiuo metu žinomus bakteriofagus, kurie priklauso *Siphoviridae* šeimai. Šio darbo metu nepavyko gauti atsitiktinių genomo vB_LniM-OBL4D sekų, rodančių panašumą į miovirusų koduojamus baltymus. Tai galėjo nulemti dvi priežastys: sekoskaitai buvo nusiųsti specifiniai genomo fragmentai, kurie turi didesnę panašumą į *Siphoviridae* šeimos atstovų koduojamus baltymus arba duomenų bazėse šiuo metu nėra publikuota miovirusų, kurių genomų sekos būtų panašios į šio darbo metu nustatytas atsitiktines vB_LniM-OBL4D bakteriofago genomo sekas, kas rodo galimą šio fago unikalumą *Myoviridae* virusų šeimoje. Šias prielaidas tolimesniuose tyrimuose galėtų patvirtinti vB_LniM-OBL4D bakteriofago viso genomo sekoskaitos rezultatų analizė.

vB_LadM-OB5 bakteriofago atsitiktinių genomo fragmentų sekų BLASTp bioinformatinė analizė rodo, jog šio fago genome koduojami baltymai yra panašūs į baltymus (egzonukleazė A, gp43 ir su sigma veiksniumi sąveikaujantis baltymas) aptinkamus *Acinetobacter* AbTZA1 (*Myoviridae* šeima), *Bacillus* G (*Myoviridae* šeima) ir *Citrobacter* Margaery (*Myoviridae* šeima) bakteriofaguose (6 lentelė). Šie bakteriofagai užkrečia *Enterobacteriaceae* ir *Moraxellaceae* šeimai priklausančias bakterijas. Pirminė vB_LadM-OB5 bakteriofago atsitiktinių genomo sekų bioinformatinė analizė rodo, jog didesnė dalis šio viruso genomo sekų yra pakankamai unikalios, nes jų homologija su kitų miovirusų baltymais 48ST307 siekia nuo ~30% iki ~88%. Galimą vB_LadM-OB5 genomo unikalumą taip pat pagrindžia BLASTn analizės rezultatai, kurie rodo, jog dalis vB_LadM-OB5 bakteriofago atsitiktinių genomo sekų neturi jokio panašumo į šiuo metu žinomus virusus nukleorūgščių lygyje.

Preliminari bakteriofago vB_ValM-AVI3 genomo fragmentų sekų bioinformatinė analizė parodė, jog šio darbo metu gauti atsitiktiniai genomo sekų fragmentai neturi atitikmenų duomenų bazėse nei aminorūgščių, nei nukleorūgščių lygyje. Šie rezultatai patvirtina mokslinėse publikacijose nurodomus duomenis, jog iki 99% naujai izoliuotų bakteriofagų genomo sekų neturi atitikmenų duomenų bazėse nei aminorūgščių, nei nukleorūgščių lygyje. (Casey, Coffey et al. 2017). Šie bioinformatinės analizės rezultatai rodo, jog vB_ValM-AVI3 bakteriofagas yra potencialiai unikalus, filogenetinio ryšio su kitais žinomais bakteriofagais neturintis miovirusas. Panašiuose tyrimuose *Vibrio* genties bakterijas užkrečiantys naujai izoliuoti miovirusai taip pat

neturi reikšmingos homologijos su šiuo metu žinomais virusais, kas rodo šių virusų grupės (infekuojančios *Vibrio* genties bakterijas) unikalumą (Naser, Hoque et al. 2017).

IŠVADOS

- Bakteriofago vB_LniM-OBL4D formuojamų kolonijų morfologija byloja, kad *Leclercia adecarboxylata* OB5 gamtinio kamieno atveju šiam fagui galimai yra būdingas depolimerazinis aktyvumas;
- Terminės inaktyvacijos tyrimas rodo, jog visi 4 bakteriofagai (vB_LadM-OB5, vB_ValM-AVI3, vB_LniM-OBL4A ir vB_LniM-OBL4D) išlieka stabilūs po užšaldymo, tačiau yra labai jautrūs terminiai denatūracijai;
- Osmosinio šoko tyrimas rodo, jog visi 4 bakteriofagai pasižymi dideliu išgyvenamumu po osmosinio šoko sukėlimo;
- Skirtingo pH poveikio analizė rodo mažą visų 4 bakteriofagų išgyvenamumą esant rūgštinei pH, tačiau infektyvumo rodiklius neigiamai veikia ir šarminė pH;
- Detergentų ir organinių tirpiklių poveikio analizė rodo, jog visi 4 bakteriofagai pasižymi dideliu atsparumu etanolui ir chloroformui, tačiau fagų infektyvumo rodikliai ženkliai sumažėja po poveikio acetonu;
- Restriktinė genomų analizė rodo, jog vB_ValM-AVI3 genomai yra modifikuoti;
- Atsitiktinių genomo fragmentų bioinformatinė analizė rodo didžiausią vB_LadM-OB5, vB_LniM-OBL4A ir vB_LniM-OBL4D miovirusų panašumą į enterobakterijas infektuojančius virusus, o vB_ValM-AVI3 fagas yra unikalus, filogenetiškai artimų fagų neturintis miovirusas.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Paulius Vytautas Sungaila

Naujai izoliuotų *Myoviridae* šeimos virusų fiziocheminių bei genetinių savybių tyrimas

SANTRAUKA

Šio darbo tikslas buvo ištirti 4 naujai izoliuotų, *Myoviridae* šeimai priklausančių bakteriofagų, fiziochemines, morfologines bei genetines savybes. Šio darbo metu buvo tiriami 4 miovirusai (B_LadM-OB5, vB_ValM-AVI3, vB_LniM-OBL4A ir vB_LniM-OBL4D), užkrečiantys skirtingas *Enterobacteriaceae* ir *Vibrionaceae* šeimai priklausančias bakterijas. Šio darbo metu atlikta išsamesnė fiziocheminių, morfologinių bei genetinių savybių analizė: nustatytas galimas depolimerazinio aktyvumo bakteriofaguose pasireiškimas, aprašyti bakteriofagų infektyvumo rodikliai (jautrumas terminiai inaktyvacijai, žemam bei aukštam pH, osmosiniam slėgiui, organinėms medžiagoms bei detergentams), atlikta bakteriofagų genomines DNR restrikcinė analizė, nustatytos galimos fagų genomo modifikacijos bei bioinformatiškai išnagrinėtos atsitiktinės bakteriofagų genomų sekos, siekiant nustatyti šiame darbe aprašytų fagų homologiją su žinomais virusais. Fiziocheminių savybių analizė rodo, jog visi 4 bakteriofagai išlieka stabilūs po užšaldymo, tačiau yra labai jautrūs terminiai denatūracijai. Osmosinio šoko tyrimas rodo, jog visi 4 bakteriofagai pasižymi dideliu išgyvenamumu po osmosinio šoko sukėlimo. Skirtingo pH poveikio analizė rodo mažą visų 4 bakteriofagų išgyvenamumą esant rūgštinei pH, tačiau infektyvumo rodiklius neigiamai veikia ir šarminė pH. Detergentų ir organinių tirpiklių poveikio analizė rodo, jog visi 4 bakteriofagai pasižymi dideliu atsparumu prieš etanolį ir chloroformą, tačiau infektyvumo rodikliai labiausiai sumažėja po poveikio acetonu. Restrikcinės analizės metu nustatyta, jog vB_ValM-AVI3 fagui būdingos genomo modifikacijos. Kitų bakteriofagų restrikcinės analizės rezultatai rodo, jog vB_LadM-OB5, vB_LniM-OBL4A ir vB_LniM-OBL4D miovirusų genomams nėra būdingas CpG metilimas. Atsitiktinių genomo fragmentų bioinformatinė analizė rodo didžiausią vB_LadM-OB5, vB_LniM-OBL4A ir vB_LniM-OBL4D miovirusų koduojamų baltymų panašumą į enterobakterijas infekuojančius virusus, o vB_ValM-AVI3 bakteriofago atsitiktinės genomo sekos neturi jokio panašumo į šiuo metu žinomus virusus nei aminorūgščių, nei nukleorūgščių lygyje, todėl šis fagas potencialiai yra unikalus, filogenetiškai artimų fagų neturintis miovirusas.

VILNIUS UNIVERSITY

LIFE SCIENCES CENTER

Paulius Vytautas Sungaila

Analysis of Physicochemical and Genetic Properties of Newly Isolated Bacteriophages from
Myoviridae Family

SUMMARY

The purpose of this paper was to characterize physicochemical, morphological and genomic properties of 4 newly isolated bacteriophages from *Myoviridae* family. Four phages (vB_LadM-OB5, vB_ValM-AVI3, vB_LniM-OBL4A, and vB_LniM-OBL4D), infecting different bacterial strains from *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae* family, were isolated and used in this work. Physicochemical analysis of all phages was focused on effect determination of thermal inactivation, sensitivity to low and high pH, sensitivity to osmotic stress and survivability upon treatment with organic solvents and detergents. Genetic analysis was focused on restriction analysis (identifying possible genome modifications) and bioinformatics analysis of genome fragments (identifying homology to known viruses). Morphological analysis was focused on determination of depolymerase activity. Depolymerase activity was detected in vB_LniM-OBL4D phage, infecting *Leclercia adecarboxylata* OB5 strain. Thermal inactivation results showed that all 4 bacteriophages remain stable after freezing, but are very sensitive to thermal denaturation. Osmotic shock results showed that all phages have high survival rate after induction of osmotic shock. Analysis of different pH effects showed low survival rate of all 4 bacteriophages at acidic pH, but infectivity rates are also negatively affected by alkaline pH. Analysis of the effects of detergents and organic solvents showed that all phages have high resistance to ethanol and chloroform, but the infectivity rates decrease the most after exposure to acetone. Restriction analysis of phage DNA showed that phage vB_ValM-AVI3 has modified DNA, and that other phages may have unique genome sequences or unidentified genome modifications, which could serve as an anti-restriction system. Bioinformatics analysis of the genome restricts of vB_ValM-AVI3 phage revealed no homology to previously known proteins or nucleotide sequences. Bioinformatics analysis of other phages revealed that their protein-coding genes have homologues in other phages, mostly infecting bacteria from *Enterobacteriaceae* family.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti savo darbų vadovei dr. Laurai Kalinienei už suteiktą galimybę dirbti su naujai izoliuotais bakteriofagais, taip pat už konstruktyvią kritiką, milžinišką kantrybę bei už nuolat skatinamą savarankiškumą, tikėjimą bakteriofagų įvairovės tyrimų reikšme. Taip pat norėčiau padėkoti prof. Rolandui Meškiui už paskatinimą mokytis ir tęsti gyvybės mokslus, už tikėjimą mikroorganizmų įvairovės tyrimų svarba bei už priėmimą šį darbą atlikti Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje.

Atskirai norėčiau padėkoti Dr. Eugenijui ir dokt. Monikai Šimoliūnams už suteiktą pagalbą ir naudingus patarimus charakterizuojant bakteriofagus, taip pat dokt. Algirdui Noreikai už kritiką, padaršinius bei gerą darbo atmosferą ir visiems žmonėms, kurie dirba Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Accetto, T. and N. Janež (2018). "The lytic Myoviridae of Enterobacteriaceae form tight recombining assemblages separated by discontinuities in genome average nucleotide identity and lateral gene flow." Microbial genomics **4**(3).
2. Ackermann, H.-W., H. M. Krisch and A. M. Comeau (2011). "Morphology and genome sequence of phage Φ 1402: A dwarf myovirus of the predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*." Bacteriophage **1**(3): 138-142.
3. Adams, M. H. (1959). "Bacteriophages." Bacteriophages.
4. Adriaenssens, E. M., R. Kramer, M. W. Van Goethem, T. P. Makhalanyane, I. Hogg and D. A. Cowan (2017). "Environmental drivers of viral community composition in Antarctic soils identified by viromics." Microbiome **5**(1): 83.
5. Adriaenssens, E. M., M. B. Sullivan, P. Knezevic, L. J. van Zyl, B. Sarkar, B. E. Dutilh, P. Alfenas-Zerbini, M. Łobocka, Y. Tong and J. R. Brister (2020). "Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee." Archives of virology: 1-8.
6. Ahmadi, H., D. Radford, A. M. Kropinski, L.-T. Lim and S. Balamurugan (2017). "Thermal-stability and reconstitution ability of listeria phages p100 and a511." Frontiers in microbiology **8**: 2375.
7. Alič, Š., T. Naglič, M. Tušek-Žnidarič, M. Ravnikar, N. Rački, M. Peterka and T. Dreo (2017). "Newly Isolated Bacteriophages from the Podoviridae, Siphoviridae, and Myoviridae Families Have Variable Effects on Putative Novel *Dickeya* spp." Frontiers in microbiology **8**: 1870.
8. Anderson, T. F. (1950). Destruction of bacterial viruses by osmotic shock. Journal of Applied Physics, AMER INST PHYSICS CIRCULATION FULFILLMENT DIV, 500 SUNNYSIDE BLVD, WOODBURY
9. Antonova, N. P., D. V. Vasina, A. M. Lendel, E. V. Usachev, V. V. Makarov, A. L. Gintsburg, A. P. Tkachuk and V. A. Gushchin (2019). "Broad bactericidal activity of the Myoviridae bacteriophage Lysins LysAm24, LysECD7, and LysSi3 against gram-negative ESKAPE pathogens." Viruses **11**(3): 284.

10. Aziz, R. K., H.-W. Ackermann, N. K. Petty and A. M. Kropinski (2018). Essential steps in characterizing bacteriophages: Biology, taxonomy, and genome analysis. Bacteriophages, Springer: 197-215.
11. Barylski, J., F. Enault, B. E. Dutilh, M. B. Schuller, R. A. Edwards, A. Gillis, J. Klumpp, P. Knezevic, M. Krupovic and J. H. Kuhn (2020). "Analysis of spounaviruses as a case study for the overdue reclassification of tailed phages." Systematic biology **69**(1): 110-123.
12. Barylski, J., A. M. Kropinski, N.-F. Alikhan, E. M. Adriaenssens and I. R. Consortium (2020). "ICTV virus taxonomy profile: Herelleviridae." The Journal of general virology **101**(4): 362.
13. Brown, T. L., H. Ku, G. Mnatzaganian, M. Angove, S. Petrovski, M. Kabwe and J. Tucci (2020). "The varying effects of a range of preservatives on Myoviridae and Siphoviridae bacteriophages formulated in a semi-solid cream preparation." Letters in Applied Microbiology.
14. Carlson, K. and E. Miller (1994). "Experiments in T4 genetics." Molecular biology of bacteriophage **4**: 421-483.
15. Casey, A., A. Coffey and O. McAuliffe (2017). "Genetics and Genomics of Bacteriophages: The Evolution of Bacteriophage Genomes and Genomic Research." Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy: 1-26.
16. Casey, E., D. van Sinderen and J. Mahony (2018). "In vitro characteristics of phages to guide 'real life' phage therapy suitability." Viruses **10**(4): 163.
17. Castelnovo, M. and A. Evilevitch (2007). "DNA ejection from bacteriophage: towards a general behavior for osmotic-suppression experiments." The European Physical Journal E **24**(1): 9-18.
18. Colavecchio, A., B. Cadieux, A. Lo and L. D. Goodridge (2017). "Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens of the Enterobacteriaceae family—a review." Frontiers in Microbiology **8**: 1108.
19. Czajkowski, R., Z. Ozymko and E. Lojkowska (2014). "Isolation and characterization of novel soilborne lytic bacteriophages infecting *Dickeya* spp. biovar 3 ('*D. solani*')." Plant pathology **63**(4): 758-772.
20. Danovaro, R., C. Corinaldesi, A. Dell'Anno, J. A. Fuhrman, J. J. Middelburg, R. T. Noble and C. A. Suttle (2011). "Marine viruses and global climate change." FEMS microbiology reviews **35**(6): 993-1034.

21. Dion, M. B., F. Oechslin and S. Moineau (2020). "Phage diversity, genomics and phylogeny." Nature Reviews Microbiology: 1-14.
22. Doron, S., S. Melamed, G. Ofir, A. Leavitt, A. Lopatina, M. Keren, G. Amitai and R. Sorek (2018). "Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome." Science **359**(6379).
23. Emerson, J. B., S. Roux, J. R. Brum, B. Bolduc, B. J. Woodcroft, H. B. Jang, C. M. Singleton, L. M. Solden, A. E. Naas and J. A. Boyd (2018). "Host-linked soil viral ecology along a permafrost thaw gradient." Nature microbiology **3**(8): 870.
24. Fister, S., C. Robben, A. K. Witte, D. Schoder, M. Wagner and P. Rossmanith (2016). "Influence of environmental factors on phage–bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage P100." Frontiers in microbiology **7**: 1152.
25. Francki, R. I. B., C. Fauquet, D. Knudson and F. Brown (2012). Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division of the International Union of Microbiological Societies, Springer Science & Business Media.
26. Gallet, R., S. Kannoly and N. Wang (2011). "Effects of bacteriophage traits on plaque formation." BMC microbiology **11**(1): 181.
27. Gonzalez-Menendez, E., L. Fernandez, D. Gutierrez, A. Rodriguez, B. Martinez and P. Garcia (2018). "Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of Staphylococcus phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products." PLoS One **13**(10): e0205728.
28. Gonzalez, B., L. Monroe, K. Li, R. Yan, E. Wright, T. Walter, D. Kihara, S. T. Weintraub, J. A. Thomas and P. Serwer (2020). "Phage G Structure at 6.1 Å Resolution, Condensed DNA, and Host Identity Revision to a Lysinibacillus." Journal of Molecular Biology.
29. Gregory, A. C., A. A. Zayed, N. Conceição-Neto, B. Temperton, B. Bolduc, A. Alberti, M. Ardyna, K. Arkhipova, M. Carmichael and C. Cruaud (2019). "Marine DNA viral macro- and microdiversity from pole to pole." Cell **177**(5): 1109-1123. e1114.
30. Guglielmotti, D. M., D. J. Mercanti, J. A. Reinheimer and A. D. L. Quiberoni (2012). "Efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages." Frontiers in microbiology **2**: 282.
31. Hayes, S., J. Mahony, A. Nauta and D. van Sinderen (2017). "Metagenomic approaches to assess bacteriophages in various environmental niches." Viruses **9**(6): 127.

32. Harada, L. K., E. C. Silva, W. F. Campos, F. S. Del Fiol, M. Vila, K. Dąbrowska, V. N. Krylov and V. M. Balcão (2018). "Biotechnological applications of bacteriophages: state of the art." Microbiological research **212**: 38-58.
33. Hassim, A., K. E. Lekota, D. S. Van Dyk, E. H. Dekker and H. Van Heerden (2020). "A Unique Isolation of a Lytic Bacteriophage Infected Bacillus anthracis Isolate from Pafuri, South Africa." Microorganisms **8**(6): 932.
34. Hyman, P. (2019). "Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth." Pharmaceuticals **12**(1): 35.
35. Howard-Varona, C., K. R. Hargreaves, S. T. Abedon and M. B. Sullivan (2017). "Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages." The ISME journal **11**(7): 1511.
36. Hua, J., A. Huet, C. A. Lopez, K. Toropova, W. H. Pope, R. L. Duda, R. W. Hendrix and J. F. Conway (2017). "Capsids and genomes of jumbo-sized bacteriophages reveal the evolutionary reach of the HK97 fold." MBio **8**(5).
37. Hurwitz, B. L., A. Ponsero, J. Thornton Jr and J. M. U'Ren (2018). "Phage hunters: Computational strategies for finding phages in large-scale 'omics datasets." Virus research **244**: 110-115.
38. Hurwitz, B. L. and J. M. U'Ren (2016). "Viral metabolic reprogramming in marine ecosystems." Current opinion in microbiology **31**: 161-168.
39. Hussein, Y. S., S. S. El-Masry, A. A. Faiesal, K. A. El-DougDoug and B. Othman (2019). "PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF SOME LISTERIA PHAGES." Arab Universities Journal of Agricultural Sciences **27**(1): 175-183.
40. Hutinet, G., W. Kot, L. Cui, R. Hillebrand, S. Balamkundu, S. Gnanakalai, R. Neelakandan, A. B. Carstens, C. F. Lui and D. Tremblay (2019). "7-Deazaguanine modifications protect phage DNA from host restriction systems." Nature communications **10**(1): 1-12.
41. Imamovic, L., E. Ballesté, A. Martínez-Castillo, C. García-Aljaro and M. Muniesa (2016). "Heterogeneity in phage induction enables the survival of the lysogenic population." Environmental microbiology **18**(3): 957-969.
42. Jończyk, E., M. Kłak, R. Międzybrodzki and A. Górski (2011). "The influence of external factors on bacteriophages." Folia microbiologica **56**(3): 191-200.

43. Jun, J. W., J. H. Kim, S. P. Shin, J. E. Han, J. Y. Chai and S. C. Park (2013). "Characterization and complete genome sequence of the Shigella bacteriophage pSf-1." Research in microbiology **164**(10): 979-986.
44. Jurczak-Kurek, A., T. Gąsior, B. Nejman-Faleńczyk, S. Bloch, A. Dydecka, G. Topka, A. Necel, M. Jakubowska-Deredas, M. Narajczyk and M. Richert (2016). "Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage." Scientific reports **6**: 34338.
45. King, A. M., E. Lefkowitz, M. J. Adams and E. B. Carstens (2011). Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier.
46. Knecht, L. E., M. Veljkovic and L. Fieseler (2020). "Diversity and function of phage encoded depolymerases." Frontiers in Microbiology **10**: 2949.
47. Kornienko, M., N. Kuptsov, R. Gorodnichev, D. Bespiatykh, A. Guliaev, M. Letarova, E. Kulikov, V. Veselovsky, M. Malakhova and A. Letarov (2020). "Contribution of Podoviridae and Myoviridae bacteriophages to the effectiveness of anti-staphylococcal therapeutic cocktails." Scientific reports **10**(1): 1-11.
48. Kropinski, A. M. (2018). "Bacteriophage research—What we have learnt and what still needs to be addressed." Research in microbiology **169**(9): 481-487.
49. Lara, E., J. M. Arrieta, I. Garcia-Zarandona, J. A. Boras, C. M. Duarte, S. Agustí, P. F. Wassmann and D. Vaqué (2013). "Experimental evaluation of the warming effect on viral, bacterial and protistan communities in two contrasting Arctic systems." Aquatic Microbial Ecology **70**(1): 17-32.
50. Lázaro, E., M. Arribas, L. Cabanillas, I. Román and E. Acosta (2018). "Evolutionary adaptation of an RNA bacteriophage to the simultaneous increase in the within-host and extracellular temperatures." Scientific reports **8**(1): 8080.
51. Lee, Y.-J., N. Dai, S. E. Walsh, S. Müller, M. E. Fraser, K. M. Kauffman, C. Guan, I. R. Corrêa and P. R. Weigele (2018). "Identification and biosynthesis of thymidine hypermodifications in the genomic DNA of widespread bacterial viruses." Proceedings of the National Academy of Sciences **115**(14): E3116-E3125.
52. Liu, Y., L. Dai, J. Dong, C. Chen, J. Zhu, V. B. Rao and P. Tao (2020). "Covalent Modifications of the Bacteriophage Genome Confer a Degree of Resistance to Bacterial CRISPR Systems." Journal of Virology **94**(23).

53. López-Pérez, M., J. M. Haro-Moreno, R. Gonzalez-Serrano, M. Parras-Moltó and F. Rodriguez-Valera (2017). "Genome diversity of marine phages recovered from Mediterranean metagenomes: size matters." PLoS genetics **13**(9): e1007018.
54. Matamp, N. and S. G. Bhat (2020). "Genome characterization of novel lytic Myoviridae bacteriophage ϕ VP-1 enhances its applicability against MDR-biofilm-forming *Vibrio parahaemolyticus*." Archives of Virology **165**(2): 387-396.
55. Naser, I. B., M. M. Hoque, A. Abdullah, S. N. Bari, A. N. Ghosh and S. M. Faruque (2017). "Environmental bacteriophages active on biofilms and planktonic forms of toxigenic *Vibrio cholerae*: Potential relevance in cholera epidemiology." PLoS One **12**(7): e0180838.
56. Nigro, O. D., S. P. Jungbluth, H.-T. Lin, C.-C. Hsieh, J. A. Miranda, C. R. Schvarcz, M. S. Rappé and G. F. Steward (2017). "Viruses in the oceanic basement." MBio **8**(2).
57. Nobrega, F. L., M. Vlot, P. A. de Jonge, L. L. Dreesens, H. J. Beaumont, R. Lavigne, B. E. Dutilh and S. J. Brouns (2018). "Targeting mechanisms of tailed bacteriophages." Nature Reviews Microbiology **16**(12): 760-773.
58. Nováček, J., M. Šiborová, M. Benešík, R. Pantůček, J. Doškař and P. Plevka (2016). "Structure and genome release of Twort-like Myoviridae phage with a double-layered baseplate." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(33): 9351-9356.
59. O'Flaherty, S., A. Coffey, R. Edwards, W. Meaney, G. Fitzgerald and R. Ross (2004). "Genome of staphylococcal phage K: a new lineage of Myoviridae infecting gram-positive bacteria with a low G+ C content." Journal of bacteriology **186**(9): 2862-2871.
60. Ofir, G. and R. Sorek (2018). "Contemporary phage biology: from classic models to new insights." Cell **172**(6): 1260-1270.
61. Oliveira, H., A. R. Costa, A. Ferreira, N. Konstantinides, S. B. Santos, M. Boon, J.-P. Noben, R. Lavigne and J. Azeredo (2019). "Functional analysis and antivirulence properties of a new depolymerase from a myovirus that infects *Acinetobacter baumannii* capsule K45." Journal of virology **93**(4).
62. Oliveira, H., C. São-José and J. Azeredo (2018). "Phage-derived peptidoglycan degrading enzymes: challenges and future prospects for in vivo therapy." Viruses **10**(6): 292.
63. Olsen, N. S., L. Forero-Junco, W. Kot and L. H. Hansen (2020). "Exploring the Remarkable Diversity of Culturable *Escherichia coli* Phages in the Danish Wastewater Environment." Viruses **12**(9): 986.

64. Olszak, T., M. M. Shneider, A. Latka, B. Maciejewska, C. Browning, L. V. Sycheva, A. Cornelissen, K. Danis-Wlodarczyk, S. N. Senchenkova and A. S. Shashkov (2017). "The O-specific polysaccharide lyase from the phage LKA1 tailspike reduces *Pseudomonas* virulence." Scientific reports **7**(1): 1-14.
65. Pingoud, A., G. G. Wilson and W. Wende (2016). "Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more." Nucleic acids research **44**(16): 8011.
66. Pires, D. P., H. Oliveira, L. D. Melo, S. Sillankorva and J. Azeredo (2016). "Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications." Applied microbiology and biotechnology **100**(5): 2141-2151.
67. Rauch, B. J., M. R. Silvis, J. F. Hultquist, C. S. Waters, M. J. McGregor, N. J. Krogan and J. Bondy-Denomy (2017). "Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins." Cell **168**(1-2): 150-158. e110.
68. Rusinov, I., A. Ershova, A. Karyagina, S. Spirin and A. Alexeevski (2018). "Avoidance of recognition sites of restriction-modification systems is a widespread but not universal anti-restriction strategy of prokaryotic viruses." BMC genomics **19**(1): 1-11.
69. Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*—cold Spring Harbor, New York: Cold spring harbor laboratory press.
70. Scanlan, P. D., A. R. Hall, G. Blackshields, V.-P. Friman, M. R. Davis Jr, J. B. Goldberg and A. Buckling (2015). "Coevolution with bacteriophages drives genome-wide host evolution and constrains the acquisition of abiotic-beneficial mutations." Molecular biology and evolution **32**(6): 1425-1435.
71. Schmelcher, M. and M. J. Loessner (2016). "Bacteriophage endolysins: applications for food safety." Current opinion in biotechnology **37**: 76-87.
72. Schoenfeld, T., M. Liles, K. E. Wommack, S. W. Polson, R. Godiska and D. Mead (2010). "Functional viral metagenomics and the next generation of molecular tools." Trends in microbiology **18**(1): 20-29.
73. Servick, K. (2016). Beleaguered phage therapy trial presses on, American Association for the Advancement of Science.
74. Shan, J., S. Korbsrisate, P. Withatanung, N. L. Adler, M. R. Clokie and E. E. Galyov (2014). "Temperature dependent bacteriophages of a tropical bacterial pathogen." Frontiers in microbiology **5**: 599.

75. Silva-Valenzuela, C. A. and A. Camilli (2019). "Niche adaptation limits bacteriophage predation of *Vibrio cholerae* in a nutrient-poor aquatic environment." Proceedings of the National Academy of Sciences **116**(5): 1627-1632.
76. Surgucheva, N., S. Filippova, E. Kulikov, A. Brushkov and V. Rogov (2019). "Phage Particles in Ground Arctic Ice." Microbiology **88**(2): 206-211.
77. Svircev, A., D. Roach and A. Castle (2018). "Framing the future with bacteriophages in agriculture." Viruses **10**(5): 218.
78. Šimoliūnas, E., L. Kaliniene, L. Truncaitė, A. Zajančauskaitė, J. Staniulis, A. Kaupinis, M. Ger, M. Valius and R. Meškys (2013). "Klebsiella phage vB_KleM-RaK2—A giant singleton virus of the family Myoviridae." PloS one **8**(4).
79. V Volozhantsev, N., A. M Shpirt, A. I Borzilov, E. V Komisarova, V. M Krasilnikova, A. S Shashkov, V. V Verevkin and Y. A Knirel (2020). "Characterization and Therapeutic Potential of Bacteriophage-Encoded Polysaccharide Depolymerases with β Galactosidase Activity against *Klebsiella pneumoniae* K57 Capsular Type." Antibiotics **9**(11): 732.
80. Vandamme, E. J. and K. Mortelmans (2019). "A century of bacteriophage research and applications: impacts on biotechnology, health, ecology and the economy!" Journal of Chemical Technology & Biotechnology **94**(2): 323-342.
81. Vandenheuevel, D., R. Lavigne and H. Brüßow (2015). "Bacteriophage therapy: advances in formulation strategies and human clinical trials." Annual review of virology **2**: 599-618.
82. Vázquez, R., E. García and P. García (2018). "Phage lysins for fighting bacterial respiratory infections: a new generation of antimicrobials." Frontiers in Immunology **9**: 2252.
83. Veessler, D. and C. Cambillau (2011). "A common evolutionary origin for tailed-bacteriophage functional modules and bacterial machineries." Microbiology and Molecular Biology Reviews **75**(3): 423-433.
84. Verma, V., K. Harjai and S. Chhibber (2009). "Characterization of a T7-like lytic bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: a potential therapeutic agent." Current microbiology **59**(3): 274-281.
85. Vlassov, V., N. Tikunova and V. Morozova (2020). "Bacteriophages as Therapeutic Preparations: What Restricts Their Application in Medicine." Biochemistry (Moscow) **85**(11): 1350-1361.
86. Weigele, P. and E. A. Raleigh (2016). "Biosynthesis and function of modified bases in bacteria and their viruses." Chemical reviews **116**(20): 12655-12687.

87. Weynberg, K. D. (2018). Viruses in Marine Ecosystems: From Open Waters to Coral Reefs. Advances in virus research, Elsevier. **101**: 1-38.
88. WM Hassan, S., H. Abd-ElNaby, G. M Abou-Elala, A. E Abouelwafa and N. A El-Sersy (2020). "Bacteriophages: Ecological role in the marine environment and potential applications." Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries **24**(7-Special issue): 93-117.