

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
BIOCHEMIJOS INSTITUTAS

Laura Kalinienė

T4 GIMININGŲ BAKTERIOFAGŲ GENOMŲ SEKŲ NUSTATYMAS IR  
GENŲ RAIŠKOS TYRIMAS

Daktaro disertacija  
Fiziniai mokslai, biochemija (04P)

Vilnius, 2010

Disertacija rengta 2005-2009 metais Biochemijos institute

Mokslinis vadovas:

habil.dr. Rimantas Steponas Nivinskas (Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P);

Mokslinė konsultantė:

dr. Lidija Truncaitė (Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

## T U R I N Y S

SUTARTINIŲ ŽYMĖJIMŲ, SIMBOLIŲ, TERMINŲ IR VIENETŲ SĄRAŠAS	5
ĮVADAS	6
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b>	10
<b>1.1. T4 giminingi bakteriofagai: įvairovė, klasifikacija bei ekologija</b>	10
<b>1.2. Bendra T4 giminingų bakteriofagų genomų apžvalga</b>	16
<b>1.3. T4 giminingų bakteriofagų genų raiškos reguliacija</b>	25
1.3.1. Genų raiškos reguliacija transkripcijos metu	27
1.3.1.1. Ankstyvųjų genų transkripcija	29
1.3.1.2. Viduriniųjų genų transkripcija	32
1.3.1.3. Vėlyvųjų genų transkripcija	36
1.3.2. Potranskripcinė genų raiškos reguliacija	41
1.3.2.1. iRNR degradacija	41
1.3.2.2. Genų raiškos reguliacija translacijos lygyje	43
<b>2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI</b>	47
<b>2.1. Medžiagos</b>	47
2.1.1. Bakterijų kamieniai, bakteriofagai ir plazmidiniai vektoriai	47
2.1.2. Reagentai	48
2.1.3. Terpės	49
2.1.4. DNR skyrimo tirpalai ir buferiai	50
2.1.5. DNR elektroforezei naudoti tirpalai	50
<b>2.2. Tyrimo metodai</b>	51
2.2.1. DNR amplifikavimas <i>in vitro</i>	51
2.2.2. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio	51
2.2.3. PGR fragmentų nukleotidų sekos nustatymas	51
2.2.4. Fagų dauginimas ir DNR išskyrimas	50
2.2.5. iRNR analizė	52
2.2.5.1. Bendrosios ląstelių RNR išskyrimas	52
2.2.5.2. DNR pradmens pažymėjimas	53
2.2.5.3. iRNR nukleotidų sekos nustatymas	53
2.2.6. Plazmidžių konstravimas	53
2.2.6.1. Kryptinga bakteriofago VR7 geno <i>motA</i> mutagenezė	53
2.2.7. Bakteriofago VR7 genotekos konstravimas	54
2.2.7.1. Tyrimų rezultatų analizė	54
<b>3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS</b>	56
<b>3.1. Bakteriofagų LZ, LZ1, LZ9 ir VR7 geno sritys tarp genų 30 ir 31 struktūrinės organizacijos tyrimas</b>	56
<b>3.2. Bakteriofago VR7 geno sekos tyrimas</b>	60
3.2.1. Struktūrinių genų grupė	65

3.2.2. Replikacijos ir su replikacija susijusių genų grupė	72
3.2.3. Kitų funkcinų grupių fago VR7 genai	76
3.2.4. T4 genome homologų neturintys VR7 ASR	77
<b>3.3. Fago VR7 genų raiškos tyrimas</b>	81
3.3.1. Ankstyvosios transkripcijos reguliacija	81
3.3.2. Vidurinėsios transkripcijos etapas	85
3.3.3. Vėlyvųjų transkriptų sintezės reguliacija	95
3.3.4. Transkripcijos terminatoriai	98
3.3.5. Potranskripcinės reguliacijos ypatumai	98
<b>3.4. VR grupės bakteriofagai</b>	100
<b>3.5. Reziümė</b>	106
<b>IŠVADOS</b>	109
<b>PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA</b>	107
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS</b>	112
<b>PRIEDAI</b>	126

## SUTARTINIŲ ŽYMĖJIMŲ, SIMBOLIŲ, TERMINŲ IR VIENETŲ SĄRAŠAS

DNazė	deoksiribonukleazė
RNazė	ribonukleazė
dsDNR	dvigrandinė deoksiribonukleorūgštis
HmC	hidroksimetilcitozinas
iRNR	informacinė ribonukleorūgštis
a.r.	aminorūgštis
kb	kilobazė
nt	nukleotidas
P	promotorius
P <sub>E</sub>	ankstyvasis promotorius
P <sub>M</sub>	vidurinysis promotorius
P <sub>L</sub>	vėlyvasis promotorius
PGR	polimerazinė grandininė reakcija
AMV	paukščių mieloblastozės viruso atvirkštinė transkriptazė
RNRP	RNR polimerazė
SD	Šaino-Dalgarno seka
RRR	replikacija, reparacija, rekombinacija
NTD	N-galinis domenas
CTD	C-galinis domenas

## IVADAS

Bakterijas infekuojantys virusai, arba bakteriofagai, formuoja skaitlingiausią virusų grupę biosferoje ir yra aptinkami ten, kur gyvuoja bakterijos. T4 giminingi bakteriofagai yra vieni iš labiausiai gamtoje paplitusių bakterinių virusų. Nepaisant to, lig šiol yra nustatyta tik 25 T4 giminingų bakteriofagų genomų seka, kas itin riboja jų prisitaikymo gamtoje genetinių aspektų bei skirtingų pogrupių evoliucinių ryšių tyrimą.

Remiantis palyginamąja struktūrinių baltymų sekos analize, T4 giminingi bakteriofagai yra skirstomi į keturis, didėjančiu filogenetiniu atstumu nuo T4 nutolusius filogenetinius pogrupius: T-lyginius, pseudo T-lyginius, egzo T-lyginius ir šizo T-lyginius fagus. Bakteriofagas T4 yra T-lyginių bakteriofagų pogrupio atstovas. Tipinio T-lyginio fago DNR nukleotidų seka, lyginant su T4, skiriasi iki 10%. Tuo tarpu gretutinės filogenetinės grupės atstovų, pseudo T-lyginių fagų, genominės DNR nukleotidų seka skiriasi ženkliai ir tik ~1/3 jų genome koduojamų baltymų yra homologiški atitinkamiems fago T4 baltymams nuo 20% iki 70%. Kitų dviejų filogenetinių pogrupių virusai, lyginant su fagu T4, yra dar labiau pakitę – skiriasi ne tik šių bakteriofagų genetinė sandara, bet ir struktūrinės ypatybės bei infekuojamų šeimininkų ratas.

Fagas T4 yra tyrinėjamas jau daugiau nei penkiasdešimt metų, tačiau lig šiol tik šiek tiek daugiau nei pusės šio fago genome koduojamų baltymų funkcijos yra nustatytos, tačiau daugelio jų veikimo principai bei vaidmuo fago vystymosi metu nėra iki galo žinomi. Iš dalies taip yra dėl to, kad struktūrinių tokių baltymų variantų kituose T4 tipo faguose aptikta labai mažai, arba visai neaptinkama. Biochemijos instituto Genų inžinerijos skyriuje jau eilę metų yra tiriama bakteriofago T4 ir jam giminingų fagų genų raiškos reguliacija bei atliekami su šiuo procesu susijusių baltymų (pvz., ModB, ModA, MotA ir RegB) aktyvumo tyrimai. Tačiau dėl itin didelio genetinio atotrūkio tarp skirtingiems pogrupiams priklausančių T4 tipo virusų, kai kurių iš išvardintų fago T4 baltymų bei genų raiškai svarbių signalų kitų pogrupių bakteriofagų

DNR nēra, kas itin apriboja aukšāiau paiminētū procesū išsamius tyrimus. Tokiu būdu, tarpiniū bakteriofagū pogrupiū išaiškinimas galētū ne tik padēti atskleisti skirtingus šiu virusū adaptācijas gamtoje dēsningumus, bet ir pagelbētū tiriant įvairius genū raiškos reguliacijos principus.

Šis darbas skirtas fagū, užimanāiū tarpinę filogenetinę padētį tarp T-lyginiū bei pseudo T-lyginiū, paieškai bei tyrimui.

### **Tyrimū tikslas ir uždaviniai:**

Disertacinio darbo tikslas – tarpinio, tarp T-lyginiū ir pseudo T-lyginiū bakteriofagū, filogenetinio pogrupio virusū paieška bei pasirinkto šiū fagū atstovo genomo sekos ir genū raiškos principū išaiškinimas.

Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti tokie uždaviniai:

1. Iširti pasirinktos bakteriofagū grupės genomo srities tarp ligazės geno *30* ir kapsidės baltymą koduojanāio geno *31* struktūrą. Remiantis gautais tyrimū rezultatais, atrinkti potencialū tarpinio filogenetinio pogrupio bakteriofagū tolimesniam genomo sekos bei genū raiškos tyrimui.
2. Klonuoti tyrimams atrinkto bakteriofago DNR fragmentus, sudaryti DNR fragmentū genoteką. Nustatyti klonuotū DNR fragmentū sekas ir atlikti šio fago genomo sekos rekonstrukciją.
3. Atlikti tyrimams pasirinkto bakteriofago reguliaciniū DNR sekū paiešką, palyginamąją sekū analizę ir eksperimentinius jų aktyvumo tyrimus.
4. Iširti pasirinkto fago fiziologines savybes bei jį klasifikuoti.

### **Mokslinis naujumas:**

Disertacijoje pateikti visos bakterinio viruso genomo sekos nustatymo bei genų organizacijos tyrimo rezultatai yra pirmas genomis projektas atliktas Lietuvoje. Aprašytų tyrimų metu buvo nustatyta bei detaliai išnagrinėta visa fago vB\_EcoM-VR7 genomo seka. Aptikti 293 hipotetiniai ASR, viena tRNR<sup>MET</sup>, keturiasdešimt trys hipotetiniai ankstyvieji promotoriai, keturiasdešimt trys viduriniai promotoriai, keturiasdešimt keturi vėlyvieji promotoriai bei 40 potencialių, nuo baltymo Rho nepriklausomų, terminatorių. Darbo metu buvo nustatyti labiausiai pakitusių, lyginant su fago T4, promotorių aktyvumai bei nustatyti fago VR7 promotorių tipinės sekos motyvai. Nustatytų sekų analizė bei tyrimas leido įrodyti naujos T4 tipo bakteriofagų filogenetinės grupės egzistavimą.

Disertacinio darbo metu taip pat buvo charakterizuoti bei klasifikuoti trys psichrofiliniai T4 giminingi bakteriofagai, kurių fiziologinės savybės yra nebūdingos jokiam literatūroje aprašytam, *E. coli* infekuojančiam T4 tipo bakteriofagui.

### **Ginamieji disertacijos teiginiai:**

- Nepaisant aptiktų pakitimų, bakteriofagų LZ, LZ1 bei LZ9 genomo sritys 30–31 pirminė struktūra pilnai atitinka T-lyginių bakteriofagų pogrupiui būdingą struktūrą.
- Bakteriofago VR7 genomo sritys 30.4 – 30.2 struktūrinės ypatybės yra nebūdingos jokiam žinomam T-lyginiam fagui.
- Bakteriofago VR7 genomineje DNR (169,285 bp) yra 293 hipotetiniai ASR, iš kurių 211 yra nuo 27% iki 97% homologiškai atitinkamiems fago T4 baltymams.
- Fago VR7 transkripcijos metu yra aktyvuojami trijų skirtingų klasių promotoriai: ankstyvieji (P<sub>E</sub>), viduriniai (P<sub>M</sub>) ir vėlyvieji (P<sub>L</sub>).
- Vidurinėsios bakteriofago VR7 transkripcijos aktyvatorius MotA atstato fago T4motAΔ gyvybingumą.



- Bakteriofagų VR7, VR5 bei VR20 fiziologinės savybės yra nebūdingos jokiam žinomam T-lyginiam bakteriofagui.
- Bakteriofagas VR7, kartu su VR grupės fagais bei fagu JS98, formuoja atskirą T4 giminingų bakteriofagų pogrupį. Šio pogrupio fagai skiriasi ne tik genetinė sandara, bet ir fiziologinėmis savybėmis.

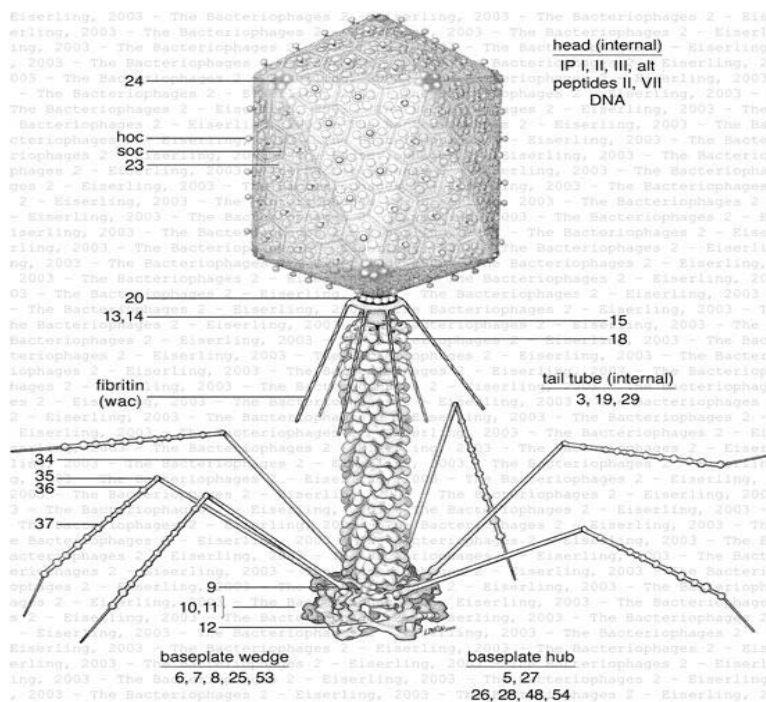
## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. T4 giminingi bakteriofagai: įvairovė, klasifikacija bei ekologija

Bakteriofagai (fagai) – bakterijas infekuojantys virusai – yra vieni skaitlingiausių bei plačiausiai paplitusių organizmų biosferoje. Aptinkami giluminiuose vandenyse, vandenynų ekosistemose, dirvoje, geriamo vandens telkiniuose ir net maiste kurį vartojame, bakteriofagai viršija bakterijų populiaciją santykiu 1:5 bei formuoja skaitlingiausių virusų grupę (Balter, 2000; Ackerman, 2001; Filée ir kiti, 2005; Kutter ir Sulakvelidze, 2005). Nuo 1959 m. buvo išskirta daugiau nei 5400 bakteriofagų, iš kurių mažiausiai 4950 buvo priskirti „uodeguotųjų“ fagų būriui *Caudovirales* (Ackerman, 2003; Fujii ir kiti, 2008). Vyrauja nuomonė, kad uodeguotieji fagai, kurių kilmės istorija siekia 3,5 milijardų metų, yra vieni seniausių iš žinomų virusų (Schopf, 1992; Ackerman, 1999; Kutter ir Sulakvelidze, 2005). Atsižvelgiant į uodegėlės struktūrą uodeguotieji bakteriofagai yra skirstomi į tris šeimas: *Myoviridae* (25% tirtų fagų), *Siphoviridae* (61%) bei *Podoviridae* (14%). Gausiausia *Myoviridae* šeimos gentį formuoja į fagą T4 panašių (T4-like) bakteriofagų grupė, kitaip dar vadinama T4 tipo bakteriofagų gentimi. T4 tipo bakteriofagai (1 pav.) yra virulentiški, dvigrandinės DNR (dsDNR) genomus turintys fagai. Jų virioną sudaro: pailgos ikosaedrinės formos galvutė, susitraukianti uodegėlė ( kurios apatinė praplatėjusi dalis vadinama bazine plokštele), nelanksčios trumposios bei lanksčios ilgosios ataugėlės (Ackerman ir kiti, 1997).

Šiuo metu literatūroje yra aprašyta ~ 300 T4 tipo fagų, kurių didžioji dalis T4 panašių bakteriofagų grupei buvo priskirti remiantis vien tik morfologiniais kriterijais (Ackerman ir Krisch, 1997; Klaus, 2003; Chibani-Chennoufi, 2004; Kutter ir Sulakvelidze, 2005). Pastarųjų metų tyrimai rodo, kad šios grupės fagai yra itin plačiai paplitę visame pasaulyje, o išskirti bei literatūroje minimi bakteriofagai tėra tik maža T4 tipo fagų įvairovės dalis. Nepaisant to, tarptautinis Virusų Taksonomijos Komitetas (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV) T4 giminingų fagų genčiai priskiria tik šešis bakteriofagus, t.y. *Escherichia coli* fagą T4, *Acinetobacter*

fagą 133, *Aeromonas fagus* Aeh1, 65 ir 44RR2.8t bei *Vibrio* fagą nt-1 (Lavigne ir kiti, 2009).



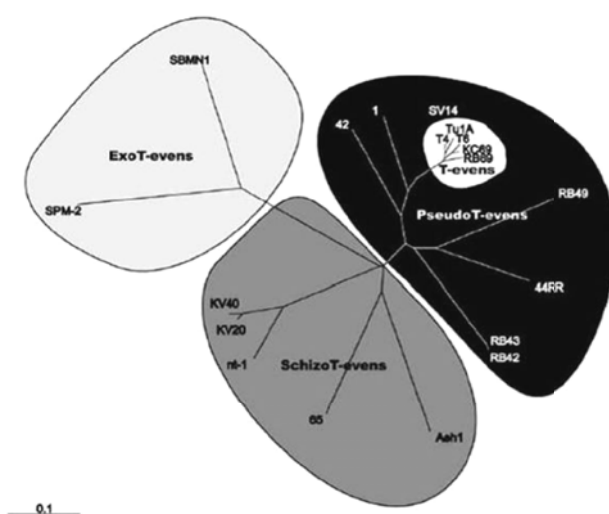
1 pav. Bakteriofago T4 viriono struktūra (iš Arisaka, 2005).

Dauguma T4 giminingų fagų buvo išskirta iš nutekamųjų vandenių pavyzdžių ar srutų, todėl vyrauja nuomonė, kad natūrali šių fagų vystymosi aplinka yra žinduolių žarnynas (Abedon, 1989, 1992). Literatūroje aptinkami keli tokią nuostatą patvirtinantys duomenys: 1) didžios dalies T4 tipo fagų optimali vystymosi temperatūra yra 37–40°C (artima žarnyno temperatūrai); 2) šių fagų vystymąsi teigiamai veikia 0,1–0,2 M koncentracijos vienvalenčiai kationai (žarnyne būna 0,1–0,15 M); 3) kai kurių T4 tipo fagų adsorbcijai prie ląstelės paviršiaus būtinas laisvas triptofanas, kuris taip pat aptinkamas žarnyne (Kutter ir kiti, 1994a).

Remiantis trijų pagrindinių viriono struktūrinių baltymų (gp18; gp19 ir gp23) sekų palyginimu T4 tipo fagai yra skirstomi į 4 pogrupius: T-lyginius (šiam pogrupiui priskirtas ir fagas T4), pseudo T-lyginius, šizo T-lyginius ir

egzo T-lyginius (2 pav.) (Hambly ir kiti, 2001; Tétart ir kiti, 2001; Desplats ir Krisch, 2003).

Minėtas skirstymas atitinka ir morfologines šių bakteriofagų ypatybes: T-lyginiai ir pseudo T-lyginiai yra labai panašūs į T4, šizo T-lyginių akivaizdžiai didesnė galvutė bei didesnis genomai, tuo tarpu egzo T-lyginiai skiriasi nuo fago T4 galvutės dydžiu, forma bei susitraukiančios uodegėlės ilgiu (Hambly ir kiti, 2001).



2 pav. T4 tipo bakteriofagų filogenetinė diagrama, gauta atlikus 19 T4 tipo fagų g23 sekos palyginimą (Desplats ir Krisch, 2003). Atskiros grupės pateiktos skirtingai nuspalvintame fone (T-lyginiai baltame; pseudo T-lyginiai juodame, šizo T-lyginiai tamsiai pilkame ir egzo T-lyginiai šviesiai pilkame fone).

Manoma, kad didėjantis morfologinis variabilumas T4 giminingų fagų pogrupiuose yra susijęs su šeimininkų, kuriuos jie infekuoja, didėjančiu filogenetiniu atstumu nuo *E. coli* (Tétart ir kiti, 2001; Desplats ir Krisch, 2003). T-lyginiai bakteriofagai buvo išskirti išimtinai iš enterobakterijoms (*Enterobacteriaceae*) priklausančių rūšių, tuo tarpu pseudo T-lyginiai, šizo T-lyginiai bei egzo T-lyginiai bakteriofagai buvo išskirti iš genetiškai labiau nuo *E. coli* nutolusių bakterijų rūšių, atitinkamai: -proteobakterijų (pvz.,

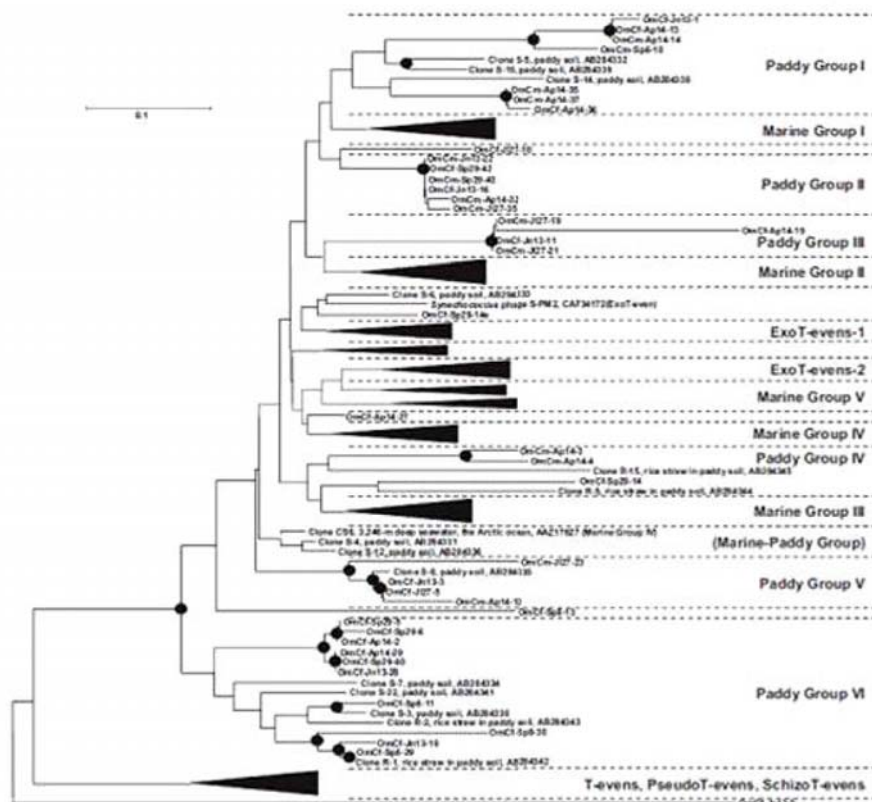
*Aeromonas*),  $\alpha$ -proteobakterijų (pvz., *Acinetobacter*, *Burkholderia*) bei cianobakterijų (pvz., *Synechococcus*).

Reikia paminėti, kad autoriai, pasiūlę šį T4 tipo bakteriofagų klasifikacijos metodą pastebėjo, jog gp23 palyginamoji analizė visiškai atitinka tiek gp18, tiek ir gp19 palyginamosios analizės rezultatus ir yra pakankama siekiant priskirti naujai išskirtą fagą kažkuriam iš minėtų T4 tipo fagų pogrupių, vadovaujantis nuostata, jog gp23 aminorūgščių sekos panašumas, lyginant su fago T4 gp23, pogrupiuose varijuoja atitinkamai 90% (T-lyginiai), 60% (pseudo T-lyginiai), 50% (šizo T-lyginiai) ir 30% (egzo T-lyginiai) (Hambly ir kiti, 2001; Tétart ir kiti, 2001; Desplats ir Krisch, 2003). Tokiu būdu, remiantis vien tik palyginamąja gp23 analize, vėliau buvo klasifikuota visa eilė naujai išskirtų bakteriofagų, pvz.: *Stenotrophomonas maltophilia* fagas Smp14 (Chen ir kiti, 2007) ar *Escherichia coli* fagas CEV1 (Raya ir kiti, 2006).

Ištyrus T-lyginių bakteriofagų RB69 ir Tu1a bei pseudo T-lyginio fago SV14 genomus buvo pastebėta, kad jų genomai yra chimeriniai t.y. sudaryti iš segmentų, kurių dalis galėtų būti kildinama iš T-lyginių, o kita dalis – iš pseudo T-lyginių bakteriofagų, pvz.: fago RB69 DNR polimerazės geno 43 panašumas atitinkamai fago T4 geno nukleotidų sekai tesiekia 65% (kas būdinga pseudo T-lyginių fagų pogrupiui), tuo tarpu g23 nukleotidų seka mažiau nei 10% tesiskiria nuo T4 g23 (būdinga T-lyginių fagų pogrupio bakteriofagams) (Tetart ir kiti, 2001). 2003 metais Dr. H. Krisch pasiūlė tokius fagus išskirti į atskirą “mezo-T-lyginių” fagų pogrupį (citata iš laiško hab. dr. R. Nivinskui), tačiau šis pogrupis jokioje mokslinėje publikacijoje vėliau nebuvo minėtas, galbūt dėl to, kad naujų bakteriofagų, kurie filogenetiškai užimtų tarpinę padėtį tarp T-lyginių bei pseudo T-lyginių fagų, išskirta nebuvo.

Metagenominė įvairių jūrų vandens (Filée ir kiti, 2005) bei Japonijos dirvos pavyzdžių (Jia ir kiti, 2007; Fujii ir kiti, 2008) analizė, panaudojant degeneruotus diagnostinius g23 pradmenis, parodė, kad T4 tipo bakteriofagų įvairovės keturi pogrupiai neatspindi. Pasak Fujii ir kolegų, be jau minėtų

keturių pogrupių, T4 tipo fagų grupę formuoja dar mažiausiai vienuolika filogenetinių pogrupių (3 pav.).



3 pav. Filogenetinė g23 diagrama (Fujii ir kiti, 2008), sudaryta palyginus įvairių jūrų vandens pavyzdžių bei Japonijos dirvos pavyzdžių g23 diagnostinių PGR fragmentų sekas su atitinkamais g23 sekų fragmentais fagų, kurių DNR sekos aptinkamos genų banke.

Tuo tarpu Zuber ir bendraautoriai (2007), surinkę gausią kolekciją bakteriofagų, išskirtų iš klinikinių pavyzdžių Bangladeše bei nutekamųjų vandenų Šveicarijoje, dėl nenurodytų priežasčių nusprendė nepaisyti T4 tipo fagų grupės klasifikacijos principus pasiūliusiu autorių rekomendacijų. Atlikę surinktos fagų kolekcijos filogenetinę diagnostinių g23 PGR fragmentų analizę autoriai teigia, kad T4 giminingi fagai yra skirstomi į jau minėtas keturias grupes (ne pogrupius), o T-lyginių fagų grupę turėtų būti skirstoma į tris pogrupius, atstovaujamus atitinkamai T4, RB69 bei JS98 bakteriofagų.

Apibendrinę Filée ir bendraautorių gautus rezultatus bei atlikę metagenominę analizę pavyzdžių, surinktų pasaulinės vandenynų vandens tyrimo ekspedicijos (*Global Ocean Sampling (GOS)*) metu, Comeau ir Krish (2008) teigia, kad T4 giminingi bakteriofagai yra superšeima (superfamily) fagų, kurie turėtų būti skirstomi į tris grupes: 1) Artimą T4 (Near T4), kuriai priskirtini T-lyginiai, pseudo T-lyginiai bei šizo T-lyginiai fagai, 2) Tolimą T4 (Far T4), atstovaujamą egzoT-lyginio fago RM378, kuriai priskirtini visi buvę egzo T-lyginiai, bet ne iš cianobakterijų išskirti fagai ir 3) Ciano-T4 (Cyano T4), formuojamą visų lig šiol iš cianobakterijų išskirtų fagų (pvz., *Synechococcus* fagas S-PM2).

Po metų Lavigne ir bendraautoriai (2009) pasiūlė dar vieną naują T4 tipo bakteriofagų klasifikavimo sistemą. Pasak autorių, T4 giminingų bakteriofagų genčiai galima priskirti ir į smulkesnius taksonominius vienetus skirstyti tik tuos fagus, kurių genomines DNR seka yra visiškai nustatyta. Oponuodami lig šiol plačiai paplitusiam T4 tipo fagų klasifikavimo principui, naudojant palyginamąją didžiojo viriono baltymo gp23 analizę, autoriai siūlo šiuos fagus klasifikuoti naudojant viso genomo DNR sekos lyginimą. Ištyrę šimto dviejų *Myoviridae* šeimos bakteriofagų, aptinkamų NCBI bei Tulano Universiteto duomenų bazėse, Lavigne ir kiti teigia, kad norint jog T4 giminingų bakteriofagų klasifikacija atspindėtų šių fagų gamtinę įvairovę, būtina įsteigti naują *Teequatrovirinae* pošeimį. Šis pošeimis turėtų būti skirstomas į „T4-panašių“ (T4-like) bei „KVP40-panašių“ (KVP40-like) virusų gentis, o „T4-panašių“ fagų genties atstovai (t.y. fagai, kurių genomuose aptinkamas tam tikras skaičius (>70%) homologinius baltymus koduojančių genų) turėtų būti suskirstyti į keturias grupes: T4-tipo, 44RR-tipo, RB43-tipo bei RB49-tipo bakteriofagai. Taip pat teigiama, kad iš cianobakterijų išskirtų bakteriofagų panašumas į fagą T4 yra diskutuotinas, todėl šie fagai neturėtų būti priskiriami T4 giminingų bakteriofagų grupei ar, juo labiau, naujai pasiūlytam *Teequatrovirinae* pošeimiui.

Šiandien yra sunku numatyti kiek pastarieji T4 giminingų bakteriofagų klasifikavimo siūlymai sulauks mokslo visuomenės pripažinimo ateityje.

Bakteriofagų tyrėjų pripažinimo sulaukę keturi T4 tipo fagų sisteminiai pogrupiai, be abejonės, neatspindi realios šių fagų įvairovės gamtoje. Nepaisant to, Ackermann ir Krisch (1997), Hambly ir kiti (2001), Tétart ir kiti (2001) bei Desplats ir Krisch (2003) pasiūlytas klasifikavimo principas yra gan efektyvus ir ekonomiškai siekiant klasifikuoti naujai išskirtus kultivuojamus bakteriofagus.

### **1.2. Bendra T4 giminingų bakteriofagų genomų apžvalga**

Kaip jau buvo minėta, T4 giminingi bakteriofagai yra itin heterogeniška bakterinių virusų grupė. Be abejo, iš visų šios grupės fagų geriausiai ir nuodugniausiai yra ištirtas bakteriofagas T4, kurio 168,9 kb dydžio genomo nukleotidų seka taip pat buvo nustatyta pirmiausiai (Miller ir kiti, 2003a). Intaktinės bakteriofago T4 DNR molekulės yra linijinės, tačiau galinėse dalyse jos yra cikliškai permutuotos, todėl, kartiruojant visą bakteriofago genomą, sudarytas žiedinis fago T4 genolapis (Streisinger ir kiti, 1964; Kutter ir kiti, 1994b).

Bakteriofago T4 DNR sudėtyje esantis citozinas pakeistas 5-hidroksimetilcitozinu (HmC). Hidroksilinės 5-hidroksimetilcitozino grupės gali būti monogliukozilintos, digliukozilintos arba negliukozilintos. T4 fage beveik 100% HmC liekanų yra monogliukozilintos  $\alpha$  ir  $\beta$  padėtyje (30% ir 70% atitinkamai) (Miller ir kiti, 2003a), o pavyzdžiui T-lyginių fagų T2 ar T6 DNR ne visos HmC liekanos yra monogliukozilintos (Lehman ir Pratt, 1960; Rifat ir kiti, 2008). Tokio pobūdžio modifikacijos saugo bakteriofago DNR nuo endonukleazių, dalyvaujančių ląstelės-šeimininkės DNR degradavime, taipogi nuo ląstelės-šeimininkės restrikcijos endonukleazių (Carlson ir kiti, 1994; Monod ir kiti, 1997). Reikia paminėti, kad ši fago T4 DNR ypatybė nėra universali ne tik T4 giminingų, bet ir T-lyginių fagų tarpe. Pavyzdžiui, tyrinėjant T-lyginių fagų pogrupiui priklausančius fagus RB69 bei JS98 ar pseudo T-lyginius fagus RB42, RB43 ir RB49 buvo nustatyta, kad jų DNR sudėtyje esantis citozinas nėra pakeistas hidroksimetilcitozinu. Todėl šių fagų DNR hidrolizuoja restriktazės, kurios nekarpo g-HmC turinčios DNR. Tuo



tarpu pseudo T-lyginio fago 44RR DNR nehidrolizuoja restriktazė *EcoRV*, kuri puikiai karmo tiek T4, tiek ir fagų RB69, RB42, RB43 ar RB49 DNR. Gali būti, kad šio fago DNR yra dar kitaip modifikuojama, negu T4 (Monod ir kiti, 1997). Nenustatytos prigimties modifikacijų buvo aptikta ir fagų Smp14 (Chen ir kiti, 2007) bei Kpp95 DNR (Wu ir kiti, 2007). Ko gero dėsninga yra tai, kad genomuose fagų, kurių DNR sudėtyje vietoj HmC yra citozinas, neaptinkama tokių T4 genų analogų, kaip *a-gt* bei *b-gt* (HmC gliukozilazes koduojantys genai), *g42* (dCMP hidroksimetilazės genas), transkripciją nuo citoziną turinčios DNR blokuojantį baltymą Alc koduojančio geno bei endonukleazės IV geno *denB* (Miller ir kiti, 2003a,b; Chibani-Chennoufi ir kiti, 2004b; Petrov ir kiti, 2006; Lavigne ir kiti, 2009).

Manoma, kad T4 genome iš viso yra apie 300 baltymus koduojančių genų, iš kurių apie 150 yra identifikuoti ir apibūdinti. Be šių genų aptiktos 8 tRNR, kurios atpažįsta retai *E. coli* pasitaikančius kodonus, bei mažiausiai 2 genai, koduojantys mažas, bet stabilias RNR, kurių funkcija lig šiol nežinoma (Kutter ir kiti, 1996; Miller ir kiti, 2003a). Pasak Miller ir bendraautorių (2003a), T4 genome aptinkamų tRNR kiekis gali būti susijęs su akivaizdžiu A+T/G+C santykio skirtumu, lyginant su ląstelės šeimininkės A+T/G+C santykiu. Tam, kad genetinė informacija būtų realizuojama efektyviai, t.y. būtų panaudoti visi įmanomi aminorūgštis koduojantys tripletai, yra būtinas A+T/G+C santykis 50%/50%, tuo tarpu T4 šis santykis yra 64.7%/34.3%. Ilgą laiką buvo manoma, kad panaši nukleotidų santykio ir tRNR skaičiaus koreliacija tuėtų išlikti ir kitų T4 tipo fagų genome, tačiau ši prielaida nepasitvirtino, pvz. fago RB49 genomineje DNR aptinkama tik 40% G+C, tuo tarpu tRNR neaptikta (Nolan ir kiti, 2006). Akivaizdu, kad ne tik baltymus koduojančių, bet ir tRNR genų kiekis genome yra individuali kiekvieno T4 giminingo fago geno charakteristika, tačiau Comeau ir bendraautoriai (2007) pastebėjo, kad ne enterobakterijas infekuojantys T4 giminingi fagai paprastai turi daugiau tRNR genų, nei *E. coli* infekuojantys fagai. Neseniai buvo nustatyta, kad už tRNR genų pernešimą tarp T4 giminingų fagų gali būti atsakinga faginė endonukleazė SegB (Brok-Volchanskaya ir kiti, 2008), o

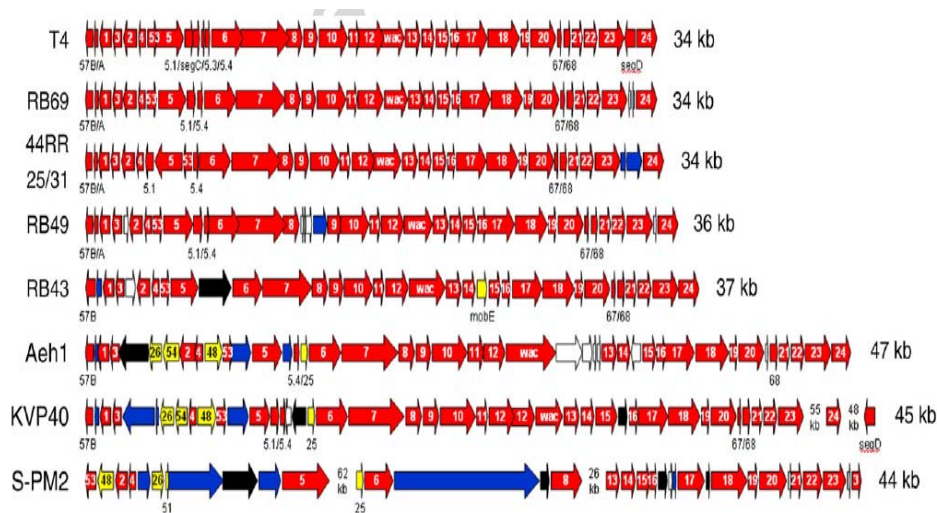
didesnis tRNR genų kiekis gali teigiamai įtakoti fago virulentiškumą (Bailly-Bechet ir kiti, 2007).

Fago T4 genome yra nedaug esminių genų - lig šiol tik apie 60 fago T4 genų yra apibūdinami kaip esminiai. Tradiciškai esminiai genai nustatomi pagal sąlyginai letalius šių genų mutantus (Epstein ir kiti, 1963), kurie gali vystytis tik supresoriniuose *E. coli* kamienuose, arba esant atitinkamai temperatūrai. Tuo tarpu deleciniai esminių genų mutantai gali vystytis tik tuomet, kai šių genų produktai ląstelėje sintetunami nuo rekombinantinių plazmidžių, turinčių atitinkamus genus (Selick ir kiti, 1988; Engman ir Kreuzer, 1993). Didžiąją esminių genų dalį (~40) sudaro fago viriono struktūrinius baltymus koduojantys genai bei genai, kurių produktai dalyvauja viriono susidaryme (šaperonai bei DNR supakavimo baltymai). Tarp esminių taip pat yra 17 replikacijos baltymus koduojančių genų bei 3 nukleotidų metabolizmo fermentų genai. Dviejų esminių genų produktai reikalingi transkripcijai, o dar du koduoja endonukleazes, dalyvaujančias šeimininko DNR degradacijoje (Miller ir kiti, 2003a).

T4 tpo fagų genomuose aptinkami tiek esminių, tiek ir neesminių fago T4 genų atitikmenys. Manoma, kad laboratorinėmis sąlygomis neesminiai genai gali būti itin svarbūs tam tikras ekologines nišas užimantiems fagams natūralioje aplinkoje (Kutter ir kiti, 1996; Miller ir kiti, 2003b; Nolan ir kiti, 2006; Zuber ir kiti, 2007). Ši teiginį puikiai iliustruoja viriono kapsidės (1 pav.) baltymus koduojančių genų konservatyvumo pavyzdys. Bakteriofago T4 viriono kapsidė yra daugiamolekulinis darinys, kurio struktūra formuojama trijų esminių (*g23*, *g24* ir *g20*) bei dviejų neesminių (*soc* ir *hoc*) fago genų koduojamų baltymų (Ishii and Yanagida, 1977; Leiman ir kiti, 2003; Fokine ir kiti, 2004). T4 *gp23*, kuris sudaro 55% visos kapsidės masės, yra svarbiausias viriono galvutės komponentas, o jį koduojančio geno analogai aptikti absoliučiai visuose tirtuose T4 gimininguose faguose. Tuo tarpu, fago T4 genas *24* – ne itin konservatyvus, o egzo T-lyginio S-PM2 genome T4 *g24* analogo netgi nėra (Comeau ir kiti, 2007; Comeau ir Krisch, 2008). Abiejų neesminių genų *soc* bei *hoc* paplitimas T4 gimininguose faguose yra skirtingas. Manoma,

kad Hoc padeda fagui T4 “apgauti” žinduolių imuninę sistemą (Dabrowska ir kiti, 2006), o šį baltymą koduojančio geno analogai aptikti daugelyje T4 giminingų fagų (Petrov ir kiti, 2006). Kapsidės paviršiaus baltymas Soc saugo virioną nuo įvairių žalingų aplinkos faktorių (pvz., osmotinio šoko, šarminių medžiagų ar aukštos temperatūros poveikio), tačiau jį koduojantis genas, iš visų struktūrinių galvutės baltymų, bene rečiausiai aptinkamas kituose T4 tipo bakteriofaguose (Comeau ir Krisch, 2008).

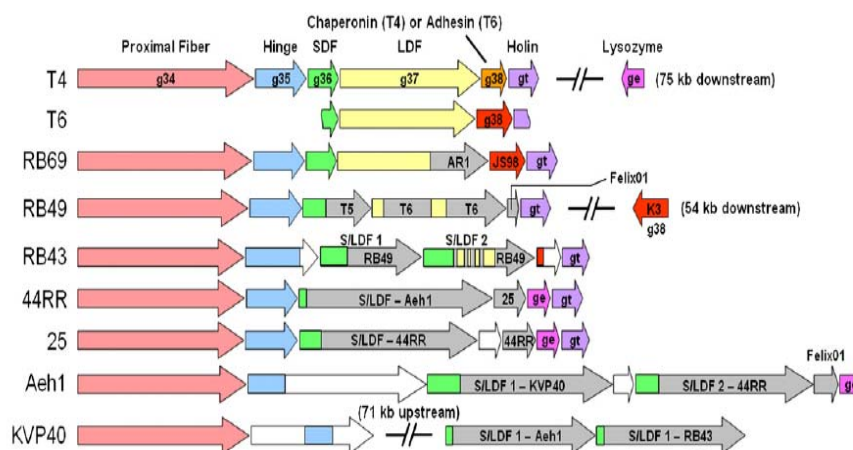
Lyginant T4 giminingų fagų genomus, nustatyta, kad didžiausia homologija pasižymi dvi funkcinės genų grupės: viriono struktūriniai bei replikacijos ir su ja susijusius procesus koduojantys genai. Bakteriofago T4 viriono struktūrą formuojančių baltymų genai yra išsidėstę dvejose sankaupose. Dauguma struktūrinių genų sudaro didžiąją sankaupą, išsidėsčiusią centrinėje genomo dalyje, o ~27 kb atokiau esanti, penkių ataugėlių baltymus koduojančių genų grupė (g34 – g38), formuoja mažąją struktūrinių genų sankaupą (Revel, 1981; Coombs ir Arisaka, 1994; Miller ir kiti, 2003a).



**4 pav. T4 giminingų bakteriofagų konservatyvaus struktūrinių genų modulio palyginimas (Comeau ir kiti, 2007).** Raudona spalva pažymėti fago T4 genų homologai; geltona – translokuoti fago T4 homologai; mėlyna – genai neaptinkami T4, bet homologiški kitų fagų genomams; juoda – bakterinės kilmės ASR; balta – nežinomos kilmės ASR.

Didžiosios struktūrinių genų sandaupos konservatyvumas skirtingų T4 tipo fagų genomuose yra nevienodas (4 pav.), tačiau daugumos T-lyginių bei pseudo T-lyginių fagų genominiėje DNR šios sritys yra daugmaž kolinearos. (Desplats ir Krisch, 2003; Nolan ir kiti, 2006; Zuber ir kiti, 2007). Šizo T-lyginių fagų mažiausiai konservatyvūs yra didžiosios struktūrinių genų sandaupos galiniai segmentai (Miller ir kiti, 2003b; Nolan ir kiti, 2006). Tuo tarpu egzo T-lyginių fagų (pvz., S-PM2) struktūriniai genai labiau išsklaidyti, o fago T4 genominei DNR kolinearai tėra geno sritis g13 – g23 (Mann ir kiti, 2005).

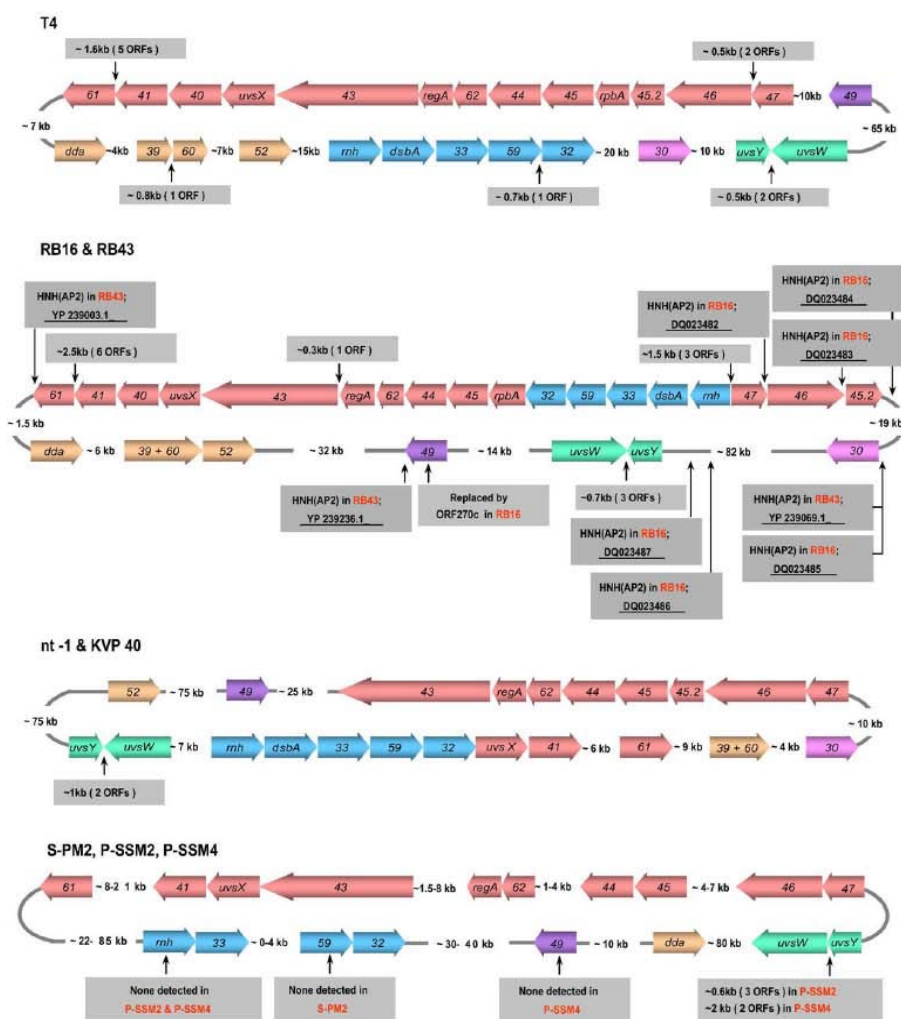
T4 giminingų fagų struktūrinių genų grupėje didžiausia sekų įvairovė pasižymi tie genai, kurie koduoja tiesiogiai su ląstele šeimininke kontaktuojančių viriono dalių baltymus, t.y. tam tikrus bazinės plokštelės segmentus, viriono ataugėles, IP ir pan.. Minėti genai neretai dar būna ir mozaikiški, t. y. susideda iš įvairių fagų DNR fragmentų. Manoma, kad tokią sekų įvairovę apsprendžia itin didelis šių hipervariabilių sričių rekombinacijos dažnis, kas yra ypač pravartu bakteriofagui plečiant savo šeimininkų ratą bei konkuruojant dėl jų su kitais fagais (Repoila ir kiti, 1994; Tétart ir kiti, 1998; Miller ir kiti, 2003b; Sullivan ir kiti, 2005; Comeau ir kiti, 2007). Puikus tokio kintamumo pavyzdys yra viriono ataugėlių genų sandauga (4 pav.).



5 pav. T4 giminingų bakteriofagų mažojo struktūrinių genų modulio palyginimas (Comeau ir kiti, 2007). Pilka spalva nuspalvinti atitikmens fago T4 genome neturintys, bet kituose T4 tipo faguose identifikuoti genai; balta spalva – genai, neturintys analogų kituose T4 tipo fagų genomuose; kitos spalvos atitinka homologinius genus.

T4 tipo bakteriofagų genomų analizė parodė, kad šios genų grupės koduojamų baltymų panašumas į atitinkamus T4 baltymus, pradedant gp34, nuosekliai mažėja, o šią panašumo mažėjimo tendenciją galima iliustruoti: gp34>gp35>>gp36>>gp37>>gp38 (Comeau ir kiti, 2007; Zuber ir kiti, 2007).

Priešingai nei struktūriniai genai, replikacijos bei su replikacija susijusių procesų baltymus koduojantys genai formuoja nedideles, po visą genomą išsibarsčiusias genų sanaukas, kurių sudėtyje dar yra aptinkami ir kitų funkcijų genai.

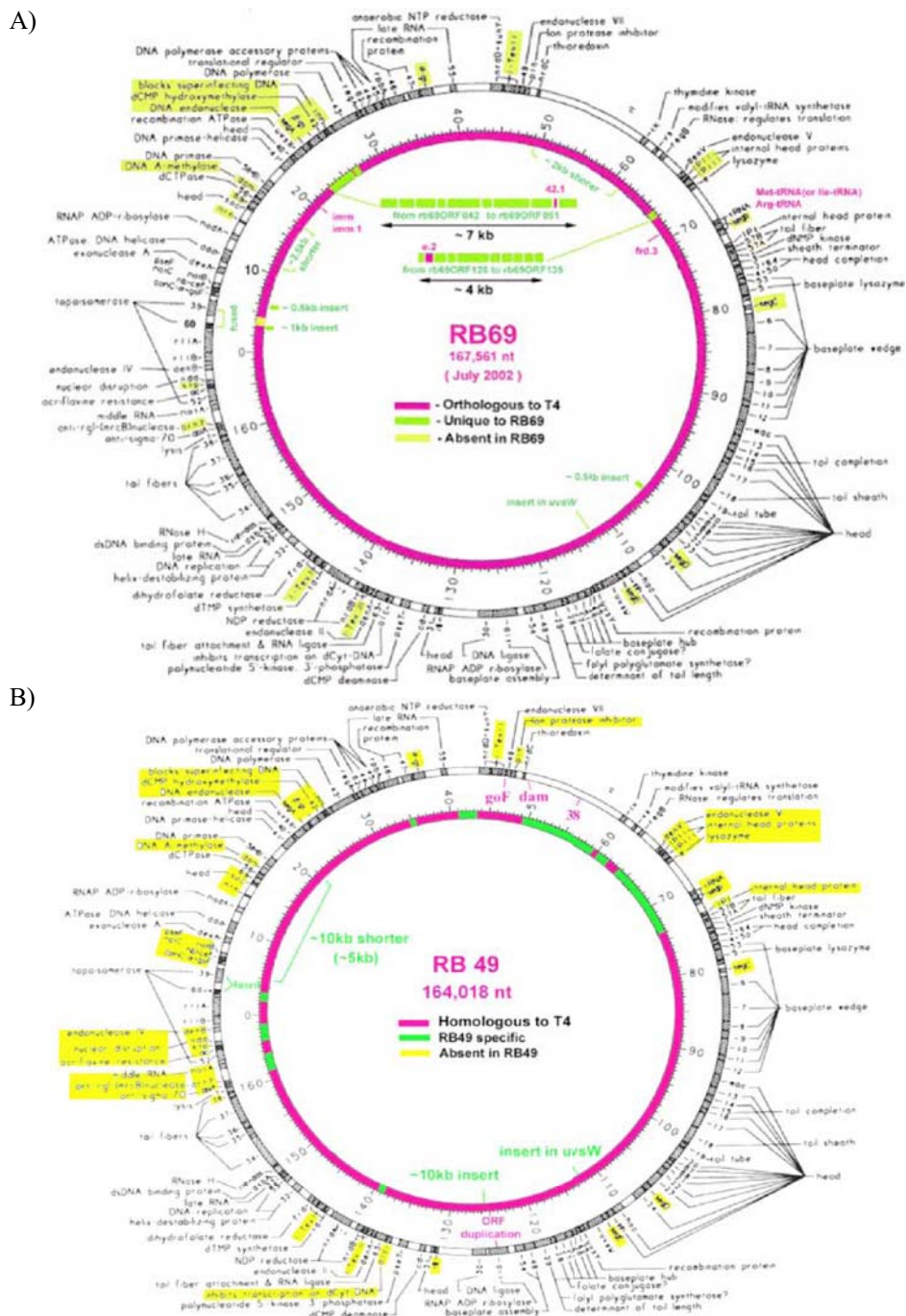


6 pav. T4 tipo bakteriofagų replikacijos bei su replikacija susijusių procesų baltymus koduojančių genų struktūrinės organizacijos palyginimas (iš Petrov ir kiti, 2006).

Petrov'o ir bendraautorių (2006) metais atlikta palyginamoji T4 giminingų fagų replikacijos–reparacijos–rekombinacijos (RRR) genų analizė parodė, kad šios funkcinės grupės genų išsidėstymą minėtų fagų DNR galima būtų suskirstyti į kelias grupes. Daugumos T4 tipo bakteriofagų RRR genų išsidėstymas bei struktūra yra panašūs į T4, o didžiausi skirtumai aptinkami nežinomos funkcijos (o kartais ir kilmės) ASR pozicijose. Dviejų pseudo T-lyginių fagų RB43 bei RB16 RRR genai yra labiau koncentruotai išsidėstę viename genomo segmente, o kai kurių iš šių genų (pvz., *g47* – *g45.2*) nurašymo kryptis skiriasi nuo T4. Be to šių fagų genomuose nėra tam tikrų fago T4 RRR genų homologų (pvz., endonukleazę V koduojančio geno *denV*). Šizo T-lyginių fagų nt-1 bei KVP40 genomineje DNR fago T4 RRR genų homologų išsidėstymas bei skaičius dar labiau skiriasi, o egzo T-lyginių S-PM2, PSSM-2 bei P-SSM4 genomuose fago T4 replikacijos-reparacijos-rekombinacijos genų homologų aptikta mažiausiai, tačiau jų išsidėstymas atitinka T4.

Apibendrinus palyginamosios bei mutacinės įvairių T4 giminingų fagų replikacijos baltymų analizės rezultatus, buvo pastebėta, kad ganėtinai konservatyvios yra tos aminorūgštys, kurios formuoja kataliziškai aktyvius šių baltymų centrus. Tuo tarpu sritys, kuriomis minėti baltymai sąveikauja su kitais replikacijos komplekso baltymais – itin variabilios. Buvo suformuluota hipotezė, kad vieno replikacijos baltymo struktūriniai pokyčiai sąlygoja pokyčius kituose replikacinės sistemos baltymuose taip, kad šių baltymų tarpusavio išsidėstymas bei sąveika su DNR (RNR) pakinta, bet komplekso biologinės funkcijos yra išsaugomos (Yeh ir kiti, 1998; Borjac-Natour ir kiti, 2004; Petrov ir kiti, 2006).

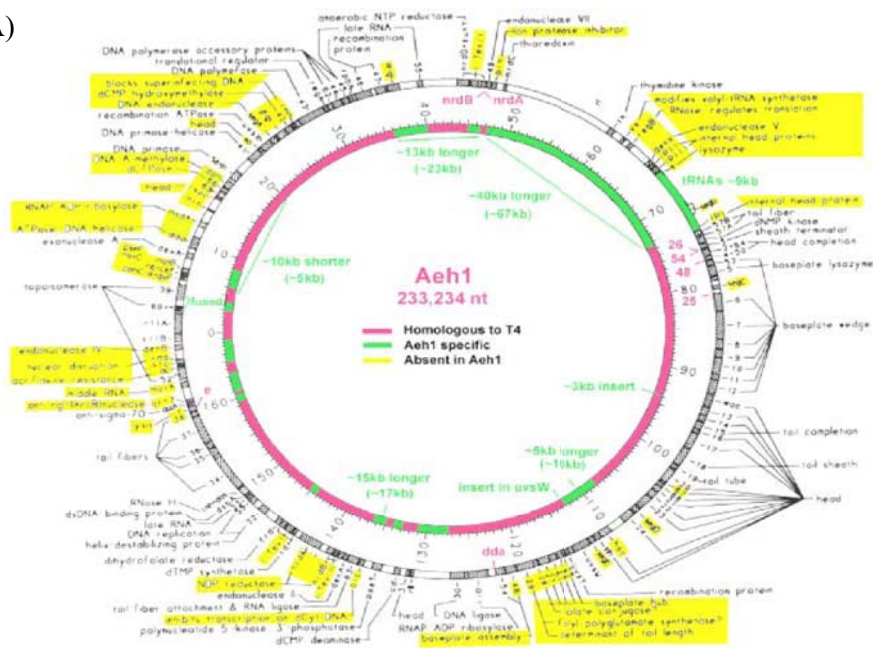
Šiuo metu internetinėse duomenų bazėse galima aptikti dvidešimt penkių T4 tipo bakteriofagų genomų sekas besiskiriančias tiek dydžiu, tiek ir genetinė sandara. Visus keturis T4 tipo bakteriofagų pogrupius atstovaujančių fagų genolapiai pateikti 7(I) ir 7(II) pav.



7 (I) pav. T-lyginio bakteriofago RB69 (A) bei pseudo T-lyginio fago RB49 žiedinių genolapių schema bei palyginimas su T4 (iš <http://phage.bioc.tulane.edu>). Alyvine spalva nuspalvintos T4 fagai homologinės sritys, žalia – unikalios sekos, geltona spalva žymi genus, kurių duotame fage neaptikta.

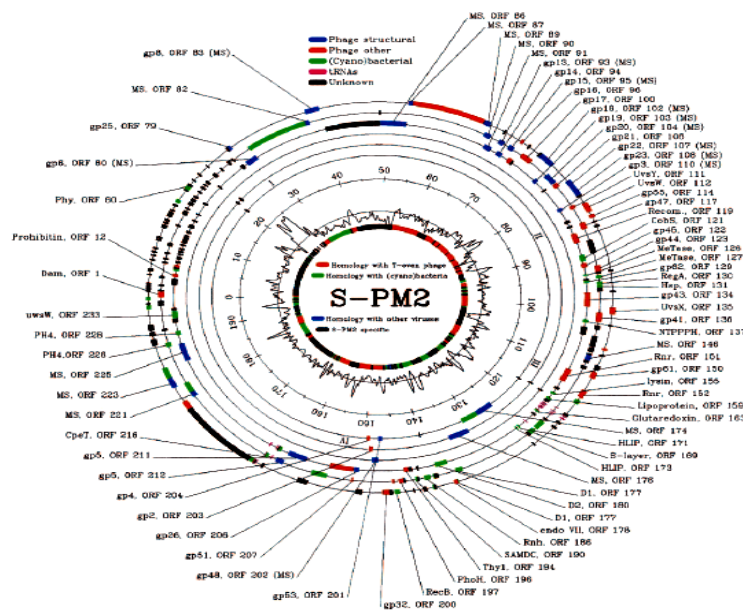


A)



4 (II) pav. (A) Šizo T-lyginio bakteriofago Aeh1 (iš <http://phage.bioc.tulane.edu>) žiedinio genolapio schema bei palyginimas su T4. Alyvine spalva nuspalvintos T4 fagui homologinės sritys, žalia – unikalios sekos, geltona spalva žymi fago T4 genus, kurių šio fago genome neaptikta.

B)



7 (II) pav. (B) Egzo T-lyginio bakteriofago S-PM2 žiedinis genolapis (Mann ir kiti, 2005). Pirmieji išoriniai 6 žiedai žymi atskirus skaitymo rėmelius, 7-as – atstumą (kb), 8-as – G+C kiekį. Žalia spalva pažymėtos cianobakterijoms homologinės sritys, mėlyna – struktūriniai genai, raudona – genai, kurių homologai aptinkami T-lyginiuose faguose, alyvinė – tRNR, juoda – nenustatytos kilmės ASR.



Nepaisant įvairių skirtumų, visiems tirtiems T4 tipo fagų genomams yra būdingos kelios ypatybės:

1. T4 tipo bakteriofago genomai yra didelė (>160–250 kb) dvigrandinė dsDNR molekulė. Didžiąją dalį geno (>90%) sudaro genai, kurie yra išsidėstę bei nurašomi tiek nuo l-DNR, tiek ir nuo r-DNR grandinių (Comeau ir kiti, 2007);

2. Absoliutus T4 tipo bakteriofago genominės DNR G+C nukleotidų kiekis yra mažesnis nei ląstelės-šeimininkės kas, kaip manoma, teigiamai įtakoja fago transkripcijos bei replikacijos procesus (Miller ir kiti, 2003b; Mann ir kiti, 2005; Lavigne ir kiti 2009);

3. Daugelis T4 tipo bakteriofago genų yra susitelkę į funkcinius modulius. Genai tokiuose moduluose neretai yra išsidėstę viena kryptimi ir turi bendras reguliacines sekas (Revel, 1981, Nolan ir kiti, 2006; Comeau ir kiti, 2007). Manoma, kad toks genų išsidėstymas padeda koordinuoti jų produktų sintezę (Coombs ir Arisaka, 1994; Hsu ir Karam, 1990);

4. T4 tipo bakteriofago genome aptinkamas tam tikras kiekis fago T4 ASR homologų. Tokių ASR skaičius koreliuoja su fago giminingumu bakteriofagui T4, pvz. T-lyginio kolifago RB69 genome aptikta 211 (78% visų šio fago genų) T4 ASR atitikmenų (Nolan ir kiti, 2006), tuo tarpu egzo T-lyginiam *Synechococcus* fage S-PM2 nustatyta tik 40 (17%) fago T4 genų homologų (Mann ir kiti, 2005).

### **1.3. T4 giminingų bakteriofagų genų raiškos reguliacija**

Šio skyriaus pradžioje pirmiausia derėtų paminėti, kad tik fago T4 atveju buvo atlikti detalūs bei gan išsamūs genų raiškos tyrimai. Tuo tarpu kitų T4 giminingų fagų atveju apie genų raiškos ypatumus dažniausiai sprendžiama “analogijos principu”, t.y. ieškant fago T4 reguliacines sekas atitinkančių sekų arba atliekant palyginamąją aminorūgščių sekos analizę baltymų, kurių vaidmuo fago T4 genų raiškoje yra pilnai arba bent dalinai išaiškintas.

Bakteriofago DNR patekus į bakterinę ląstelę palaipsniui sustabdomi visi joje vykstantys procesai, o ląstelės komponentai pajungiami fago

vystymuisi. Sėkmingam fago vystymuisi reikalinga nuosekli genų raiška, sąlygota makromolekulių jungimosi į sudėtingas struktūras, todėl evoliucijos eigoje išsivystė daugiapakopiai mechanizmai, leidžiantys, pasitelkus santykinai mažu fago genų skaičiumi, efektyviai kontroliuoti šiuos procesus.

Fago T4 genomo organizacija atspindi fago vystymosi programą, kurios esmė – atitinkamų genų produktai yra sintetinami reikiamu laiku bei reikiamais kiekiais. Genų raiškos kontrolė laike yra realizuojama daugiausia transkripcijos iniciacijos lygyje nuosekliai aktyvuojant vis kitas promotorių klases (Mosig ir Hall, 1994; Kutter ir Sulakvelidze, 2005). Fago T4 vystymosi stadijas infekcinio ciklo metu kontroliuoja trys promotorių klasės – ankstyvieji ( $P_E$ ), viduriniai ( $P_M$ ) ir vėlyvieji ( $P_V$ ) – nuo kurių yra inicijuojama fago genų transkripcija. Skirtingas promotorių stiprumas turi įtakos transkriptų, o tuo pačiu ir koduojamo baltymo kiekiui (Wilkens ir Rüger, 1996), tačiau kiekybinė reguliacija daugiausia vyksta potranskripciniame lygyje. Daugelis fago genų yra nurašomi nuo kelių klasių promotorių, todėl transkripcijos laikas negali būti pagrindiniu vertinimo kriterijumi nustatant geno produkto pasireiškimo pradžią. Nemažai genų, kurių produktai sintetinami tik vėlyvojo periodo metu, gali būti nurašomi ir nuo ankstyvųjų ir nuo viduriniųjų promotorių, bet šiame etape jų transliacija yra vienu ar kitu būdu inhibuojama. Taip pat yra žinomi keli fago T4 genai, kurie yra transkribuojami nuo visų tipų promotorių ir ekspresuojami per visą fago vystymosi ciklą.

Visuose fago T4 vystymosi etapuose dalyvauja tiek ląstelės šeimininkės, tiek paties bakteriofago DNR koduojami baltymai. Pradinę transkripciją, tuoj po fago DNR patekimo į ląstelę, vykdo nmodifikuota bakterinė RNR polimerazė, kuri atpažįsta tiek bakterinius promotorius, tiek faginius promotorius. Infekcijos eigoje ši polimerazė yra kryptingai pakeičiama taip, kad specifiskai atpažintų naujas fago promotorių grupes. Transkripcijos terminacijoje, transkriptų brendimo bei transliacijos procesuose taip pat dalyvauja ir ląstelės šeimininkės, ir fago koduojami baltymai. Tuo tarpu bakteriofago T4 DNR metabolizmas, ypač replikacija, yra gana autonomiškas procesas (Drake ir Kreuzer, 1994; Kutter ir Sulakvelidze, 2005). Įdomu tai, kad

visuose be išimties lig šiol tirtuose T4 tipo bakteriofaguose koduojami savi – faginiai – replisomos baltymai (Petrov ir kiti, 2006; Filée ir kiti, 2006; Zuber ir kiti, 2007). Fago T4 atveju, DNR replikacija yra tarsi pagrindinis procesas, koordinuojantis genų raiškos reguliaciją. Priešreplikaciniame periode yra sintetinami baltymai, reikalingi pajungiant ląstelės resursus fago naudai, DNR metabolizmo bei modifikacijos baltymai, transkripcijos aktyvatoriai bei transliacijos reguliatoriai ir fago tRNR. Vėlyvųjų genų transkripcijai yra tinkama tik besireplikuojanti DNR. Šio periodo metu yra sintetinami fago viriono struktūriniai komponentai, DNR pakavimo fermentai bei ląstelės lizės fermentai (Mosig ir Hall, 1994).

### 1.3.1. Genų raiškos reguliacija transkripcijos metu

Kaip jau buvo minėta, transkripcijai nuo faginės DNR vykdyti bet kuriam iš T4 giminingų bakteriofagų yra būtina bakterinė RNR polimerazė (RNRP). Bakterinės RNRP šerdinę dalelę sudaro keturi polipeptidai:  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\alpha$  subvienetų dimeras ir  $\omega$  subvienetas, kurie kartu su specifiskumą tam tikrai promotorių klasei apsprendžiančiu  $\sigma$  sveiksniu formuoja RNRP holofermentą ( $E\sigma$ ) (Maeda ir kiti, 2000). RNRP šerdinė dalelė yra fermentiškai aktyvi t.y. gali vykdyti transkripcijos elongaciją, tačiau promotorių atpažinimui ir transkripcijos inicijacijai yra būtina, kad RNRP būtų holofermento pavidalu (Ishihama, 1993; Gross ir kiti, 1998; Murakami ir Darst, 2003). Šiuo metu yra žinomi septyni skirtingų rūšių *E. coli*  $\sigma$  veiksniai: pagrindinis (neretai dar vadinamas „namų ūkiu“, angl. housekeeping)  $\sigma^{70}$  bei dar šeši alternatyvūs veiksniai  $\sigma^{54}$ ,  $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^S$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^E$  ir  $\sigma^{FecI}$ , kurie yra svarbūs ląstelėms esant tam tikros fiziologinės būsenos arba paveiktoms ypatingų aplinkos sąlygų (Gruber ir Gross, 2003; Zhao ir kiti, 2010). Kiekvienas iš išvardintų sigma veiksnių yra atsakingas už skirtingų promotorių klasių atpažinimą, bet  $\sigma^{70}$  promotorių *E. coli* genome aptinkama daugiausiai (Mendoza-Vargas ir kiti, 2009). Lyginant skirtingų eubakterijų  $\sigma^{70}$  šeimos baltymų sekas buvo aptiktos keturios konservatyvios sritys, kurių vaidmuo transkripcijos procese yra labai skirtingas (Lonetto ir kiti, 1992; Gruber ir Gross, 2003; Hook-Barnard ir Hinton, 2009).

*E. coli*  $\sigma^{70}$  promotoriams būdingos kelios konservatyvios nukleotidų sekos TTGACA ir TATAAT, esančios ties –35 ir –10 nukleotidais nuo transkripto iniciacijos pradžios +1 (Gross ir kiti, 1998; Paget ir Helman, 2003). Labai stipriems *E. coli* promotoriams tarp –40 ir –60 padėčių taip pat yra būdingos A/T turtingos sekos, kitaip dar vadinamos UP (*upstream*) elementais (Estrem ir kiti, 1998; Ross ir kiti, 1998, 2001). Nustatyta, kad su UP promotoriaus sekomis sąveikauja RNRP  $\alpha$  subvienetų C-galiniai domenai (CTDs), kas pagreitina transkripcijos inicijacijos procesą (Aiyar ir kiti, 1998; Ozoline ir kiti, 2000; Hook-Barnard ir Hinton, 2007). Kai kuriuose promotoriuose, ypač tuose, kurių –35 sritis neatitinka tipinės sekos, yra svarbus TGn motyvas, prailginantis konservatyvią –10 sritį iki TGnTATAAT (Keilty ir Rosenberg, 1987; Voskuil ir kiti, 1995). Promotoriaus atpažinimas sąlygojamas  $\sigma^{70}$  veiksnio sąveika su skirtingomis promotoriaus dalimis:  $\sigma^{70}$  4.2 ir 2.4 sritys sąveikauja su promotoriaus –10 ir –35 elementais,  $\sigma^{70}$  3.0 sritis sąveikauja su prailginta –10 sritimi, tuo tarpu  $\sigma^{70}$  1.2 sąveikauja su promotoriaus sritimi esančia tarp –10 bei transkripto iniciacijos pradžios +1 (Lonetto ir kiti, 1998; Murakami ir kiti, 2002a; Paget ir Helman, 2003; Sanderson ir kiti, 2003; Haugen ir kiti 2006; Zenkin ir kiti, 2007; Haugen ir kiti, 2008). Visų šių sričių sąveikos su atitinkama promotoriaus dalimi stiprumas bei vaidmuo transkripcijos inicijacijoje skirtingų promotorių atveju yra skirtingas. Nustatyta, kad promotorių su prailginta –10 sritimi atpažinimui –35 sritis yra nebūtina, taigi nebūtinai ir RNRP  $\sigma^{70}$  4 domenas (Kumar ir kiti, 1993; Kuznedelov ir kiti, 2002; Nechaev ir Geiduschek, 2006).

Efektyviam promotoriaus atpažinimui taip pat yra itin svarbi  $\sigma^{70}$  4 domeno sąveika su RNRP  $\beta$  subvieneto lanksčiąja dalimi, kitaip dar vadinama „lanksčiu skvernu“ (angl. flexible flap). Manoma, kad šios sąveikos dėka  $\sigma^{70}$  4.2 yra tinkamai orientuojamas kitų RNRP subvienetų atžvilgiu, kas savo ruožtu leidžia  $\sigma^{70}$  4.2 domenui tuo pačiu metu sąveikauti ir su promotoriaus –10, ir su –35 sritimi (Kuznedelov ir kiti, 2002; Murakami ir kiti, 2002a/2002b; Geszvain ir kiti, 2004). Be to, transkripcijos inicijacijos reguliacijoje nuo *E. coli*  $\sigma^{70}$  promotorių yra svarbi  $\sigma^{70}$  4.2 domeno sąveika su įvairiais

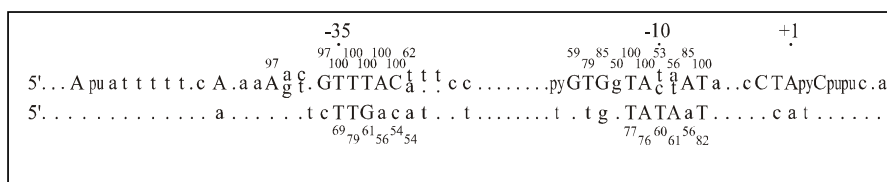
transkripcijos aktyvatoriais ir/arba RNRP  $\alpha$  subvienetu (Chen ir kiti, 2003; Dove ir kiti, 2003; Ross ir kiti, 2003; Campbell ir kiti, 2008).

Tokiu būdu, patekusi į ląstelę fago DNR tėra tik keliasdešimt promotorių turinti svetima DNR, kuriai tenka konkuruoti dėl RNRP su šimtus promotorių turinčiu ląstelės-šeimininkės genomu. Bakteriofagas T4 išsprendė šią problemą dvejopai: visų pirma, T4 pateikia ląstelės-šeimininkės RNRP savo stipriausius ankstyvuosius promotorius bei, pasitelkdamas baltymais-modifikatoriais, kurie kartu su fagine DNR patenka į ląstelę, keičia RNRP struktūrą fagui palankia linkme.

#### 1.3.1.1. Ankstyvųjų genų transkripcija

Bakteriofago T4 infekcijos metu *E. coli* ląstelėje per 20 minučių susidaro maždaug 200 fago genomo kopijų, DNR yra supakuojama ir, galiausiai, naujos faginės dalelės suardo ląstelę (Miller ir kiti, 2003a). Sėkmingam faginės dalelės vystymuisi itin svarbus yra nuoseklus skirtingų klasių faginių promotorių atpažinimas.

Pačiame pradiniam T4 infekcijos etape lemiamas vaidmuo tenka fago promotorių stiprumui, kurį apsprendžia jų nukleotidų seka bei struktūra (Sommer ir kiti, 2000; Miller ir kiti, 2003a). Siekiant nustatyti skirtumus tarp *E. coli*  $\sigma^{70}$  atpažįstamų bei faginių promotorių, buvo atlikta 39 ankstyvųjų T4 promotorių statistinė analizė (Liebig ir Rüger, 1989; Wilkens ir Rüger, 1994). Paaikškėjo, kad ankstyvieji T4 promotoriai taip pat turi *E. coli* promotoriams būdingas konservatyvias sekas –35 bei –10 srityse, tačiau jų –35 srities seka GTTACa/ttt žymiai skiriasi nuo *E. coli* promotorių –35 srities TTGACA sekos (6 pav.). Šios bakteriofago T4 ankstyvųjų promotorių sekos (Wilkens ir Rüger, 1994) yra žymiai konservatyvesnės už ląstelės-šeimininkės promotorių atitinkamas sekas (Lisser ir Margalit, 1993). Taipogi nustatyta, kad ankstyvieji fago T4 promotoriai ( $P_E$ ) yra mažiausiai du kartus stipresni už stipriausius bakterinius promotorius, tačiau –35 bei –10 sritys nėra vieninteliai stiprumą sąlygojantis veiksniai.



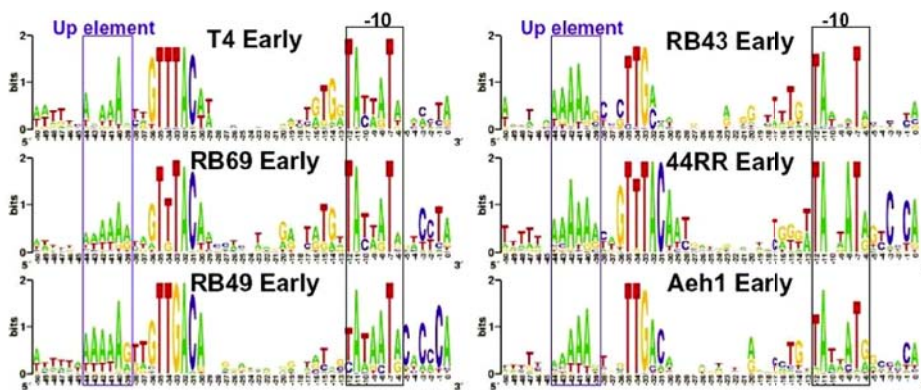
**8 pav. Bakteriofago T4 ankstyvųjų promotorių (viršuje) ir *E. coli*  $\sigma^{70}$  promotorių (apačioje) sekų palyginimas pagal Wilkens ir Rüger (1994).** Skaičiai rodo nukleotido konservatyvumą atitinkamų promotorių sekose (%), taškas atitinka vieną nukleotidą, o didžiosios raidės – labiau konservatyvius nukleotidus.

Nustačius fago T4 ankstyvųjų promotorių stiprumą bei, remiantis šia savybe, palyginus jų sekas, buvo aptiktos papildomos promotoriaus stiprumą lemiančios struktūros: tai –16 – –14 padėtyse 5' GTG 3' elementu pailgėjusi – 10 sritis, primenanti *E. coli* promotorių 5' TG 3' elementą, bei *E. coli* promotorių UP elementus primenantys –52 ir –42 padėtyse aptikti du A tandemai (iki A<sub>6</sub>), atskirti panašaus ilgio poliT seka (Wilkens ir Rüger, 1996; Sommer ir kiti, 2000). Bakteriofago T4 genome yra nustatyti 37 ankstyvieji promotoriai, turintys tipišką, stipriems fago promotoriams būdingą seką (Wilkens ir Rüger, 1994).

Tokiu būdu, dėl itin didelio informacijos kiekio promotoriaus nukleotidų sekoje, fago T4 ankstyvieji promotoriai yra bent du kartus stipresni už *E. coli*  $\sigma^{70}$  promotorius (Liebig ir Rüger, 1989). Nėgana to, T4 P<sub>E</sub> stiprumas dar beveik dvigubai padidėja fago baltymui Alt (76 kDa) modifikavus ląstelės šeimininkės RNR polimerazę (Koch ir kiti, 1995; Sommer ir kiti, 2000). ADF–riboziltransferazė Alt (*alteration*) yra fago T4 viriono struktūrinis komponentas infekcijos metu patenkantis į ląstelę kartu su fagine DNR (Black ir kiti, 1994). Šis baltymas katalizuoja ADF–ribozės pernešimą nuo NAD<sup>+</sup> ant vieno iš dviejų RNR polimerazės  $\alpha$  subvienetų Arg<sup>265</sup> liekanos (Goff, 1974; Rohrer ir kiti, 1975), kas, kaip manoma, nutraukia modifikuoto subvieneto sąveiką su promotoriaus –42 sritimi ir tokiu būdu pagreitina atviro promotoriaus komplekso susidarymą bei transkripcijos elongaciją (Sommer ir kiti, 2000). Nepaisant to, ankstyvųjų fago T4 promotorių pranašumo prieš  $\sigma^{70}$  promotorius lemiamas veiksnys yra pačių promotorių struktūra, tuo tarpu RNR polimerazės modifikacijos, kurios nėra gyvybiškai svarbios fago vystymuisi standartinėmis

laboratorinėmis sąlygomis (Goff ir Setzer, 1980), tėra tik papildomas faktorius (Sommer ir kiti, 2000).

Atlikus palyginamąją įvairių T4 giminingų bakteriofagų genomų analizę nustatyta, kad aukščiau aprašytas ankstyvosios transkripcijos reguliavimo modelis yra būdingas daugeliui T-lyginių, bet itin skiriasi kitų T4 tipo bakteriofagų atveju. Fago T4 ankstyvuosius promotorius atitinkančių sekų buvo aptikta T-lyginio *E. coli* fago RB69, pseudo T-lyginių *E. coli* fagų RB49, RB43 ir *Aeromonas salmonicida* fago 44RR2.8t, o taip pat šizo T-lyginio *Aeromonas hydrophila* fago AehI genomuose (7 pav). Visų minėtų fagų hipotetinėse P<sub>E</sub> nukleotidų sekose buvo aptikti fago T4 P<sub>E</sub> būdingi –35 ir –10 motyvai bei –42 padėty aptinkamas UP elementas. Tuo tarpu –33T nukleotidas, kuris T4 ankstyvuosiuose promotoriuose yra ypač konservatyvus bei, kaip nustatė Sommer ir bendraautoriai (2000), yra ypač svarbus promotorių atsakui į Alt vykdomą RNAP modifikavimą, aptinkamas tik RB69 bei 44RR2.8t P<sub>E</sub>. Fagų RB49, RB43 bei AehI promotorių –33 pozicijoje dažniausiai aptinkamas G nukleotidas. Įdomu tai, kad RB43 genome taip pat neaptikta fago T4 ADF–riboziltransferazę Alt koduojančio geno analogo. Prailginta –10 sritis aptinkama tik kai kurių iš 7 pav pateiktų fagų ankstyvuose promotoriuose. Visų tirtų T4 giminingų bakteriofagų ankstyvųjų promotorių –10 srityje aptikti konservatyvūs T bei A nukleotidai atitinkamai –7 ir –11 padėtyse, tuo tarpu fago T4 P<sub>E</sub> esantis –12T nėra itin konservatyvus fagų RB49 ir AehI hipotetinių promotorių sekose.



9 pav. T4 tipo bakteriofagų ankstyvųjų promotorių sekų palyginimas pagal Nolan ir kiti (2006).

Atlikus pozicinę fagų RB69, RB49, RB43, 44RR2.8t bei AehI hipotetinių ankstyvųjų promotorių analizę nustatyta, kad didžioji dalis jų P<sub>E</sub> aptinkama prieš fago T4 ankstyvųjų genų ortologus (Nolan ir kiti, 2006). Kadangi promotorių stiprumo analizė minėtuose faguose atlikta nebuvo, yra itin sunku prognozuoti kaip kiekvienas iš paminėtų pakitimų turi įtakos 7 pav. pateiktų fagų P<sub>E</sub> stiprumui.

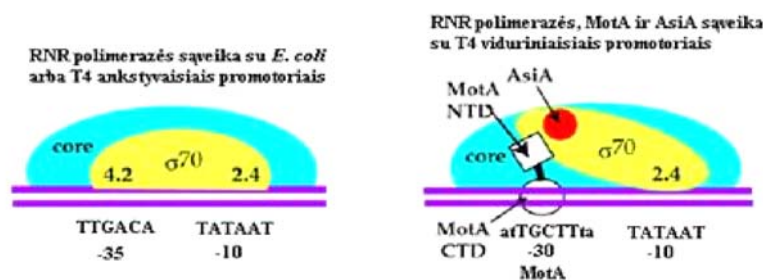
Šizo T-lyginio *Vibrio* fago KVP40 bei egzo T-lyginio *Synechococcus* fago S-PM2 genomines DNR nukleotidų sekos kompiuterinės analizės metu T4 P<sub>E</sub> būdingų promotorinių sekų neaptikta. Abiejų šių fagų atveju, T4 tipo fagų ankstyvųjų genų pozicijas atitinkančiose DNR srityse rasti tik  $\sigma^{70}$  klasės promotoriai. KVP40 bei S-PM2 genomineje DNR taip pat nėra fago T4 *alt* geno analogų. Akivaizdu, kad abiemis minėtiems fagams nėra būdingas bakteriofago T4 ankstyvosios transkripcijos reguliavimo modelis (Miller ir kiti, 2003b; Mann ir kiti, 2005).

### 1.3.1.2. Viduriniųjų genų transkripcija

Bakteriofago T4 ankstyvųjų genų transkripcija prasideda tuoj pat po infekcijos ir yra nepriklausoma nuo fago baltymų sintezės, tuo tarpu vidurinėsios transkripcijos etapui reikalingi fago koduojami baltymai. Visų pirma, dar viena fago koduojama ADF-riboziltransferazė ModA (*modification*) yra reikalinga sėkmingam transkripcijos komplekso perėjimui nuo fago ankstyvųjų, prie viduriniųjų promotorių grupės. 23,3 kDa baltymas ModA (ankstyvojo geno *modA* produktas) katalizuoja antrojo RNRP  $\alpha$  subvieneto ADF-ribozilimą Arg<sup>265</sup> padėtyje (Skorko ir kiti, 1977; Wilkens ir Rürger, 1994; Tiemann ir kiti, 1999). Tokiu būdu, iš pradžių Alt, o po to ir ModA baltymų modifikuotos RNRP sąveika su ankstyvųjų promotorių UP elementais yra nutraukiama ir, tuo pačiu, yra sutrikdoma ankstyvųjų genų transkripcija (Goldfarb ir Palm, 1981; Depping ir kiti, 2005). Manoma, kad ModA modifikuota RNR polimerazė tampa lengviau prieinama vidurinėsios transkripcijos koaktyvatoriui AsiA bei aktyvatoriui MotA (Depping ir kiti, 2005).



Bakteriofago T4 vidurinėsios transkripcijos koaktyvatorius AsiA priklauso gausiai ir itin didele įvairove pasižyminčiai baltymų grupei bendru pavadinimu „anti- $\sigma$  faktoriai“, kurių pagrindinė paskirtis – transkripcijos nuo skirtingų promotorių klasių neigiama reguliacija (Hughes ir Mathee, 1998; Helmann, 1999). Didžioji dalis anti- $\sigma$  faktorių trikdo tam tikros klasės promotorių atpažinimą, tiesiogiai sąveikaudami su giminingu laisvu  $\sigma$  veiksnio ir neleidami jam jungtis su RNRP šerdine dalele (Campbell ir kiti, 2008). Fago T4 AsiA (Anti-sigma 70 arba Audrey Stevens inhibitor) buvo pirmasis identifikuotas anti- $\sigma^{70}$  veiksnys (Stevens, 1976; Orsini ir kiti, 1993; Severinova ir kiti, 1998). Daugelis anti- $\sigma$  baltymų sąveikauja su daugiau nei dvejais  $\sigma$  veiksnio struktūriniais domenais, tuo tarpu T4 AsiA sinchroniškai sąveikauja su  $\sigma^{70}$  4-tuoju domenu bei RNRP  $\beta$  subdalelės lanksčiuoju skvernu, kas padeda stabilizuoti naujai susidariusį  $E\sigma^{70}$ -AsiA kompleksą (Severinova ir kiti, 1998; Yuan ir kiti, 2009). Tokio komplekso susiformavimo paskirtis yra dvejopa. Visų pirma, panaikinus  $\sigma^{70}$  4-to domeno bei RNRP  $\beta$  subdalelės lankstaus skverno sąveiką (8 pav.) bei stabilizavus alternatyvią  $\sigma^{70}$  4-to domeno konformaciją (kuriai būdingas deformuotas su DNR sąveikaujantis paviršius), transkripcija nuo -10/-35 klasės promotorių yra trikdoma (Simeonov, 2003; Gregory ir kiti, 2004; Lambert ir kiti, 2004).



**10 pav. MotA ir AsiA sąveikos su RNRP  $\sigma^{70}$  schema (Hinton ir kiti, 2005).** Nemodifikuotos RNR polimerazės sąveika su *E. coli* ar T4 ankstyvoju promotoriumi (kairėje); ir RNR polimerazės kartu su MotA ir AsiA sąveika su T4 viduriniu juoju promotoriumi (dešinėje). RNR polimerazės  $\alpha_2$  ir  $\omega$  subvienetai neilustruojami.

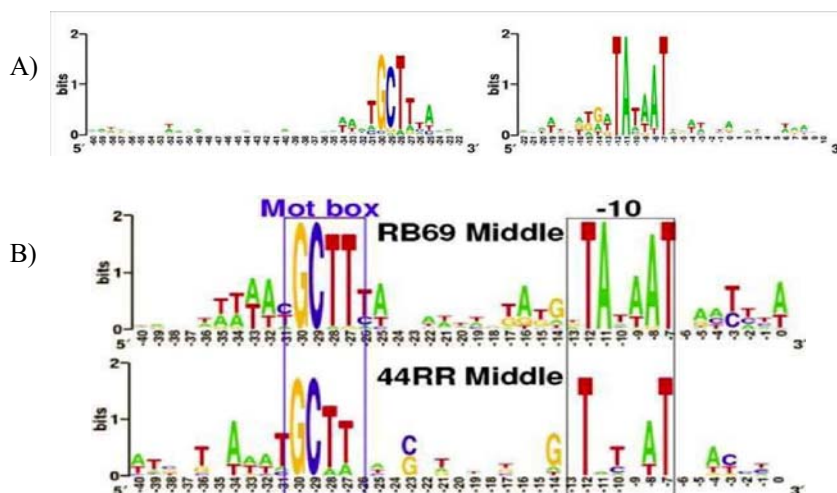
Be to, stabilizavus alternatyvią  $\sigma^{70}$  4-to domeno konformaciją, atidengiamos tos aminorūgštys, kurios yra reikalingos fago T4 vidurinėsios transkripcijos aktyvatoriaus MotA (*M*odifier of *t*ranscription) prijungimui į  $\sigma^{70}$ -AsiA kompleksą (Pande ir kiti, 2002; Gregory ir kiti, 2005; Hinton ir kiti, 2005).

Bakteriofago T4 vidurinėsios transkripcijos aktyvatorius MotA (Mattson ir kiti, 1974, 1978) yra sudarytas iš dviejų 10 kDa domenų, atskirtų penkiolikos aminorūgščių ilgio „lanksčia“ jungtimi (Finnin ir kiti, 1993, 1994, 1997). Transkripciją aktyvinantis N-galinis domenas (NTD) sąveikauja su  $\sigma^{70}$  4 domeno 13 C-galinių aminorūgščių (Schmidt ir kiti, 1992; Gerber ir Hinton, 1996; Pande ir kiti, 2002; Bonocora ir kiti, 2008). Tuo tarpu itin retos „dvigubo sparno“ struktūros (trys  $\alpha$ -spirales su įterptomis šešiomis  $\beta$ -juostomis) C-galinis DNR atpažinimo domenas (CTD) sąveikauja su viduriniojo promotoriaus MotA seka bei padidina  $E\sigma$ /AsiA komplekso giminingumą fago T4  $P_M$  (Finnin ir kiti, 1994; Ouhammouch ir kiti, 1995; Adelman ir kiti, 1998; Pande ir kiti, 2002). Nustatyta, kad tiek MotA, tiek ir AsiA yra būtini transkripcijai nuo viduriniųjų bakteriofago T4 promotorių (Hinton ir kiti, 2005; Stoškiene ir kiti, 2007).

Kuo ypatingi fago T4 vidurinieji promotoriai? Visų pirma, tai yra pati skaitlingiausia bei didžiausia sekų įvairovė pasižyminti promotorių klase. Iki šiol identifikuota net penkiasdešimt aštuoni bakteriofago T4  $P_M$ , kurių didžiosios dalies aktyvumas yra patvirtintas eksperimentiškai. Viduriniųjų promotorių nukleotidų sekų analizės metu nustatyta, kad šie promotoriai turi *E. coli*  $\sigma^{70}$  bei T4  $P_E$  klasei būdingą konservatyvią –10 srities seką TATAAT, bet neturi  $\sigma^{70}$  ir ankstyviems promotoriams charakteringos –35 srities. Vietoje jos viduriniųjų promotorių sekoje aptikta 10 bp ilgio ((a/t)(a/t)(a/t)TGCTTtA) sritis –30, kurią nuo –10 srities skiria 12( $\pm$ 1) bp ilgio skiriančioji seka. Lyginant fago T4  $P_E$  (7 pav.) ir  $P_M$  (9 pav. A) tipines sekas matyti, kad abiejų klasių promotoriams būdinga itin konservatyvi bei neretai prailginta –10 sritis, o –12, –11, –8, ir –7 padėtyse esančių nukleotidų sudėtis beveik sutampa. Tuo tarpu nuo –34 iki –25 padėčių išsidėsčiusi tik viduriniųjų promotorių

klasei būdinga MotA prijungimo sritis –30, kurios centrinis motyvas TGCTT, nėra itin konservatyvi P<sub>M</sub> sekos dalis. Net trisdešimties iš penkiasdešimt aštuonių identifikuotų fago T4 promotorių –30 srities nukleotidų seka daugiau ar mažiau skiriasi nuo tipinės T4 P<sub>M</sub> sekos (Brody ir kiti, 1983; Guild ir kiti, 1988; Nivinskas ir kiti, 1989; Stitt ir Hinton, 1994; Marshall ir kiti, 1999; Truncaite ir kiti, 2002, 2003; Stoškiene ir kiti, 2007).

Kaip ir ankstyvųjų promotorių atveju, bakteriofago T4 P<sub>M</sub> atitinkančios nukleotidų sekos buvo aptiktos daugelio T-lyginių fagų DNR (Kolesinskienė ir kiti, 2003; Truncaitė ir kiti, 2004). Tuo tarpu kitiems T4 giminingų bakteriofagų pogrupiams priskirtų fagų genomuose šios klasės promotoriai yra aptinkami itin retai. Atlikus T-lyginio RB69, pseudo T-lyginių RB49, RB43 bei 44RR2.8t, o taip pat šizo T-lyginių AehI ir KVP40 bei egzo T-lyginio S-PM2 bakteriofagų genominės DNR kompiuterinę analizę, vidurinieji promotoriai, atitinkantys T4 P<sub>M</sub>, buvo identifikuoti tik fagų RB69 bei 44RR2.8t genomuose (9 pav. B) (Miller ir kiti, 2003b; Mann ir kiti, 2005; Nolan ir kiti, 2006). Kaip jau buvo minėta, fagas RB69 nėra tipinis T-lyginių fagų pogrupio atstovas. Nepaisant to, šio bakteriofago genome buvo aptikti T4 viduriniųjų genų transkripcijoje dalyvaujančių baltymų AsiA bei MotA genų ortologai.



11 pav. Bakteriofagų T4 (A) bei RB69 ir 44RR2.8t (B) viduriniųjų promotorių tipinės sekos palyginimas pagal (A) Stoškienę ir kiti (2007) ir (B) Nolan ir kiti (2006).

Be to, viduriniųjų promotorių tipinė seka, gauta palyginus hipotetinių RB69 P<sub>M</sub> sekas, yra akivaizdžiai itin panaši į fago T4 P<sub>M</sub> tipinę seką. Tuo tarpu *Aeromonas* fago 44RR2.8t hipotetinių viduriniųjų promotorių tipinės sekos -10 sritis ženkliai skiriasi ne tik nuo  $\sigma^{70}$  klasės promotorių ar T4 bei RB69 P<sub>M</sub>, bet ir nuo paties 44RR2.8t ankstyvųjų promotorių tipinės sekos. Įdomu tai, kad fago T4 atveju, būtent su šia P<sub>M</sub> sritimi sąveikauja ne fago koduojamas baltymas, o ląstelės šeimininkės RNR $\beta$ <sup>70</sup>. Reikia paminėti, kad 44RR2.8t genome identifikavus tikrai devynis hipotetinius vidurinius promotorius, buvo nuspręsta, jog T4 vidurinėsios transkripcijos modelis šiam fagui veikiausiai nėra būdingas, tačiau, aptikus bakteriofago T4 geno *motA* ortologą, tokia hipotezė buvo atmesta. Be to buvo nustatyta, kad 44RR2.8t DNR yra ir vidurinėsios transkripcijos aktyvatorių AsiA koduojantis genas. Fago T4 AsiA homologą koduojantis genas buvo aptiktas ir faguose AehI bei KVP40, nors P<sub>M</sub> atitinkančių reguliacinių sekų jų genomuose nėra. Manoma, kad šių fagų atveju, AsiA dalyvauja transkripcijos nuo  $\sigma^{70}$  promotorių slopinime arba atlieka kažkokią kitą funkciją (Miller ir kiti, 2003b; Pineda ir kiti, 2004; Nolan ir kiti, 2006).

Bakteriofagų RB49, RB43 bei S-PM2 atveju, nei viduriniųjų promotorių, nei AsiA ar MotA homologų aptikta nebuvo (Mann ir kiti, 2005; Nolan ir kiti, 2006).

### 1.3.1.3. Vėlyvųjų genų transkripcija

Vėlyvosios bakteriofago T4 transkripcijos etapas yra unikalus transkripcijos proceso reguliavimo pavyzdys daugeliu aspektų:

- vienintelis konservatyvus vėlyvųjų fago promotorių sekos elementas – penkių bp atstumu nuo transkripto pradžios išsidėstęs oktameris TATAAATA;
- vėlyvųjų transkriptų sintezei reikalingas ne RNR polimerazės holofermentas, o šerdinė dalelė bei mažiausiai penki fago koduojami baltymai, kurių du (gp33 ir gp55) pakeičia *E. coli*  $\sigma^{70}$ ;

- vėlyvųjų genų transkripcija vyksta tik aktyvios DNR replikacijos metu, o dėl kokių nors priežasčių sustojus replikacijai, vėlyvųjų genų transkripcija taip pat nutrūksta (Williams ir kiti, 1994).

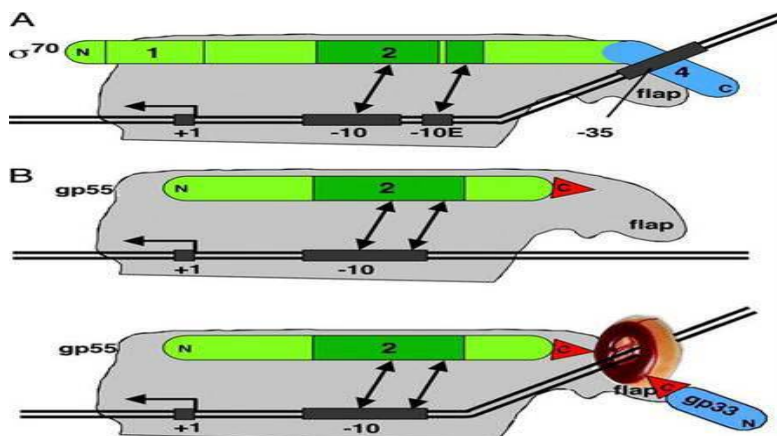
Vėlyvieji fago T4 genai, koduojantys viriono struktūrinius komponentus, DNR pakavimo į kapsidę fermentus bei ląstelės lizės fermentus, sudaro apie 40% fago genomo ir yra nurašomi nuo abiejų fago DNR grandinių. Apie penkiasdešimt vėlyvųjų fago promotorių (tiesa, ne visi jie patvirtinti eksperimentiškai) yra aktyvuojami poreplikacinio periodo metu (Miller ir kiti, 2003a; Nolan ir kiti, 2006). Dalis vėlyvųjų genų gali būti nurašomi ir nuo ankstyvųjų bei viduriniųjų promotorių (Macdonald ir kiti, 1984; McPheeters ir kiti, 1986; Barth ir kiti, 1988), tačiau ikireplikaciniu periodu, RNR antrinės struktūros dėka, jų produktų sintezė yra trikdoma. Kai kurių vėlyvojo periodo genų transkripcijos iniciacijos sritims yra būdingos trumpos pasikartojančios A arba T sekos, kurios, kaip manoma, sukelia RNR polimerazės „slydimo“ efektą, dėl ko gali būti sintetinami ilgesnį 5' galą turintys transkriptai. Tuo tarpu transkripcijos *in vitro* tyrimų metu nustatyta, kad vėlyvųjų transkriptų pradžios taškas yra tiksliai už 5 nukleotidų nuo P<sub>L</sub> – 10 srities (Kassavetis ir kiti, 1983; Williams ir kiti, 1994). Fago T4 vėlyvųjų promotorių – 10 sritis, išsidėsčiusi – 13 – – 6 padėtyse, yra vienintelis šios klasės promotorių aktyvumui reikalingas konservatyvus sekos motyvas. Tai, kad vėlyviesiems promotoriams pakanka vien tik –10 srityje išsidėsčiusios oktamerinės sekos, buvo įrodyta eksperimentiškai. Nukleotidų seką esančią prieš promotoriaus – 10 sritį pakeitus bet koku kitu DNR fragmentu, iRNR sintezė *in vivo* ir promotorių stiprumas *in vitro* beveik nepasikeitė (Elliot ir Geiduschek, 1984). Tipinė vėlyvųjų fago T4 promotorių seka yra TATAAATA (13 pav.), tačiau maždaug ketvirtadalis P<sub>L</sub> – 13 padėtyje turi A nukleotidą (Miller ir kiti, 2003a; Nolan ir kiti, 2006). Taigi, vėlyvieji promotoriai neturi fago ankstyviesiems bei *E. coli* promotoriams būdingos –35 srities, viduriniams fago promotoriams būdingos –30 srities, tuo tarpu jų –10 srities seka itin skiriasi nuo atitinkamos *E. coli* ar fago P<sub>E</sub> ir P<sub>M</sub> srities sekos (Williams ir kiti, 1994; Brody ir kiti, 1995). Su tokia –10 srities nukleotidų seka *E. coli* σ<sup>70</sup> 2 domenas veiksmingai

sąveikauti negali, todėl fago genome koduojami du baltymai, keičiantys RNRP  $\sigma^{70}$ .

Transkripciją nuo fago T4 vėlyvųjų promotorių inicijuoja modifikuota (ADF-ribozilintas) *E. coli* RNR polimerazės šerdinė dalelė su kuria srityse, reikalingose RNRP sąveikai su  $\sigma^{70}$  4 ir 2 domenais atitinkamai, sąveikauja du fago koduojami baltymai: gp33 bei gp55 (Wong ir kiti, 2003; Nechaev ir kiti, 2004). Vėlyvųjų promotorių -10 sritį atpažįstantis fago T4 gp55, kurio aminorūgščių sekos sritis ~42–122 yra šiek tiek homologiška  $\sigma^{70}$  2 domeniui, yra priskiriamas  $\sigma$  baltymų grupei (Gribskov ir Burgess, 1986). Sąveikaudamas su RNR polimerazės šerdinės dalelės  $\beta'$   $\sigma^{gp55}$  formuoja bazinį gp55-RNRP holofermentą (Herendeen ir kiti, 1989). Sistemoje *in vitro*, daugiausia dėl RNRP šerdinės dalies nespecifinės sąveikos su DNR, gp55-RNRP kompleksas pakanka bazinei transkripcijai nuo vėlyvųjų fago T4 promotorių (Kassavetis ir Geiduschek, 1984; Nechaev ir Geiduschek, 2006). Tuo tarpu efektyviai vėlyvųjų transkriptų sintezei yra būtinas koaktyvatorius gp33 (Herendeen ir kiti, 1990). Absoliučiai  $\sigma$  klasės baltymams nehomologiškas 112-kos aminorūgščių gp33 nesąveikauja su DNR, tačiau, jungdamasis prie RNRP  $\beta$  lankstaus skverno ir blokuodamas RNRP nespecifinę sąveiką su DNR, funkcionuoja kaip  $\sigma^{70}$  4-tas domenas. Kaip jau buvo minėta, fago T4 vėlyvųjų genų transkripcija vyksta tik aktyvios DNR replikacijos metu. Galbūt todėl ir gp33 funkcija yra dvejopa. Normaliomis sąlygomis (vykstant DNR replikacijai) šis baltymas funkcionuoja kaip transkripcijos koaktyvatorius, tačiau replikacijai sustojus (t.y. nesant gp45), gp33 trikdo gp55-RNRP vykdomą bazinę transkripciją (Nechaev ir kiti, 2004; Nechaev ir Geiduschek, 2006; Nechaev ir Geiduschek, 2008).

Fago T4 gp45 yra DNR polimerazės procesyvumo veiksnys, kitaip – žiedas (angl. sliding clamp), kurį ant DNR grandinės užneria baltymų gp44/62 kompleksas, prisijungdamas mažiausiai keturias ATF molekules (Sanders ir kiti, 1995; Pietroni and von Hippel, 2008). Užnertas ant DNR grandinės gp45 slysta išilgai DNR prie RNR-polimerazės/gp33/55 komplekso (Herendeen ir kiti, 1992; Tinker ir kiti, 1994) ir, tiesiogiai bei specifiskai sąveikaudamas tiek

su gp33, tiek su gp55 C-galiniais domenais (10 pav.), stimuliuoja atviro promotoriaus komplekso susidarymą. (Nechaev ir kiti; 2004; Nechaev ir Geiduschek, 2008).

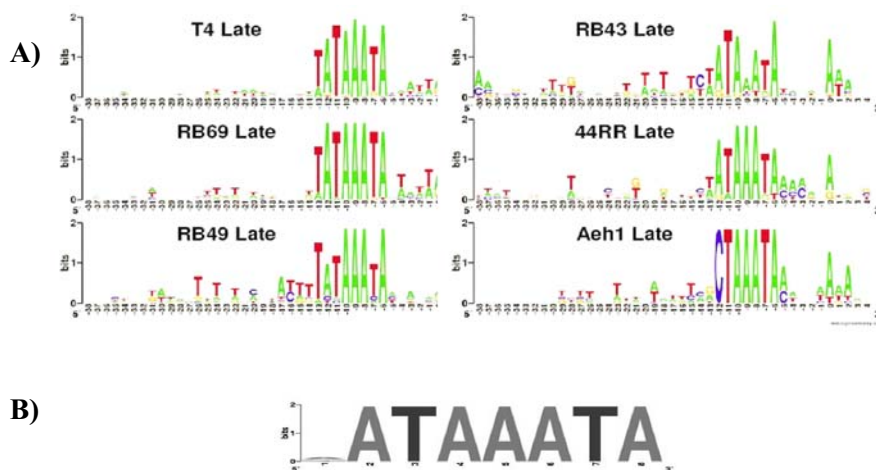


**12 pav. Bakteriofago T4 vėlyvosios transkripcijos aktyvinimo modelis pagal Nechaev ir kiti (2004).** Viršuje pavaizduota RNP sąveika su  $\sigma^{70}$  klasės promotoriumi (A). B dalyje paeilui pavaizduotas bazinės (viduryje) bei aktyvios (apačioje) T4 vėlyvosios transkripcijos modelis. Žalia spalva nuspalvintas gp55, mėlyna – gp33, ruda – gp45, pilka – RNP šerdinė dalelė. Raudona spalva nuspalvinti C-galiniai gp55 ir gp33 domenai.

Sustojus DNR replikacijai, Okazaki fragmentų sintezės metu susidarę DNR trūkiai yra užtaisomi. Panaikinus gp45 ir gp44/62 sąveikos su DNR taikinius, vėlyvoji fago T4 transkripcija taip pat nutrūksta (Brody ir kiti, 1995).

Įdomu tai, kad fago T4 vėlyvosios transkripcijos modelis, kaip manoma, yra būdingas beveik visiems T4 tipo bakteriofagams (Nechaev ir Geiduschek, 2008). Nagrinėjant septynių ankstesniuose skyriuose minėtų T4 tipo bakteriofagų (RB69, RB49, RB43, 44RR2.8t, AehI, KVP40 bei S-PM2) genomine DNR nustatyta, kad fago T4  $P_L$ ,  $g_{55}$ ,  $g_{33}$  ir  $g_{45}$  atitinkančios sekos yra aptinkamos visų šių fagų genomuose (Miller ir kiti, 2003b; Mann ir kiti, 2005; Nolan ir kiti, 2006). Palyginus 11 paveiksle pateiktas vėlyvųjų promotorių tipines sekas matyti, kad bakteriofagų RB69, RB49, RB43 ir 44RR2.8t vėlyvųjų promotorių tipinė seka yra analogiška fago T4  $P_L$ , nors

pavienių –10 srities pozicijų (pvz. –13, –12 ar –9) konservatyvumas skirtinguose faguose yra skirtingas.



13 pav. Bakteriofagų T4, RB69, RB49, RB43, 44RR2.8t ir Aeh1 (A) bei S-PM2 (B) vėlyvųjų promotorių tipinės sekos palyginimas pagal Nolan ir kiti (2006), Mann ir kiti (2005) (B).

Bakteriofagų S-PM2 bei Aeh1 vėlyvųjų promotorių konservatyvi –10 sritis yra 1 bp trumpesnė – ją formuoja –12 – –6 padėtyse išsidėsčiusi 7 bp nukleotidų seka. Be to, vėlyvųjų Aeh1 fago promotorių –12 padėtyje esantis absoliučiai konservatyvus nukleotidas C yra itin retas kitų T4 tipo bakteriofagų  $P_L$  sekose, išskyrus fagą RB49 (Mann ir kiti, 2005; Nolan ir kiti, 2006). Pasak Nechaev ir Geiduschek (2008), T4 tipo bakteriofagų vėlyvųjų promotorių –10 srities įvairovė gali būti siejama su šių fagų gp55 ir gp33 aminorūgščių sekos įvairove.

Genų raiškos valdymas laike daugiausia vykdomas transkripcijos metu. Skirtingų klasių faginių promotorių išsidėstymas prieš tam tikrus genus gali paaiškinti jų raiškos pobūdį bei jų koduojamų produktų funkcionavimą *in vivo*. Taigi, transkripcijos proceso reguliacijos tyrimas yra svarbus ne tik siekiant išaiškinti genomo struktūrinę organizaciją, bet ir genų raiškos reguliaciją faginės infekcijos metu.



### 1.3.2. Potranskripcinė genų raiškos reguliacija

Kaip jau buvo minėta, pradinis iRNR kiekį apsprendžiantis etapas, bakteriofagui vystantis ląstelėje, yra transkripcijos inicijacijos dažnis, kuriam didelės įtakos turi promotorių stiprumas. Tačiau kiek konkretaus baltymo molekulių bus sintetinama bei kokių infekcinio periodo metu, nulemia procesai vykstantys po transkripcijos, kurių metu lemiamas vaidmuo tenka pačios iRNR struktūrai. Baltymų sintezę įtakoja tokie procesai kaip baltymų represorių ir iRNR sąveika, tarpusavyje susijusių genų transliacija, specifinės endonukleazės ir RNR degradacija, iRNR sukirpimas, skaitymo rėmelio poslinkio efektas, kelių genų transliacija paeiliui bei transliacija susieta su lyderinio peptido sinteze (McCarthy ir Gualerzi, 1990).

#### 1.3.2.1. iRNR degradacija

Visos iRNR gyvuoja tik tam tikrą laiką ir anksčiau, ar vėliau yra suardomos. Pačios iRNR struktūra apsprendžia jos stabilumą, kuris yra išreiškiamas gyvavimo pusperiodžiu. Cheminis pusperiodis nusako iRNR degradacijos greitį, o funkcinis pusperiodis – baltymų sintezės nuo konkrečios iRNR sumažėjimą (Belasco ir Brawerman, 1993). Bakteriofagų iRNR pašižymi itin greitai apykaita, kas suteikia fagui galimybę efektyviai keisti genų raiškos pobūdį skirtingų vystymosi stadijų metu. Faginių iRNR degradacijoje dalyvauja daugiausiai bakterinės ląstelės baltymai bei nukleazės.

Įvairių genetinių bei biocheminių tyrimų metu nustatyta, kad *E. coli* funkcionuoja apie dvidešimt skirtingų RNazių (Deutscher, 1993; Zuo ir Deutscher, 2001; Condon ir Putzer, 2002; Otsuka ir Yonesaki, 2005). Bakteriofago T4 iRNR degradacijoje dalyvauja keturios *E. coli* endoribonukleazės. Itin svarbi fago vystymosi periodiškumui yra RNazė E (Mudd ir kiti, 1990). Ši RNazė dalyvauja *g32*, *a-gt* bei *soc* transkriptų degradacijoje (Mudd ir kiti, 1988, Otsuka ir kiti, 2003). ds DNR specifinė *E. coli* RNazė III skaldo kelias T4 iRNR bei dalyvauja fago T4 tRNR brendimo procese (Schmidt ir Apirion, 1983; Barth ir kiti, 1988). Tuo tarpu RNazė LS dalyvauja T4 RNR metabolizme kontroliuojama faginio baltymo Dmd, kurio

dėka degradacijai nuosekliai laike yra pateikiamos tam tikros iRNR (Otsuka ir kiti, 2003, Ueno ir Yonesaki, 2001; Kanesaki ir kiti, 2005). Bakteriofago T4 transkriptus skaldo ir RNazė G, bet tik po to, kai juos paveikia paties fago koduojama endoribonukleazė RegB (Zajančauskaite ir kiti, 2008).

Ištyrus penkių T-lyginių fagų (M1, T2, K3, Ac3, Ox2) geno 32 transkripto metabolizmą nustatyta, kad *E. coli* RNazė E skelia šias iRNR tose pačiose vietose kaip ir fago T4 g32 iRNR, tačiau ribonukleazės atpažinimo sekos gali būti nežymiai pakitę (Loyaza ir kiti, 1991). Tuo tarpu pseudo T-lyginio fago RB49 ar šizo T-lyginio KVP40 geno 32 transkripto ši RNazė neskelia (Desplats ir kiti, 2002; Miller ir kiti, 2003b).

Bakteriofago T4 genome taip pat yra koduojamos dvi RNazės – ribonukleazė H ir ribonukleazė RegB. Replikacijoje dalyvaujanti ribonukleazė H atskelia pentamerinius RNR pradmenis iš RNR:DNR hibridų, susidarančių fago DNR replikacijos metu (Hollingsworth ir Nossal, 1991). Tuo tarpu potranskripcinėje genų raiškos reguliacijoje dalyvauja fago T4 RNazė RegB, kuri selektyviai degraduoja ankstyvas T4 iRNR ir slopina jų translacią. RegB yra sekai specifinė endoribonukleazė, kuri hidrolizuoja ankstyvųjų transkriptų tarpgeninių (SD sekas) ir vidugeninių sričių GGAG motyvą, o kai kuriais atvejais ir GGAU motyvą (Uzan ir kiti, 1988; Ruckman ir kiti, 1989; Sanson ir kiti, 2000; Truncaite ir kiti, 2006; Zajančauskaite ir kiti, 2008). Bakteriofago T4 RegB nukleazė beveik neskaldo viduriniųjų bei vėlyvųjų transkriptų, o šio baltymo pirminė struktūra neturi homologų tarp kitų RN-azių (Sanson ir kiti, 2000; Saıda ir kiti, 2003).

Nustačius 35 T4 giminingų fagų *regB* geno seką paaiškėjo, kad RegB pasižymi itin didele homologija (>98%) T-lyginių fagų tarpe, išskyrus fagus RB69 ir Tu1a (77% homologija fago T4 RegB). Tuo tarpu pseudo T-lyginio fago RB49 RegB homologija atitinkamam fago T4 baltymui tėra 42%. Fagų T4, RB69, Tu1a ir RB49 geno *regB* autogeninė reguliacija taip pat šiek tiek skiriasi. Be to, fago RB49 endoribonukleazė RegB pasižymi siauresniu specifiskumu taikinį GGAG supančioms sekoms (Piešiniene ir kiti, 2004).

### 1.3.2.2. Genų raiškos reguliacija translacijos lygyje

Faginių genų raiška efektyviai reguliuojama ir translacijos metu. Kadangi fago baltymų sintezei daugiausia naudojamas ląstelės translacijos aparatas, esminiai genų translacijos mechanizmai yra bendri tiek ląstelės šeiminkės, tiek ir bakteriofago baltymų sintezei. Svarbus vaidmuo translacijos reguliacijoje vėlgi tenka iRNR pirminei, antrinei, o kartais ir sudėtingesnėms struktūroms, kurios teikia signalus ribosomoms bei kitiems su iRNR sąveikaujantiems baltymams. Įvairiais tyrimais įrodyta, kad translacijos efektyvumas daugiausia nulemiamas iniciacijos stadijoje (Gualerzi ir Pon, 1990; McCarthy ir Brimacombe, 1994). Pagrindiniai translacijos iniciaciją įtakojantys faginių iRNR sekos elementai yra : iniciacijos kodonas, Šaino ir Dalgarno (SD) seka, atstumas tarp SD sekos ir iniciacijos kodono bei šias sritis supantys nukleotidai, antrasis skaitymo rėmelio kodonas, o taip pat antrinės iRNR struktūros (Miller ir kiti, 1994, 2003a; Nivinskas ir kiti, 1993, 1999).

Translacijos iniciacijos kodonai pagal efektyvumą gali būti išdėstyti tokia tvarka: AUG>GUG>UUG>AUU (Ringquist ir kiti, 1992). Bakteriofago T4 atveju dažniausias iniciacijos kodonas yra AUG. Apie 3% fago T4 ASR iniciacijos kodonas yra GUG, o AUU tėra geno 26 koduojamo mažojo peptido sintezės iniciacinis kodonas (Nivinskas ir kiti, 1992a). Panašus translacijos iniciacijos kodonų dažnio santykis yra nustatytas ir kitų T4 giminingų fagų atveju, tačiau pvz., egzo T-lyginio fago S-PM2 genome, net 8% ASR iniciacijos kodonas yra UUG (Mann ir kiti, 2005). Inicijacijai svarbus ir antrasis translacijos iniciacijos kodonas, kuris dažniausiai būna AAA arba GCU. Nustatyta, kad antrasis iniciacijos kodonas gali turėti įtakos iniciacijos greičiui, ypač tais atvejais, kai iniciacijos kodonas yra GUG arba UUG (Ringquist ir kiti, 1993).

Kita svarbi seka translacijos iniciacijos srityje yra SD seka, turinti 3–9 nukleotidų ilgio fragmento 5'–UAAGGAGGUGAUC–3' dalį (Shine ir Dalgarno, 1974). Dažniausiai tai būna 4–6 nukleotidai iš AGGAGG sekos (Stormo, 1986). Ši seka yra komplementari 16S rRNR 3' galinei sekai, todėl

sąveika tarp jų yra svarbi tiek tikslumui, tiek efektyvumui. Atstumas tarp SD sekos ir iniciacijos kodono gali būti nuo 5 iki 13 nukleotidų. *E. coli* atveju dažniausiai būna 8 nukleotidai, o fago T4 – 6 nukleotidai (Miller ir kiti, 1994).

Transliacijos efektyvumui dažniausiai yra palankios tokios iniciacijos sritys, kurios nesudaro antrinių iRNR struktūrų, nes pastarosios gali apimti SD arba iniciacijos kodoną ir taip blokuoti ribosomų priėjimą prie jų (Ringquist ir kiti, 1992; de Smit ir van Duin, 1994). Fago T4 vystymosi metu antrinės iRNR struktūros gali inhibuoti baltymų sintezę tuo atveju, kai vėlyvieji genai yra nurašomi kartu su ankstyvaisiais į policistroninius transkriptus. Fago vėlyvieji genai *e*, *soc*, *49* ir *I-TevI* gali būti nurašomi kartu su ankstyvaisiais, bet ankstyvuojų periodu jie nėra transliuojami dėl prieš juos susidarančių antrinių struktūrų. Šių genų produktų sintezė vyksta tik nuo vėlyvųjų transkriptų, kurie prasideda nuo prieš pat juos esančių vėlyvųjų promotorių, už kurių antrinės struktūros jau nebesusidaro (Miller ir kiti, 1994, 2003a).

Bakteriofage T4 yra aptikti ir tokie gana reti atvejai, kai antrinės iRNR struktūros teigiamai veikia transliacijos iniciaciją: prieš genus 38 (Gold, 1988; Tuerk ir kiti, 1988) ir 25 (Nivinskas ir kiti, 1993, 1999; Malys ir Nivinskas, 2009) susidarančios antrinės iRNR struktūros priartina SD seką prie iniciacijos kodono optimaliu atstumu

Transliacijos lygis taip pat yra kontroliuojamas ir terminacijos etape. Efektyvi terminacija yra būdinga gausiai transliuojamiems genams. Šių genų terminacijos sekų analizė rodo, kad terminacijos metu atpažįstami ne tik beprasmiškai kodonai UAA, UGA ir UAG, bet ir už jų esantis nukleotidas, kuris dažniausiai yra U (Brown ir kiti, 1990). Stipriais terminacijos kodonais yra laikomi UAAU ir UAAG, silpnais – UGAC ir UAGC ketvertai (Pole ir kiti, 1995).

Transliacijos terminacijai taip pat įtakos turi iRNR sąveika su transliaciją represuojančiais baltymais pvz., fago T4 transliacijos slopiklis RegA konkuruoja su ribosomomis jungiantis prie kai kurių iRNR transliacijos iniciacijos vietų ir taip trikdo jų transliaciją. Tokiu pat būdu jis dalyvauja ir autogeninėje reguliacijoje (Brown ir kiti, 1997). RegA atpažinimo taikiniai

iRNR sekoje yra įvairūs, tačiau visiems jiems yra būdingas A–U turtingas translacijos pradžios kodonas (Webster ir Spicer, 1990; Szewczak ir kiti, 1991). Ištyrus įvairius T-lyginio pogrupio fagus, nustatyta, kad visais atvejais *regA* genas išlieka labai konservatyvus (Miller ir Jozwik, 1990), išskyrus RB69, kurio RegA baltymas 22% skiriasi nuo T4 RegA (Jozwik ir Miller, 1994). Fago T4 *regA* geno ortologai aptikti ir pseudo T-lyginio RB49, šizo T-lyginio KVP40 bei egzo T-lyginio S-PM2 fagų genomuose (Desplats ir kiti, 2002; Miller ir kiti, 2003b; Mann ir kiti, 2005).

Iš literatūros apžvalgoje pateiktų duomenų matyti, kad T4 giminingų bakteriofagų įvairovė gamtoje yra itin didelė. Todėl nuostabą kelia tas faktas, kad klasifikuotų fagų tarpe atotrūkis tarp skirtingų fagų pogrupių yra toks didelis, o tarpe įvairiose vietovėse išskirtų fagų dominuoja T-lyginiai bakteriofagai. Tokia padėtis itin apsunkina T4 giminingų fagų tyrimą, todėl tarpinių filogenetinių grupių paieška ir tyrimai, kurie ir buvo aprašyti šioje disertacijoje, padėtų geriau suprasti T4 giminingų fagų genomų struktūros bei reguliacijos įvairovę bei prisitaikymo prie įvairiausių gamtinių sąlygų mechanizmus.

Atlikus *E. coli* infekuojančių T4 giminingų bakteriofagų paiešką užteršto vandens šaltiniuose Lietuvoje, buvo surinkta >100 įvairių fagų kolekcija. Elektroninės mikroskopijos analizės būdu buvo nustatyta, kad visi šios kolekcijos fagai yra morfologiškai neatskiriami nuo fago T4, todėl buvo priskirti *Myoviridae* virusų šeimos A2 morfotipui (Klausa ir kiti, 2003). Atlikti pradiniai šių fagų biocheminiai tyrimai parodė, kad keletas jų priskirtini skirtingiems T4 giminingų bakteriofagų pogrupiams. Daugelio šios kolekcijos fagų atveju taip pat buvo atlikta fago T4 geno *regB* paieška. Minėto tyrimo metu buvo nustatyta, kad bakteriofagų VR7 bei VR20 RegB aminorūgščių seka itin skiriasi, lyginant su atitinkamu fago T4 baltymu (60% identiškų

aminorūgščių), o ištyrus VR7 RegB autoreguliacijos ypatumus nustatyta, kad šio baltymo autoreguliacijos pobūdis šiek tiek skiriasi nuo T4 RegB (Gineikienė ir kiti, 2006). Be to, atliekant minėtus tyrimus buvo pastebėta, kad bakteriofagai VR7 bei VR20 nesivysto esant 37°C temperatūrai. Prisiminus visus literatūros apžvalgoje pateiktus duomenis, galima numanyti, kad VR grupės bakteriofagai turėtų būti filogenetiškai labiau nuo T4 nutolę, nei dauguma T-lyginių fagų.

Remiantis pradiniais DNR sekų analizės duomenimis buvo nustatyta, kad bakteriofagai VR7 ir VR20 yra tarpusavyje itin panašūs tiek DNR seka, tiek ir vystymosi ypatybėmis, o fagas VR5 – panašesnis į T4. Tokiu būdu, tolimesniems šio disertacinio darbo metu aprašytiems tyrimams, kaip potencialus tarpinio T4 giminingų bakteriofagų filogenetinio pogrupio atstovas, buvo pasirinktas bakteriofagas VR7 bei dar trys netirti ir neklasifikuoti LZ grupės fagai.

## 2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

### 2.1. Medžiagos

#### 2.1.1. Bakterijų kamienai, bakteriofagai ir plazmidiniai vektoriai

##### Bakterijų kamienai:

<i>E. coli</i> B <sup>E</sup>	<i>sup</i> <sup>0</sup> (gautas iš Dr. L. W. Black); naudotas T4 tipo bakteriofagų dauginimui.
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> <i>gyrA96</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>glnV44 deoR Δ(lacZYA-argF)U169</i> [φ80dΔ( <i>lacZ</i> )M15] (Fermentas) buvo naudotas kaip plazmidžių recipientas.
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) (Novagene) naudotas <i>motA</i> geno produkto toksiškumo įvertinimui bei VR grupės bakteriofagų šeimininkų spektro nustatymu.
<i>E. coli</i> C41(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3) išvestinis kamienas, kuriame yra galimas toksiškų baltymų superprodukcavimas (Miroux ir Walker, 1996), naudotas <i>motA</i> geno produkto toksiškumo įvertinimui, superprodukcijos bandymuose bei komplementacijos <i>in vivo</i> tyrime.
<i>E. coli</i> CR63	<i>supD</i> (gautas iš Dr. K. N. Kreuzer); naudotas fago T4 <i>motA</i> <sup>-</sup> dauginimui bei VR grupės bakteriofagų šeimininkų spektro nustatymu.
<i>E. coli</i> MCS1	<i>supD</i> , <i>E. coli</i> CR63 išvestinis kamienas (gautas iš Dr. K. N. Kreuzer), naudotas <i>motA</i> komplementacijos <i>in vivo</i> tyrime.
<i>E. coli</i> MCS1/pRS31	<i>supD</i> , <i>E. coli</i> CR63 išvestinis kamienas (gautas iš Dr. K. N. Kreuzer), turintis plazmidę su fago T4 <i>motA</i> , naudotas fago T4 K10 <i>motA</i> Δ dauginimui.
<i>E. coli</i> TransforMax EP1300	indukuojamą <i>trfA</i> geną turintis kamienas, naudotas plazmidžių, turinčių bakteriofago VR7 genomines DNR restrikcinius fragmentus, transformacijai elektroporavimo būdu.
<i>E. coli</i> B40	<i>supF strr</i> (Sup <sup>+</sup> ) (gautas iš Dr. L. W. Black); naudotas VR grupės bakteriofagų šeimininkų spektro nustatymui
<i>E. coli</i> K-12	AN180 (F <sup>-</sup> , <i>argE3, thi, mtl, xyl, sir704</i> ) (gautas iš Dr V. N. Krylov); naudotas VR grupės bakteriofagų šeimininkų spektro nustatymui.
<i>E. coli</i> Nova Blue (DE-3)	<i>endA1 hsdR17</i> (r <sub>K12</sub> <sup>-</sup> m <sub>K12</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> Z Δ M15::Tn10 (Tc <sup>r</sup> )] (Novagen); naudotas VR grupės bakteriofagų šeimininkų

<i>E. coli</i> GM 2163	spektro nustatymui. <i>dam-13::Tn 9 dcm-6 hsdR2 leuB6 his-4 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 galT22 xyl-5 mtl-1 rpsL136 tonA31 tsx-78 supE44 McrA<sup>-</sup> McrB</i> (Fermentas); naudotas VR grupės bakteriofagų šeimininkų spektro nustatymui.
<i>E. coli</i> MH1	<i>araD139 ΔlacX74 galU<sup>-</sup> galK<sup>-</sup> hsr hsm rpsL</i> (gautas iš Dr K. N. Kreuzer); naudotas VR grupės bakteriofagų šeimininkų spektro nustatymui.

### Bakteriofagai:

T4D <sup>+</sup>	T4D laukinis tipas (gautas iš W. B. Wood).
T4 <i>motA</i> <sup>-</sup>	T4D 33 <sup>-</sup> ( <i>amN134</i> ) 55 <sup>-</sup> ( <i>amBL292</i> ) 45 <sup>-</sup> ( <i>amE10</i> ) <i>motA</i> ( <i>tsG<sub>I</sub></i> ) (gautas iš N. Guild); naudotas viduriniųjų fago T4 transkriptų pradžiai nustatyti <i>motA</i> komplementacijos tyrimų metu.
T4 K10 <i>motAΔ</i>	T4D 38 <sup>-</sup> ( <i>amB262</i> ) 51 <sup>-</sup> ( <i>amS29</i> ) <i>denA</i> <sup>-</sup> ( <i>nd28</i> ) <i>denB</i> <sup>-</sup> ( <i>rIIBΔrIPT8</i> ) <i>motAΔ</i> (gautas iš K.N. Kreuzer); naudotas komplementacijos tyrimuose <i>in vivo</i> .
VR7, VR5, VR20	bakteriofagai, išskirti iš Lietuvoje esančio gyvulininkystės ūkio srutų bei nutekamojo vandens.
LZ, LZ1 ir LZ9	T4 giminingi bakteriofagai, gauti iš Dr. K. Carlson.

### Plazmidės:

pET-16b	5711 bp klonavimo bei ekspresijos vektorius, turintis Ap <sup>R</sup> , <i>lacI</i> , T7 promotorių (Novagene); naudotas klonavimui.
pET-16MotA	fago T4 <i>motA</i> geną turinti plazmidė (Stoškiene ir kiti, 2007).
pCC1BAC <sup>TM</sup>	plazmidė, turinti ChI <sup>R</sup> , <i>parA</i> , <i>parB</i> , <i>parC</i> , T7 promotorių bei oriV–skirtą plazmidės kopijų indukcijai, naudota fago VR7 genotekos konstravimui.

### 2.1.2. Reagentai

Amersham Biosciences:	[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATF, [ $\gamma$ - <sup>33</sup> P]ATF, fenolis, modifikuota T7 DNR polimerazė, šlapalas.
Promega, Fermentas:	PMV atvirkštinė transkriptazė.
Difco:	bakto–agaras, bakto mielių ekstraktas, bakto–triptonas, mitybinis buljonas.



Fluka:	amonio acetatas, bromfenolio mėlis, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Na-acetatas, $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , NaOH, dimetildichlorsilanas.
Fermentas:	ATF, ddNTF, dNTF, DNR fragmentų išskyrimo iš agarozės gelio rinkinys, $\lambda$ DNR, restrikcijos endonukleazės ( <i>XapI</i> , <i>PstI</i> , <i>XbaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>Sall</i> , <i>XhoI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>Eco32I</i> , <i>EcoRV</i> , <i>BglII</i> , <i>DraI</i> ), <i>Taq</i> DNR-polimerazė, <i>Pfu</i> DNR-polimerazė, CycleReader™ DNR sekvenavimo rinkinys.
Merck:	etidumbromidas, K-acetatas, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , $\text{MgCl}_2$ .
Reachim (Реахим):	KCl, sacharozė, KBr, $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , metolas, hidrochinonas, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , chloroformas.
Serva:	agarozė, akrilamidas, amonio persulfatas, boro rūgštis, EDTA, glicerolis, NaCl, $\text{NH}_4\text{Cl}$ , N,N'-metilenbisakrilamidas, TEMED, uridinas.
Sigma:	gliukozė, Kumasi briliantinis mėlis, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , tris, 8-hidroksichinolininas, D-gliukozė.
Epicentre:	CopyControl™ BAC Cloning Kit.

### 2.1.3. Terpės

**LB terpė** (Sambrook ir kiti, 1989): bakto-triptonas – 10 g/l, bakto-mielių ekstraktas – 5 g/l, NaCl – 10 g/l, pH 7,0 su 1 N NaOH (~2 ml/l).

**Agarizuota LB terpė** (Sambrook ir kiti, 1989): bakto-agaras – 12 g/l, bakto-triptonas – 10 g/l, bakto-mielių ekstraktas – 5 g/l, NaCl – 10 g/l, pH 7,0 su 1 N NaOH (~2 ml/l).

**Minkštas agaras fagams** (Clowes ir Hayes, 1968): bakto-agaras – 6 g/l, bakto-triptonas – 10 g/l, bakto-mielių ekstraktas – 5 g/l, NaCl – 10g/l.

**Fosfatinis buferis fagams** (Clowes ir Hayes, 1968):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 7 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3 g/l, NaCl – 4 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.2 g/l.

#### 2.1.4. DNR skyrimo tirpalai ir buferiai

**TE buferinis tirpalas:** 10 mM Tris–HCl (pH 8,0),  
1 mM EDTA.

#### 2.1.5. DNR elektroforezei naudoti tirpalai

**TAE buferis (pH 8,0):** 40 mM Tris–acetatas,  
2 mM EDTA;

##### Dažas DNR mėginiams įnešti

**į agarozės gelį:** 0.04% bromfenolio mėlynasis,  
6.67% sacharozė;

**Agarozė (0,8%):** 40 mM Tris–acetatas,  
2 mM EDTA,  
0,8% agarozė,  
0,5 µg/ml etidžio bromidas;

**TBE buferis (pH 8,3):** 89 mM Tris,  
89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,  
2 mM EDTA;

**Poliakrilamido gelis (6%, pH 8,3):** 89 mM Tris,  
89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,  
2 mM EDTA,  
5,7% akrilamidas,  
0,3% N,N'–metilenbisakrilamidas,  
8 M šlapalas,  
0,1% amonio persulfatas,  
0,05% TEMED.

##### Dažas DNR mėginiams į poliakrilamido gelį įnešti

95% formamidas,  
0,1% bromfenolio mėlynasis,  
0,1% ksileno cianolis,  
20 mM EDTA

## 2.2. Tyrimo metodai

### 2.2.1. DNR amplifikavimas *in vitro*

DNR buvo amplifikuota atliekant polimerazinę grandinės reakciją (PGR) (Saiki ir kt., 1988). Matrica buvo naudota iš koncentruotos fago suspensijos išskirta DNR (Kricker ir Tindall, 1989) arba DNR amplifikavimas buvo vykdomas tiesiogiai reakcijos mišinį suspenduojant fago kolonijos turinį (Jozwik ir Miller, 1994).

### 2.2.2. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio

DNR fragmentai buvo skiriami naudojant DNR išskyrimo rinkinį (Fermentas), vadovaujantis gamintojo pateiktomis rekomendacijomis.

### 2.2.3. PGR fragmentų nukleotidų sekos nustatymas

DNR nukleotidų sekos buvo nustatomos PGR būdu susintetintuose DNR fragmentuose arba tiesiogiai nuo fago genomines DNR. Nukleotidų seka buvo nustatoma dideoksiterminacijos metodu (Sanger ir kt., 1977). Reakcijai buvo naudojama [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dATF arba [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATF (Amersham) žymėti pradmenys ir DNR sekos nustatymo rinkinys su *Taq* Reader DNR-polimeraze (Fermentas), laikantis fermentų gamintojų rekomendacijų. Reakcijų produktai buvo frakcionuojami poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis.

Bakteriofago VR7 genomines DNR nustatymas nuo PGR būdu gautų fragmentų buvo atliekamas Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre.

### 2.2.4. Fagų dauginimas ir DNR išskyrimas

T4 giminingi fagai buvo dauginti dvisluoksnio agaro metodu (Adams, 1959), arba naudotas dauginimas skystoje terpėje. Iki  $10^{11}$ – $10^{12}$  fagu/ml

išdauginti fagai ar jo mutantai buvo laikomi fosfatiniame buferyje (Clowes ir Hayes, 1968) 4°C temperatūroje.

DNR išskyrimui į 1 ml didelės koncentracijos fago suspensijos ( $>10^{12}$  fagai/ml) dedama 10  $\mu$ l 10% SDS tirpalo, 20  $\mu$ l 0,5 M EDTA tirpalo, 10  $\mu$ l proteinazės K (100 mg/ml) ir inkubuojama 65°C temperatūroje 15 min. Susidaręs skaidrus lizatas ekstrahuojamas fenoliu, fenolio–chloroformo mišiniu (1:1), chloroformu. DNR išsodinama 1/10 tūrio 3 M Na–acetato (pH 4,8) ir 2,5 tūrio 96% etanolio tirpalo, praplaunama 70% etanolio tirpalu, džiovinama ir suspenduojama 1 ml TE buferio. Taip paruošta fago DNR buvo naudojama klonavimo darbams bei PGR reakcijų metu.

## 2.2.5. iRNR analizė

### 2.2.5.1. Bendrosios ląstelių RNR išskyrimas

Fagu infekuotų *E. coli* ląstelių bendra RNR buvo skiriama pagal modifikuotą Uzan metodiką (Uzan ir kt., 1988). *E. coli* B<sup>E</sup> (*sup*<sup>0</sup>) ląstelių kultūra auginama LB terpėje 30°C temperatūroje iki  $3 \times 10^8$  ląstelių/ml ir tada užkrečiama fagu (infekcijos daugybiškumas – 10). Reikiamu laiku po infekcijos 3 ml kultūros sumaišoma su 3 ml lizės buferio (4 mM EDTA (pH 8,0), 2% SDS ir kaitinama verdančio vandens vonioje 5 minutes, kol tirpalas pilnai išskaidrėja. Po to pridedamas lygus tūris (6 ml) fenolio, prisotinto 0,2 M Na–acetato tirpalu (pH 4,8), ir RNR ekstrahuojama 20°C temperatūroje. Ekstrakcija 2 kartus pakartojama fenolo/chloroformo mišiniu (1:1). RNR išsodinama 1/10 dalimi 5 M NaCl ir 2,5 tūrio 96% etanolio, 2 h laikoma –20°C temperatūroje ir po to centrifuguojama 20 min (14000  $\mu$ ps/min) 4 temperatūroje. Nuosėdos praplaunamos 70% etanolio tirpalu, suspenduojamos į 400  $\mu$ l dejonizuoto vandens ir išsodinimas pakartojamas analogiškai. RNR nuosėdos suspenduojamos į 20  $\mu$ l dejonizuoto vandens. RNR kiekis ir švarumas įvertinamas spektrofotometriiniu būdu, matuojant absorbciją ultravioletinėje šviesoje, esant 260 nm ir 280 nm bangos ilgiui. Santykis

$A_{260}/A_{280}$  turi būti 1,8–2,0. Taip paruošta RNR naudojama pradmens ilginimo analizėje.

#### **2.2.5.2. DNR pradmens pažymėjimas**

Pradmens DNR 5' galinis nukleotidas buvo žymimas naudojant [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATF ir T4 polinukleotidkinazę pagal gamintojų rekomendacijas (Fermentas).

#### **2.2.5.3. iRNR nukleotidų sekos nustatymas**

iRNR nukleotidų seka buvo nustatoma dideoksiterminacijos metodu (Sanger ir kt., 1977), naudojant  $^{32}\text{P}$  5' gale žymėtus DNR pradmenis, AMV atvirkštinę transkriptazę ir dNTF/ddNTF mišinius santykiu 2:1, arba 5:1, priklausomai nuo to, kokio ilgio nukleotidų seką reikia nustatyti.

#### **2.2.6. Plazmidžių konstravimas**

Plazmidžių DNR karpymas restrikcijos endonukleazių pagalba, viengrandžių DNR galų užbukinimas prisintetinant antrą grandinę *E. coli* DNR polimerazės I Klenow fragmentu, 5'-galinių fosfatų pašalinimas veršiuko žarnų šarmine fosfataze, DNR fragmentų ligavimas T4 DNR ligaze, plazmidžių įvedimas į *E. coli* ląsteles, transformantų atranka bei kiti plazmidžių DNR analizės eksperimentai buvo atliekami pagal plačiai paplitusias metodikas (Sambrook ir kt., 1989), o taip pat vadovaujantis fermentų gamintojų pateiktomis rekomendacijomis.

##### **2.2.6.1. Kryptinga bakteriofago VR7 geno *motA* mutagenezė**

Kryptinga bakteriofago VR7 geno *motA* mutagenezė buvo atliekama naudojantis QuickChange<sup>TM</sup> Site Directed Mutagenesis rinkiniu (Stratagene) pagal gamintojo nurodytas rekomendacijas. Matrica buvo panaudota dvigrandė plazmidinė DNR. Mutagenezės metu buvo naudojami du komplementarūs pradmenys, hibridizuojantys su priešingomis plazmidinės DNR grandimis.

### 2.2.7. Bakteriofago VR7 genotekos konstravimas

Bakteriofago VR7 genomines DNR fragmentavimui buvo panaudota restrikcine endonukleazė XapI (ApoI). 1–3(5) kb dydzio genomines DNR restrikciniu fragmentu klonavimui naudota pCC1BAC (8128 bp) plazmidine sistema. Klonuotu DNR fragmentu nukleotidu sekos nustatymas buvo atliktas Biotechnologijos Instituto Sekvenavimo Centre. Tokiu budu buvo klonuota >500 kb DNR restriktu, kuriuos sekvenavus bei isanalizavus rekonstruoti 64 fago VR7 DNR segmentai (110 kb fago VR7 genomo). Likusios genomo dalies nukleotidu seka buvo nustatyta taikant PGR metoda (galutinis DNR sekos persidengimas – nuo 6 iki 8 kartu). Bakteriofago VR7 genomo rekonstrukcija buvo vykdoma remiantis fagu T4 bei RB69 genomu struktura. Genams, kuriu koduojamu baltymu panašumas T4 buvo ne mažesnis, nei  $E < 10^{-4}$ , buvo suteiktas atitinkamu fago T4 genu pavadinimas. Į T4 genus nepanašus fago VR7 genai buvo pavadinti ORF bei numeruojami, pradedant konservatyviu genu rIIA. Nuo + DNR grandines nurašomi genai pavadinti ORFw, o nuo – DNR grandines nurašomi genai – ORFc. Geno rIIB inicijacijos kodonas atitinka fago VR7 DNR 3' gal a.

#### 2.2.7.1. Tyrimu rezultatu analizė

Sekvenavimo chromatogramos buvo atidaromos Chromas 2.24 programa (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), o nukleotidu seku analizei bei vaizdiniam pateikimui buvo naudojamos sekančios kompiuterines programos: "Glimmer 2.02.RBS finder & TransTerm" (<http://nbc11.biologie.uni-kl.de>), Fasta-Protein, Fasta-Nucleotide, Fasta-Genome, BLAST2, PSI-Search, Transeq and ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), Sequence editor (<http://www.fr33.net/seqedit.php>), Geneious v5.0 (<http://www.geneious.com>), SigmaPlot 4.0, CorelDraw 12.0. Genomo nukleotidu sekos palyginimas buvo atliekamas naudojantis MegaBLAST (<http://phage.bioc.tulane.edu/>) ir Artemis (<http://www.webact.org>). tRNR paieška buvo vykdoma naudojantis tRNAscan-SE 1.21 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>), o terminatoriu paieška – TransTerm

(<http://nbc11.biologie.uni-kl.de>) ir ARNold (<http://rna.igmors.u-psud.fr/>). Baltymų struktūros analizė vykdyta naudojantis YASPIN (<http://www.ibi.vu.nl>) ir FeatureMap3D (<http://www.cbs.dtu.dk/>) programomis.

Evoliucinės kilmės analizė buvo atliekama artimiausių grupių apjungimo metodu (Saitou ir Nei, 1987). Analizuojamų taksonominių vienetų evoliucijai atspindėti buvo paimtos įkėlos iš 1000 pasikartojimų (Felsenstein, 1985). Evoliuciniai atstumai buvo apskaičiuoti Poisson korekcijos metodu (Zuckerland ir Pauling, 1965) ir yra pateikti tokiais vienetais: pakeistų aminorūgščių skaičius tenkantis vienai pozicijai. Iš duomenų apskaičiavimo buvo pašalintos visos pozicijos su tarpais ir pozicijos apie kurias duomenų nėra. Filogenetinė analizė buvo atlikta naudojant MEGA 4.0 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) programą (Tamura ir kiti., 2007).

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Bakteriofagų LZ, LZ1, LZ9 ir VR7 genomo srities tarp genų 30 ir 31 struktūrinės organizacijos tyrimas

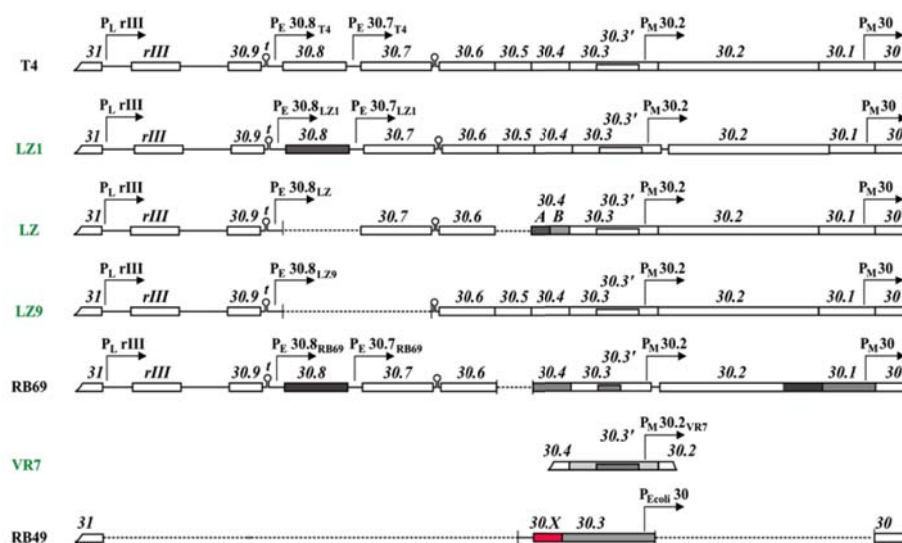
Kaip jau buvo minėta, naujos T-lyginių bakteriofagų grupės paieškos metu buvo tirti bakteriofagai LZ, LZ1, LZ9 bei VR7. Pirminiams šių fagų genomines DNR tyrimams pasirinkta genomo sritis tarp ligazės geno 30 ir kapsidės surinkimo baltymą koduojančio geno 31. Minėta sritis tyrimui buvo pasirinkta neatsitiktinai. Bakteriofago T4 genomo srityje tarp genų 30 ir 31 (~4 kb) aptinkama vienuolika atviro skaitymo rėmelių, du ankstyvieji promotoriai P<sub>E</sub>30.8 bei P<sub>E</sub>30.7, du viduriniai promotoriai P<sub>M</sub>30.2, P<sub>M</sub>30 ir vienas vėlyvasis promotorius P<sub>L</sub>rIII (Prilipov ir kiti, 1990; Nivinskas ir kiti, 1989, 1992b; Zajančkauskaite ir kiti, 1994, 1997; Truncaite ir kiti, 2002, 2004). Todėl, šios srities tyrimas suteikia galimybę palyginti kelių klasių faginių promotorių bei kitų reguliacinių sričių nukleotidų sekas. Be to, genų inžinerijos skyriuje ištyrus šešiolika T4 giminingų bakteriofagų nustatyta, kad daugumos T-lyginių fagų genomo srities 30–31 nukleotidų seka yra >90% homologiška atitinkamai fago T4 sričiai. Didžiausi pakitimai aptikti tik chimerinius genomus turinčių fagų RB69 ir TuIa DNR, tačiau visų be išimties T-lyginių fagų gp30.9, gp30.3 bei geno rIII koduojamas baltymas yra nuo 100% iki >90% homologiški atitinkamiems fago T4 baltymams. Tuo tarpu pseudo-T-lyginių fagų (pvz., RB49) genomo srities tarp ligazės geno 30 ir kapsidės surinkimo baltymą koduojančio geno 31 struktūra ženkliai skiriasi nuo fago T4. Tokiu būdu, vadovaujantis minėtais duomenimis, palyginamoji genomo srities 30–31 struktūrinė analizė gali padėti atrinkti ieškomos T4 tipo fagų filogenetinės grupės atstovus.

Šio darbo metu pasirinktų T4 giminingų fagų LZ, LZ1 bei LZ9 DNR fragmentų amplifikavimui PGR metodu (Saiki ir kiti, 1988) buvo naudojami oligonukleotidiniai pradmenys, komplementarūs bakteriofago T4 genomo srities 30–31 genų nukleotidų sekoms. Be to, fago LZ1 g30.8 bei g30.7 nukleotidų sekos nustatymui buvo sintetiniai šio fago DNR specifiniai



oligonukleotidiniai pradmenys. Bakteriofago VR7 atveju, naudojant T4, RB69 bei VR7 DNR specifinius pradmenis, PGR būdu pavyko rekonstruoti tik genų 30.3 bei 30.3` nukleotidų sekas.

Bakteriofagų LZ, LZ1, LZ9 ir VR7 geno sritys tarp genų 30 ir 31 struktūrinės organizacijos schema pateikta 14 pav. Palyginimui pateiktos ir fagų T4, RB69 bei RB49 atitinkamos geno sritys schemos.



14 pav. Bakteriofagų LZ, LZ1, LZ9, VR7 bei T4, RB69 ir RB49 geno sritys tarp genų 31 ir 30 schema. Promotoriai pažymėti rodyklėmis; nekoduojančios sekos, sąlygojančios smeigtuko pavidalo antrinių struktūrų susidarymą, pažymėtos kilputėmis; *t* raide žymimas terminatorius. Punktūrine linija pažymėtos delecijos, o stačiakampiais – genai. Spalvos atitinka homologijos atitinkamiems fago T4 genams įvertį (%): balta spalva – > 90%, šviesiai pilka– 90% – 70%, pilka – 70%– 50%, tamsiai pilka– 50% – 30%, raudona– atitiktens fago T4 DNR neturintis ASR.

Ištyrus fagų LZ, LZ1 ir LZ9 geno sritys 30–31 nukleotidų sekas nustatyta, kad visų trijų fagų atveju genų *rIII* bei 30.9 koduojami baltymai aminorūgščių lygyje yra 100% identiškai atitinkamiems fago T4 baltymams. Tuo tarpu didžiausi struktūriniai pokyčiai šių bakteriofagų tirtoje srityje aptinkami tarp genų 30.9 ir 30.3 Nustatyta, kad fago LZ1 genas 30.8 yra itin pakitęs, lyginant su fago T4 g30.8. LZ1 gp30.8 homologija T4 gp30.8 yra

~38%, o atitinkamam fago RB69 baltymui ~56% (13 pav.). Faguose LZ ir LZ9 genu, atitinkančių fago T4 ar RB69 *g30.8*, neaptikta.

Bakteriofago LZ genomo srityje 30–31 vietoj vieno *g30.4*, aptinkami du genai – *30.4A* bei *30.4B*. Šio fago gp30.4A homologija trisdešimt šešioms N-galinėms T4 gp30.4 aminorūgštims yra ~38%, o homologija fago RB69 gp30.4 atitinkamai baltymo sričiai ~71%. Tuo tarpu, LZ gp30.4B yra ~61% homologiškas T4 gp30.4 C-galinėms aminorūgštims bei ~71% homologiškas fago RB69 gp30.4 C-galinei baltymo daliai (14 pav.).

A)	30.4A_LZ	MFKKLIQKLLGTEMVEVTYRVTDVSTLTEDHLEPYDN-----	38
		::*:*:* : : :***:** . . : : : * .	
	30.4_T4	--MNIINKIFGIQYIKVTYKVTDKNPNYTDHEEPQVESIILER-DPNWPVEFRLPCYGHWADVEIISIEINV	68
		:* : : * . . : * * : * * * * * * * .	
	30.4B_LZ	-----MTIKMLKYDGGLSIEDRLPSYGHWADVEIIKY---	32
B)	30.4A_LZ	MFKKLIQKLLGTEMVEVTYRVTDVSTLTEDHLEPYDN-----	38
		*:*****:* * :*****. :*:*:* .	
	30.4_RB69	MLKKLIQKLFQMETIEVTYRVTDVSPHAENRLEPYVTSIKMPKNDGNLSIEDRIPGYGHWADVEIISVKDA	71
		:** * ** .*****:* .*****.	
	30.4B_LZ	-----MTIKMLKYDGGLSIEDRLPSYGHWADVEIIKY---	32

15 pav. Bakteriofagų T4 bei RB69 gp30.4 aminorūgščių sekos palyginimas su fago LZ gp30.4A bei gp30.4B nustatytais aminorūgščių sekomis. „\*“ žymi identiškas aminorūgštis, „:“ – konservatyvias aminorūgštis ir „-“ – pusiau konservatyvias aminorūgštis. Brūkšneliu žymima delecija aminorūgščių sekoje.

Tam tikrų pakitimų taip pat buvo aptikta fagų LZ, LZ1 bei LZ9 genomo srities 30–31 reguliacinėse sekose. Fago T4 P<sub>L</sub>rIII, P<sub>M</sub>30.2 bei P<sub>M</sub>30 atitinkamos nukleotidų sekos buvo 100% konservatyvios visuose trijuose tirtuose faguose, tuo tarpu vieno iš dviejų ankstyvųjų promotorių (P<sub>E</sub>30.8), neaptikta faguose LZ bei LZ9. Fago LZ atveju P<sub>E</sub>30.8 yra P<sub>E</sub>30.7 (nes aptinkamas *g30.7* lyderinėje sekoje), o fago LZ9 atveju, ankstyvasis promotorius išsidėstęs aukščiau geno *30.6*. Nepaisant to, bakteriofagų LZ, LZ1 bei LZ9 ankstyvųjų promotorių konservatyvių sričių nukleotidų sekos yra absoliučiai identiškos fago T4 P<sub>E</sub>.

Fago T4 nekoduojančios genomo sritys prieš ankstyvąjį promotorių P<sub>E</sub>30.8 ir už geno *30.7* turi bendrą savybę – invertuotas palindromines sekas, sąlygojančias antrinių RNR struktūrų susidarymą. Prieš promotorių P<sub>E</sub>30.8

esanti G–C turtinga seka bei už jos aptinkama T turtinga seka yra tipiškas nuo  $\rho$  nepriklausomas transkripcijos terminatorius t128.6 (Gram ir kiti, 1984; Raudonikienė ir Nivinskas, 1992). Tarp fago T4 genų 30.7 bei 30.6 taip pat aptinkamos smeigtuko pavidalo antrinės iRNR struktūros stiebą formuojančios G–C turtingos palindrominės sekos, tačiau šios struktūros funkcija T4 genų raiškoje nėra išaiškinta. Fagų LZ, LZ1 bei LZ9 atveju, už g30.9, buvo aptikti absoliučiai nepakitę, terminatorių t128.6 atitinkantys, nukleotidų sekos motyvai. Be to, visų tirtų LZ grupės bakteriofagų atveju, prieš geną 30.6, išlieka (nors ir pakitusios) invertuotos palindrominės sekos bei kilputės motyvas, kuris fagų LZ1 bei LZ9 DNR yra dar labiau stabilizuojantis (CUUCGG), nei fage T4. Tačiau, nepaisant visų išvardintų ypatybių, akivaizdu, kad bakteriofagų LZ, LZ1, LZ9 bei T4 genomo srities 30–31 pagrindiniai genų raiškos reguliacijos principai yra identiški.

Bakteriofago VR7 atveju, PGR būdu, naudojant įvairių T4 giminingų bakteriofagų DNR specifinius pradmenis, pavyko rekonstruoti tik genomo srities tarp genų 30.4 ir 30.2 nukleotidų seką. Išanalizavus ją nustatyta, kad fago VR7 genų 30.3 bei 30.3' koduojami baltymai yra 85% ir 58% homologiški atitinkamiems fago T4 genų produktams. Tiek pakitusių gp30.3 bei gp30.3' nebuvo aptikta nė viename T-lyginiame fage. Net labiausiai filogenetiškai nuo T4 nutolusio T-lyginio fago RB69 DNR esantys g30.3 bei g30.3' koduoja baltymus 94% ir 64% homologiškus atitinkamiems fago T4 baltymams. Bakteriofago T4 genomo srities 30–31 delecinės analizės metu buvo nustatyta, kad genų 30.3 bei 30.3' delecija neigiamai veikia fago vystymąsi laboratorinėmis sąlygomis (neskelbti duomenys.). Įdomu tai, kad pseudo-T-lyginio bakteriofago RB49 genomo srityje tarp genų 30 ir 31 buvo aptiktas vienintelis fago T4 genų ortologas – RB49 g30.3 (neskelbti duomenys.). Gali būti, kad šio geno koduojamas baltymas yra svarbus T4 giminingų fagų vystymuisi tam tikromis aplinkos sąlygomis.

Bakteriofago VR7 geno 30.3 3' -galinėje dalyje buvo aptiktas itin neįprastas vidurinis promotorių  $P_{M30.2_{VR7}}$ . Šio promotoriaus –30 padėties

sekos analogų nebuvo aptikta jokių kitų T4 tipo bakteriofagų viduriniuose promotoriuose (16 pav.).



16 pav. Bakteriofagų T4 bei VR7 viduriniojo promotoriaus, esančio prieš geną *30.2*, nukleotidų sekos palyginimas. Konservatyvūs promotoriaus sekos motyvai apibrėžti, rodyklėmis pažymėti transkripto 5' -galiniai nukleotidai. Besiskiriantys nukleotidai pateikti juodame fone.

Fago T4 atveju, P<sub>M</sub>30.2 yra nuo aktyvatoriaus MotA priklausomas vidurinisys promotorius. Atlikus iRNR pradmens ilginimo analizę nustatyta, kad P<sub>M</sub>30.2<sub>VR7</sub> yra aktyvus bakteriofago VR7 promotorius *in vivo* (88 psl.), todėl buvo nuspręsta patikrinti ar šio fago genomineje DNR yra koduojamas baltymas MotA. Įdomu tai, kad bakteriofago VR7 geno *motA* fragmentas buvo gautas panaudojus fago T4 genams *modA* ir *modB* specifinius pradmenis. Nustatyta, kad bakteriofago VR7 geno *motA* koduojamo baltymo aminorūgščių sekos homologija fago T4 MotA yra ~34%, o homologija RB69 MotA baltymui ~42%. Tokiu būdu, bakteriofago VR7 baltymas MotA yra labiausiai pakitęs iš visų lig šiol nustatytų MotA grupės baltymų (88 psl).

Apibendrinus bakteriofagų LZ, LZ1 ir LZ9 genomines DNR tyrimo rezultatus buvo padaryta išvada, kad šie bakteriofagai yra T-lyginių fagų grupei priskirtini fagai, todėl toliau tiriami jie nebebuvo. Tuo tarpu aptikti pakitimai bakteriofago VR7 reguliacinėse bei baltymus koduojančiose sekose lėmė šio fago pasirinkimą tolimesniems genomines DNR tyrimo etapams.

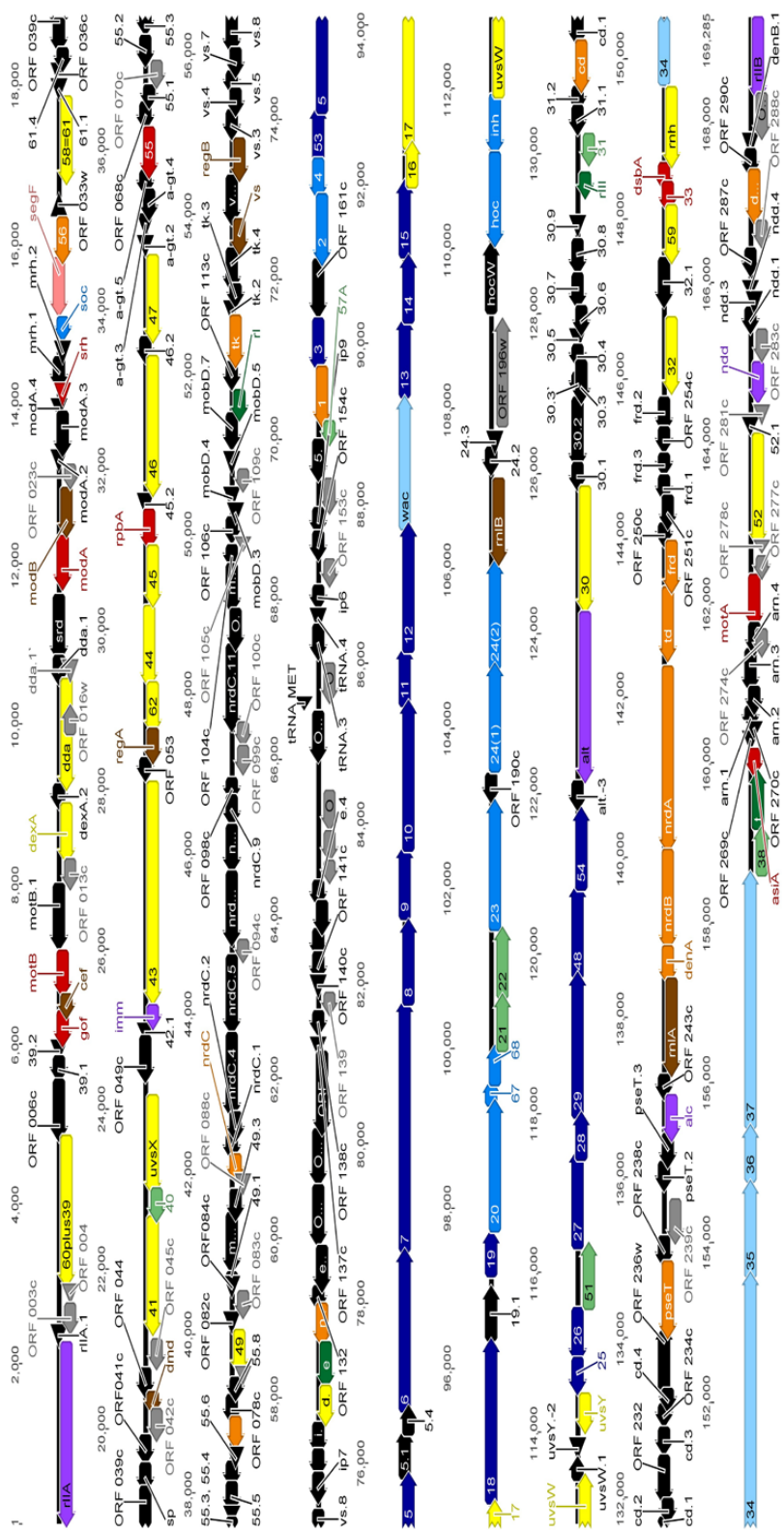
### 3.2. Bakteriofago VR7 genomo sekos tyrimas

Bakteriofago VR7 genomines DNR nukleotidų sekos nustatymas bei nustatytų sekų analizė atlikta metoduose aprašytu būdu. Apibendrinus genomo nukleotidų sekos tyrimo rezultatus nustatyta, kad 169,285 b.p. fago VR7 DNR yra būdingi visi esminiai T4 giminingų fagų genomų struktūros bruožai. Absolūtus fago VR7 DNR G ir C nukleotidų skaičius 40,3% yra ženkliai mažesnis nei *E. coli*. Genetinės šio bakteriofago informacijos kiekis yra itin

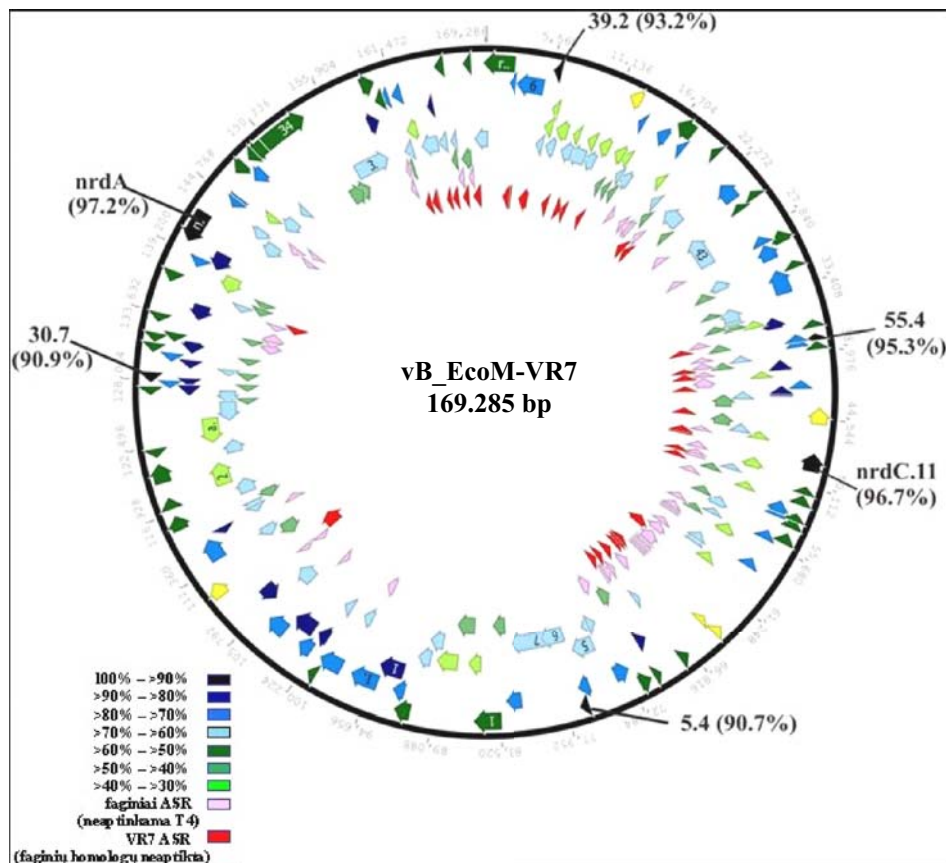
didelis – didžiąją šio fago genomo dalį (95,4%) sudaro baltymus koduojantys ASR. Dauguma šių ASR yra išsidėstę taip, kad vieno geno 3' galinė dalis vienu ar daugiau nukleotidų persidengia su prieš jį esančio geno 5' galiniais nukleotidais. Tuo tarpu net keturi bakteriofago VR7 hipotetiniai ASR – 30.3 (nustatytas ir fage T4), *dda.1*, *ORF016w* bei *ORF274c* – yra kitu skaitymo rėmeliu išsidėstę kito geno (atitinkamai 30.3, *dda.1*, *dda* ir *arn.4*) koduojančioje sekoje. Įdomu tai, kad *ORF016w* lokalizuotas (+) DNR grandinėje, tuo tarpu genas *dda*, kuriame šis ASR aptiktas, nurašomas nuo (–) DNR grandinės. Didžioji dalis viriono struktūrinių bei už viriono formavimąsi atsakingų genų yra nurašoma nuo (+) grandinės, tuo tarpu ne struktūriniai genai – nuo (–) grandinės. Panašios funkcijos baltymus koduojantys fago VR7 genai neretai yra susitelkę į funkcinius modulius. Tokio pobūdžio išsidėstymas ypač būdingas struktūriniais bei replisomos baltymus koduojantiems genams.

Bakteriofago VR7 genomineje DNR aptikti 293 ASR, (18 pav.), bei viena tRNR<sup>MET</sup>. Du šimtai vienuolika fago VR7 hipotetinių ASR koduoja baltymus homologiškus fago T4 baltymams ribose nuo 27% – 97%; 46 ASR neturi analogų T4, bet aptinkami kitų T4 giminingų fagų genome; 9 ASR yra nebūdingi T4 tipo fagams bei 27 ASR koduoja baltymus, kuriems patikimų homologų NCBI duomenų bazėje nepavyko rasti. Detalus bakteriofago VR7 ASR sąrašas pateiktas disertacijos priedo lentelėje Nr.1, tuo tarpu funkcinė fago VR7 genų schema pateikiama 17 pav. Baltymų funkcijos nurodytos pagal T4 giminingų fagų analogiškų baltymų nustatytas funkcijas.

Iš 211 fagui T4 būdingų bakteriofago VR7 ASR, 116 koduoja žinomos funkcijos, o 95 – hipotetinių fago T4 baltymų homologus. Nustatyta, kad aminorūgščių lygyje, bendras homologijos rodiklis yra panašus abiejų grupių ASR atveju. Tik šeši bakteriofago VR7 ASR koduoja baltymus, kurių homologija atitinkamiems fago T4 baltymams viršija 90%. Penki iš šių T4 baltymų yra nenustatytos funkcijos hipotetinių genų produktai, tuo tarpu genas *nrdA* koduoja vieną iš aerobinės ribonukleotidų reduktazės subvienetų.



17 pav. Funkcinė fago VR7 genų schema. Spalvos atitinka: geltona – DNR replikacija, rekombinacija, reparacija, pakavimas; raudona – transkripcija; tamsiai ruda – translacija; oranžinė – nukleotidų metabolizmas; rožinė – galvutės ir kaklo baltymai; tamsiai mėlyna – uodėgėlės baltymai; žydra – ataugėlių baltymai; šviesiai žalia – šaperonai, viriono surinkimo baltymai; tamsiai žalia – lizės baltymai; alyvinė – sąveikos su ląst. / fagais balt.; tamsiai pilka – T4 tipo fagų nežinomos funkcijos ASR; šviesiai pilka – T4 tipo fagų genuose analogų neturintys ASR.



**18 pav. Bakteriofago VR7 žiedinis genolapis.** Genų spalvos iliustruoja jų koduojamų baltymų homologiją fago T4 atitinkamiems baltymams. Spalvų paaiškinimai pateikti paveikslėlio kairiajame apatiniame kampe, geltona spalva pažymėti mažiausios homologijos baltymai (<30%). Rodyklėmis pažymėti ASR, koduojantys baltymus >90% homologiškus atitinkamiems fago T4 baltymams.

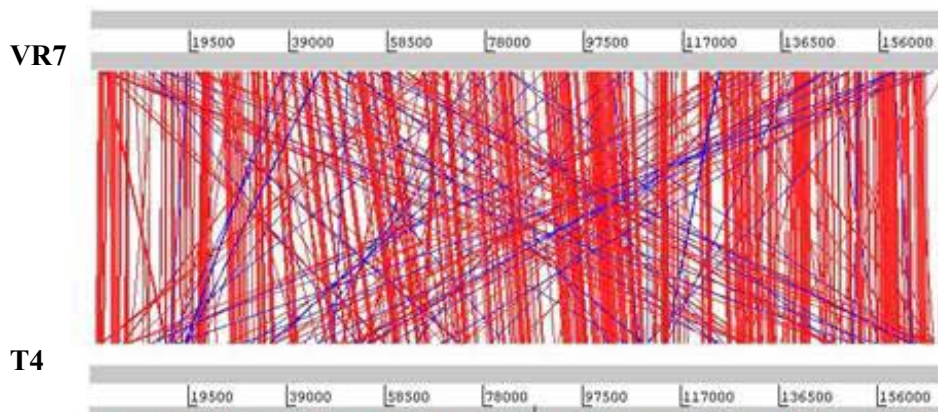
Dvidešimties VR7 ASR koduojamų baltymų homologija atitinkamiems fago T4 baltymams varijuoja ribose nuo 80% iki 90%. Penki iš dvidešimties yra fago T4 viriono baltymų homologai, penki – nukleotidų metabolizmo, du – genų reguliacijos, vienas – replikacijos, o septyni yra nenustatytos funkcijos fago T4 baltymų grupės homologai. Mažiausios homologijos (nuo 20% iki 40% i.d. ar) baltymų grupę sudaro 27 bakteriofago VR7 genų produktai, iš kurių: 16 – nežinomos funkcijos, 4 – struktūriniai, 5 – genų raiškos reguliacijos bei 2 – kitų funkcijų fago T4 baltymų homologai. Likę 159 fago VR7 ASR



koduoja baltymus nuo 79% iki 41% homologiškus 91 nustatytos funkcijos bei 68 nežinomos funkcijos bakteriofago T4 genų produktams.

Fago VR7 genome neaptikta T4 genų, koduojančių  $\alpha$  ir  $\beta$  gliukoziltransferazes ( $\alpha$ -gt,  $\beta$ -gt), DNR endonukleazes SegA, SegB, SegC, SegD, SegE, mobilias endonukleazes I-TevI, I-TevII, I-TevIII, DNR adeninų metilazę Dam, dCMP hidroksimetilazę gp42, atsparumą akriflavinui sąlygojantį baltymą Ac, anaerobinės ribonukleotidų reduktazės G ir D subvienetus, MRBC nukleazės inhibitoriaus Arn, baltymus IPI, IPII, IPIII, laštelės šeimininkės  $\sigma^{32}$  fosforiliniame dalyvaujančio *mrh* geno produkto bei fago T4 DNR koduojamų tRNR.

Atlikus palyginamąją genomo sekos analizę (19 pav.) nustatyta, kad 68 936 bp (211 segmentų) bakteriofago VR7 genominės DNR yra vidutiniškai 73% homologiška T4 DNR, kas sudaro 41% genomo nukleotidų sekos. Tačiau aminorūgščių lygmeny, maždaug trys ketvirtadaliai VR7 genomo, 20 kb – 35 kb bei 70 kb – 160 kb pozicijas apimančios sritys, schematiškai beveik atitinka T4. Šiose srityse aptikti struktūrinius bei replisomos baltymus koduojantys genai, kurių pozicijos, išsidėstymas ir, neretai, aminorūgščių seka yra homologiškos daugelio T4 giminingų *E. coli* fagų tarpe.



19 pav. Bakteriofagų VR7 bei T4 genominės DNR nukleotidų sekos palyginimas, atliktas naudojantis Artemis programa (Carver ir kiti, 2008; [www.webact.org](http://www.webact.org)). Raudona spalva žymi homologines sritis, mėlyna – invertuotas homologines sritis.



Manoma, kad minėtos genomo sritys, evoliuciniu požiūriu, yra itin senos, o jų panašumas liudija išskirtinę šiuose segmentuose aptinkamų genų svarbą kolifagų funkcionavimui (Comeau ir kiti, 2007; Arbiol ir kiti, 2010).

### 3.2.1. Struktūrinių genų grupė

Struktūriniai bakteriofago VR7 genai yra išsidėstę dvejose genomo srityse (20 pav. A ir B). Didžioji dalis struktūrinių genų yra aptikti 51 kb ilgio genomo srityje tarp dNMP kinazės geno *1* bei hipotetinio ASR *alt.-3*. Pagrindinius viriono struktūrinius baltymus koduojantys genai VR7 *g18*, *g19* bei *g23* yra šio didžiojo struktūrinių genų klasterio sudėtyje. Minėti fago VR7 genai koduoja atitinkamai 71%, 70% bei 85% aminorūgščių tapačius bakteriofago T4 *gp18*, *gp19* bei *gp23*. Fago VR7 uodegos ataugėlių baltymus koduojančių penkių genų grupė yra aptikta 27 kb toliau – tarp lizės baltymą koduojančio geno *t* bei RNazės geno *rnh*. Toks išsklaidytas struktūrinių genų išsidėstymas yra būdingas ir fagui T4.

Bakteriofago VR7 genomo srities *1 – alt.-3* (51 kb) struktūra, lyginant su fago T4 atitinkama genomo dalimi (47 kb), yra šiek tiek pakitusi. Didžiajame struktūrinių VR7 genų klasteryje nėra T4 mobilias nukleazes SegC, SegD, SegE bei hipotetinį baltymą 5.3 koduojančių genų, tačiau aptiktas pseudo-T-lyginio bakteriofago RB32 hipotetinės mobilios endonukleazės geno *mobE* homologas. Įdomu tai, kad fago RB32 atveju šis ASR yra toje pačioje genomo pozicijoje, kaip ir VR7 – t.y., tarp uodegos baltymo geno *3* bei geno *2*, koduojančio DNR galus saugantį baltymą (Comeau ir kiti, 2007). Didžiajame fago VR7 struktūrinių genų modulyje taip pat buvo aptikti T4 genomine DNR homologų neturintys genai *ORF196c*, *ORF190c* bei *g19.1*. *ORF190c* yra fago JS98 *ORF173* homologas, o VR7 *g19.1* atitikmuo yra aptinkamas ir fage T6. Tuo tarpu VR7 *ORF196c* atitikmens nėra jokių T4 tipo fagų genomuose. Šiame fago VR7 genomo segmente, T4 *g24* pozicijoje, buvo aptiktos dvi *g24* kopijos. *G24I* bei *g24II* koduojamų baltymų tapatumas T4 *gp24* yra 70% bei 64% atitinkamai. Kaip jau buvo minėta, fago T4 genas *24* nėra itin konservatyvus T4 giminingų bakteriofagų grupėje, bet dvi šio geno kopijos yra

A



**20. Pav. Bakteriofagų VR7 ir T4 struktūrinių genų sancaupų schematinis palyginimas.** Fago T4 atveju, spalvų reikšmės yra: oranžinė – DNR replikacija, rekombinacija, reparacija, pakavimas; tamsiai ruda – trasliacija; šviesiai žalia – šaperonai, viriono surinkimo baltymai; tamsiai mėlyna – galvutės, kaklo baltymai; mėlyna – uodegėlės baltymai; žalsva (A) arba mėlyna (B) – ataugėlių baltymai; pilka – nežinomos funkcijos ASR. Bakteriofago VR7 atveju, spalvos atitinka homologiją (id ar.): juoda – 90% - 100%; tamsiai mėlyna – 80%-90%; mėlyna – 70% - 80%; žydra – 60% - 70%; tamsiai žalia – 50% - 60%; žalia – 40%-50%; šviesiai žalia – 30% - 40%; gelsva – 20%- 30%; raudona – fago VR7 ASR, kuriems homologų T4 genome nėra

tik VR7 bei bakteriofago JS98 genomineje DNR. Tiesa, viena iš JS98 gp24 geno kopijų yra fragmentuota – t.y. sudaryta iš dviejų ASR (Chibani-Chennoufi ir kiti, 2004b).

```

24_I AKINELLRETTTTSSNSLGRPNLVALTRATTKLIYRDIIAEQRTNQPVAALYGVKYITPDNEFSFQTGATYGGVEVSKDR 81
|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
T4_24 AKINELLRETTTTSSNSIGRPNLVALTRATTKLIYSDIVATQRTNQPVAAFYGIKYLNDPNE----- 82
HHHHHHHHH STTSS HHHHHHHHHHHHS GGGSEE B SEEEEEEE

A)

24_I TTIPELATATQ-PVAKGEYVKYQNIYKALVDNPFATTETVLSDVLQELIASTIRLVPDAAHTEKFEAGDVEISNAVF 160
| | | | | : : | | | | | : : | | | | | : : | | | | | : : | | | | | : : | | | | | : : | | | | |
T4_24 -QTTELESKLTNLKGDLFKYNIVYKVLDPFPATIEESDLELALQIAIVLLKVLRFSD-----EIADARF 161
EE TTTTTT TT EEEETEEEE SSS SSS SHHHHHHHHHTTSEEE S

24_I QVNKNWNPVKSRKLTALTVELAQDMEANGFNAPFLEDLLATTMADEINKDVLQSLITVSKRYKVAGISDKGFDILTYD 240
| : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | |
T4_24 QINKWQTAVKSRKLTGTIVELAQDLEANGFDAPNFLEDLLATE-ADEINKDILQSLITVSKRYKVTGITDSGFDLSYA 240
EEEEEE EEEEEEEEEETTHHHHHHTT TTSTTHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHSB STHHHHHT B ST

24_I SAPEGARKLYELVCEMNSEIQKTSYSGTFVVASRVAAMLAGSGWLKHKPEDEQWLPETAYGYLINGLPLVFCVNSPLD 320
| | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | |
T4_24 SAPEAGRSLYR-VCEV-SHIQKESTYTATFCVASARAAAILAASGWLKHKPEDDKYLSQAYGFLANGLPLYCDTNSPLD 318
T S S HHHH HHHH HHHHHHHHSTT EEEE SHHHHTTTTTTSEES SSTTSS TTSSEETTSSEEE S

24_I YVTVGVKENYGGNEVGSIFYAPYTEGLDLDDEHVGAFFKVIIVDPDSLQPSISLMVRYALSANPYTVAKDDKEARIIDAT 400
| | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | |
T4_24 YVIVGVVENIGEKEIVGSIFYAPYTEGLDLDDEHVGAFFKVVVDPESLQPSIGLVRYALSANPYTVAKDEKEARIIDGG 398
TT EEEEE EEEETEEEE SEEEEEEEEE SSSS EEEEEEEEESSSS EEEEEEEEEEE GGGT STTTTTT

24_I NMDLMAGQSNMSYLLGVKLP 420
| | | | | : | | | | |
T4_24 --DDKAGRSVLLGVKLP 416
SS TTTSTT SEEEE

B)

24_2 KINALIHHSTLTAANQVARPNLLSYTRATNKIRFKALVAEQKTTOPVAALYGVRLNPDDKMTYLGATFAGQIGMFERK 82
| | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | |
T4_24 KINELLRETTTTSSNSIGRPNLVALTRATTKLIYSDIVATQRTNQPVAAFYGIKYLNDPNEQ----- 83
HHHHHHHHH STTSS HHHHHHHHHHHHS GGGSEE B SEEEEEEE

24_2 NIPEFTNKDE-AYAVGDMFQFESIVFKALEASPFAGTLETDLGEVISEAIAAGHIRMMSDAAFTDKFEQGHPIAEAGFR 161
| | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | |
T4_24 -TTELESKLTNLKGDLFKYNIVYKVLDPFPATIEESDLELALQIAIVLLKVLRFSD-----EIADARF 162
EE TTTTTT TT EEEETEEEE SSS SSS SHHHHHHHHHTTSEEE S

24_2 IDKWQTEVKSRLKLTSLTVELAQDLEANGFDATDFIDNILGIQMAEEINKDVLQSLITVSSRFKVGQVSEKGVNLNTDAA 241
| : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | |
T4_24 INKWQTAVKSRKLTGTIVELAQDLEANGFDAPNFLEDLLATE-ADEINKDILQSLITVSKRYKVTGITDSGFDLS--- 238
EEEEEE EEEEEEEEEETTHHHHHHTT TTSTTHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHSB STHHHHHT B

24_2 YDNAQRARTLYYMCENMSAVQRQTSFAGTYAVASSRCAAIALAASGWVEKEDQDEL---AYGLKNGLPLYADMNSP 317
| | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | |
T4_24 YASAPEAGRSLYR-VCEV-SHIQKESTYTATFCVASARAAAILAASGWLKHKPEDDKYLSQAYGFLANGLPLYCDTNSP 316
STT S S HHHH HHHH HHHHHHHHSTT EEEE SHHHHTTTTTTSEES SSTTSS TTSSEETTSSEEE

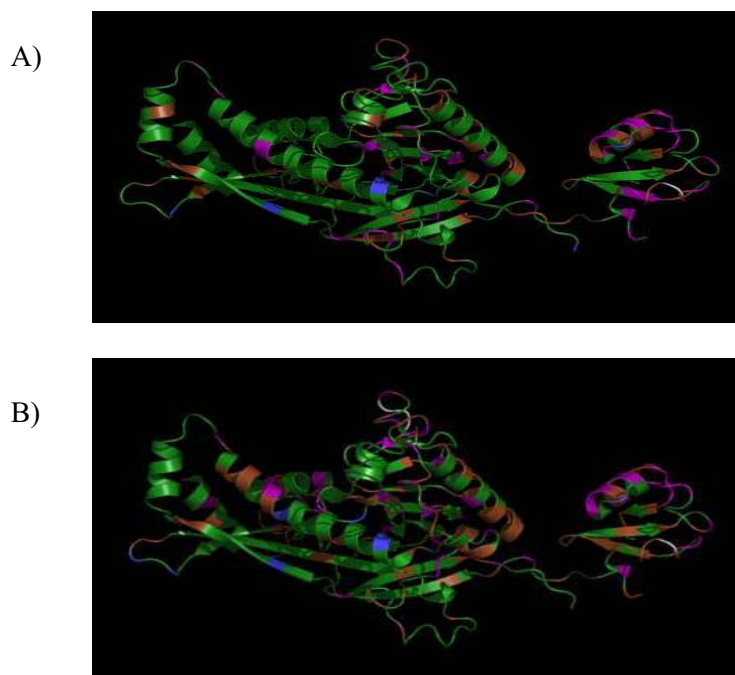
24_2 CDYVIVGVNADMGEQQTVASLYYAPYTEGLSEVDDGDTSVGEFKVIIVDPESLQPTVALLARYALTANPYTVAKDDKEAR 397
| | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | |
T4_24 LDYVIVGVVENIGEKEIVGSIFYAPYTEGLDLDDEHVGAFFKVVVDPESLQPSIGLVRYALSANPYTVAKDEKEAR 393
S TT EEEEE EEEETEEEE SEEEEEEEEE SS SS EEEEEEEEESSSS EEEEEEEEEEE GGGT ST

24_2 IIDGADMKMANQSOLSSYLGVKLP 422
| | | | | : | | | | |
T4_24 IIDGGD-DK-AGRSVLLGVKLP 416
TTTTT SS TTTSTT SEEEE

```

**21. pav. Fago T4 gp24 struktūros (PDB nr.: 1YUE) palyginimas su VR7 gp24\_I (A) ir 24\_II (B), atliktas naudojantis FeatureMap3D programa (Wernesson ir kiti, 2006). Status brūkšnelis žymi identišką aminorūgštį, dvitaškis – konservatyvias aminorūgštis, taškas – pusiau konservatyvias aminorūgštis. Vertikaliu brūkšneliu žymima delecija aminorūgščių sekoje.**

Norėdami pabandyti išsiaiškinti kuris iš dviejų fago VR7 gp24 galėtų būti tikrasis viriono kapsidės baltymas, pabandėme nustatyti gp24I bei gp24II struktūros skirtumus. Bakteriofago T4 gp24 viriono galvutės brendimo metu yra proteolizuojamas – t.y. atskeliama šio baltymo 10 N-galinių aminorūgščių dalis. Proteolizė yra būtina, o ją vykdo gp21 koduojamas baltymas. Fago VR7 gp21 yra 89% identiškas bei 95% panašus T4 gp21, todėl galima hipotetizuoti, kad VR7 gp21 yra T4 gp21 funkcinis atitikmuo. Abiejų VR7 gp24I bei gp24II koduojamų baltymų aminorūgščių sekoje, toje pačioje kaip ir T4 gp24 baltymo vietoje, aptinkamas gp21 proteazės taikiny (L/I)XE<sup>10</sup> (21 pav.), tačiau aptikti ir dar keli potencialūs gp21 taikiniai, kurių fago T4 gp24 atveju, nėra. Be to, N-galinis VR7 gp24II (L/I)XE<sup>10</sup> aminorūgščių motyvas yra pakitęs, tačiau tai neturėtų būti kliūtis gp21, nes yra nustatyta, kad T4 proteazė nėra tiek specifiška sekai, kiek antrinei baltymo struktūrai ir beveik išimtinai skelia β klostės gale esantį motyvą (L/I)XE<sup>10</sup> (Hong ir Black, 1993).



**22. pav. Fago T4 gp24 struktūros (PDB nr.: 1YUE) palyginimas su VR7 gp24\_I (A) ir 24\_II (B), atliktas naudojantis FeatureMap3D programa (Wernesson ir kiti, 2006). Spalvų reikšmės: žalia – atitinka; ruda – nereikšmingas neatitikimas; alyvinė – reikšmingas neatitikimas; tamsiai pilka – nesutampanti grandinė; mėlyna – delecija tiriamo baltymo a. r. sekoje.**

Tokiu būdu, už  $E^{10}$  aminorūgšties esančių motyvų gp21 proteazė skaldyti neturėtų. 22 (B) pav matyti, kad gp24II hipotetinė erdvinė struktūra, lyginant su T4 gp24, labiau skiriasi, nei VR7 baltymo gp24I. Tačiau baltymo dalis, atsakinga už gp24 oligomerizaciją (dešinėje abiejų paveikslėlių pusėje matoma struktūra) pakitusi abiejų fago VR7 gp24 atveju. Taigi, norint atsakyti į klausimą, kuris iš minėtų dviejų genų koduoja tikrąjį bakteriofago VR7 kapsidės baltymą, reikia papildomų tyrimų. O prisiminus faktą, jog visa eilė T4 giminingų fagų gp24 analogų neturi, visai įmanoma, kad abu gp24 funkcionuoja kitaip, nei T4 gp24.

Bakteriofago VR7 genomineje DNR taip pat aptiktos dvi kapsidės paviršiaus baltymą koduojančio geno *hoc* kopijos. Bakteriofago VR7 genai *hoc* bei *hoc(w)* yra trans padėtyje vienas kito atžvilgiu, t.y. nurašomi nuo skirtingų DNR grandinių, o šių ASR koduojamų baltymų homologija fago T4 Hoc yra skirtinga – atitinkamai 45% bei 30%. Du panašaus tipo struktūriniai genai konservatyviajame fago genomo segmente gali atsirasti dėl dviejų priežasčių – vieno geno duplikacijos (konversijos) arba genetinės medžiagos tarp itin giminingų fagų apsikeitimo (Filée ir kiti, 2006). Įdomu tai, kad VR7 fago *hoc* ir *hoc(w)* nukleotidų seka, ilgis bei koduojamų baltymų aminorūgščių sekos yra ganėtinai skirtingos (15% identiškų bp bei 28% identiškų a.r.) Be to, sprendžiant iš srityje 24.3 – *uvsw* aptiktų hipotetinių reguliacinių sekų išsidėstymo, galima numanyti, kad du genai *hoc* ir *inh* yra nurašomi į vieną dicistroninį transkriptą (nuo  $P_{inh}$ ), o kiti du – *hoc(w)* ir VR7 *ORF196c* – į kitą (nuo  $P_{ORF196c}$ ), o tarp *hoc* genų esančioje nekoduojančioje DNR srityje aptiktas smeigtuko pavidalo antrinę iRNR struktūrą formuojantis motyvas. Remiantis aukščiau minėtais bei kitais DNR sekos analizės duomenimis, galima prielaida, kad *hoc(w)* kartu su *ORF196c* bakteriofago VR7 genomineje DNR atsirado genetinės medžiagos tarp giminingų fagų apsikeitimo būdu. VR7 *hoc(w)* buvo pavadintas “hoc” dėl jo koduojamo baltymo aminorūgščių panašumo su kitų fagų Hoc baltymais, tačiau kokia šio geno funkcija ir ar apskritai jis yra funkcionalus bakteriofago VR7 vystymosi metu, nežinoma.

Daugiau žymių neatitikimų fagui T4, bakteriofago VR7 struktūrinių genų grupėje aptikta nebuvo.

Palyginamoji bakteriofagų T4 bei VR7 struktūrinių baltymų analizė parodė, kad labiausiai besiskiriantys yra dauguma viriono ataugėles bei bazinę plokštelę formuojančių baltymų (20 pav.). Bakteriofago VR7 gpwac bei gp12 homologija analogiškiems fago T4 baltymams yra atitinkamai 36% bei 45%. Kaip ir galima buvo numanyti, ypač pakitę yra šių fago VR7 baltymų C-galiniai domenai. C-galinis gp12 domenas sąveikauja su ląstelės paviršiaus receptoriais (Rossmann ir kiti, 2004), o C-galinis gpwac domenas – su uodegos ataugėlių baltymais (Letarov ir kiti, 2005). Daugelio T4 giminingų fagų atveju, būtent C-galinės šių baltymų dalys pasižymi mažiausiu aminorūgščių sekos konservatyvumu (Letarov ir kiti, 2005; Comeau ir kiti, 2007).

Tuo tarpu, viriono ilgųjų ataugėlių baltymų sekos analizės rezultatai nustebino. Nustatyta, kad VR7 gp37 beveik 70% aminorūgščių yra identiškas fago T4 gp37, o palyginus abiejų baltymų C-galinius domenus, identišku ar skaičius siekia 77%, nepaisant to, kad šioje VR7 baltymo dalyje yra 20 ar insercija (23 pav.). Dar daugiau, kaip matyti 23 pav., struktūrinių baltymų grupėje VR7 bei T4 gp38 yra vieni iš mažiausiai besiskiriančių baltymų (88% identišku a.r., 99% panašiu), kas itin keista, prisiminus literatūros apžvalgoje minėtą mažojo struktūrinių baltymų klasterio panašumo tendenciją.

Reikia pasakyti, kad genų 37 bei 38 koduojamų baltymų funkcijos skirtingų *E. coli* fagų viriono formavimuisi yra nevienodos. Bakteriofago T4 atveju, su ląstelės paviršiaus receptoriais sąveikaujantis adhezinas yra gp37 C-galinėje dalyje, o genas 38 koduoja ilgųjų viriono ataugėlių susirinkimo baltymą (Wood ir kiti, 1994). Daugelio kitų T4 giminingų *E. coli* fagų atveju, adhezinas yra koduojamas gp38 (Tétart ir kiti, 1998; Chibani-Chennoufi ir kiti, 2004b). Tuo tarpu T4 tipo ne kolifaguose, geno 38 analogų neaptikta (Miller ir kiti, 2003b; Mann ir kiti, 2005; Comeau ir kiti, 2007). Sprendžiant iš itin didelio aminorūgščių sekos panašumo, VR7 gp38 turėtų būti fago T4 gp38 funkciją atliekantis baltymas, kaip yra ir daugelio T-lyginių fagų atveju. Tačiau VR7 gp37 C-galinės dalies skirtumai gali sąlygoti T4 bei VR7 fagų jungimąsi

prie skirtingų ląstelės paviršiaus receptorių, kaip buvo nustatyta fagų TuIa bei TuIb atveju (Datta ir kiti, 1977).

```

            460       470       480       490       500       510
VR7_gp37C SSFDYGTKTTSSFDYGTNTNTGNNHNSVSGTTSSAGAHTHTLTFHNGASSGGSVVGAS
             :::::::        ::          :::::::   :::::   :  : :   : : .   : . . .
T4_gp37C SSFDYGTK-----GT---NSTGGHTHSGSGSTSTNGEHSYIEAWNGTGVGGNKMSY
            900                 910        920        930        940

            520       530       540       550       560       570
VR7_gp37C PSDYTAKTTTTSSAGAHTHTWSGTTNTGNNHAHTVGIGAHSWSVIGIAHTHTVAIGSHGH
             . : . . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :
T4_gp37C AISYRAGGSNTNAAGNHSHTFSFGTSSAGDH-----SHSVGIGAHTHTVAIGSHGH
            950        960        970        980                 990        1000

            580       590       600
VR7_gp37C GLTINSTGNTENTVKNI AFNYIVRLA
             . . . . . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :
T4_gp37C TITVNSTGNTENTVKNI AFNYIVRLA
            1010       1020

```

**23 pav. Bakteriofagų VR7 bei T4 gp37 C-galinio domeno aminorūgščių sekos palyginimas. „:“ žymi identiškas aminorūgštis, „-“ – konservatyvias aminorūgštis. Brūkšneliu žymima delecija aminorūgščių sekoje.**

Įdomu tai, kad VR gp37 abiejų C-galinės dalies insercijų sekos itin panašios dviem iš trijų TuIb gp37 C-galinėje dalyje aptiktų (Oliver ir Crowther, 1981) insercijų.

Bakteriofago T4 genus *ipI*, *ipII*, *ipIII* bei *alt* iš dalies taip pat būtų galima priskirti struktūrinių genų grupei, nes jų koduojami baltymai, kartu su fago DNR, yra pakuojami į viriono galvutę. Bakteriofago VR7 gpAlt apžvelgtas sekančiame skyriuje. Tuo tarpu, kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgoje (14 psl.), Ip baltymų genai priklauso mažiausio konservatyvumo struktūrinių genų grupei ir, galima sakyti, kad kiekvienos rūšies fagas turi savo IP baltymų rinkinį. Bakteriofago VR7 genomineje DNR genų, atitinkančių fago T4 *ip* sekas, aptikta nebuvo. Vietoje jų VR7 genome buvo aptikti penki ASR, koduojantys skirtingų rūšių fagų (RB32, T6, Pol, JS98 bei RB69) IP baltymus.

Apibendrinant bakteriofago VR7 struktūrinių genų analizės duomenis galima teigti, kad bakteriofagų VR7 bei T4 šeimininkų spektras gamtoje turėtų

šiek tiek skirtis, ką patvirtina ir atlikti laboratorinių *E. coli* kamienų jautrumo fagai VR7 tyrimai (žr. skyrių 3.4.).

### 3.2.2. Replikacijos ir su replikacija susijusių genų grupė

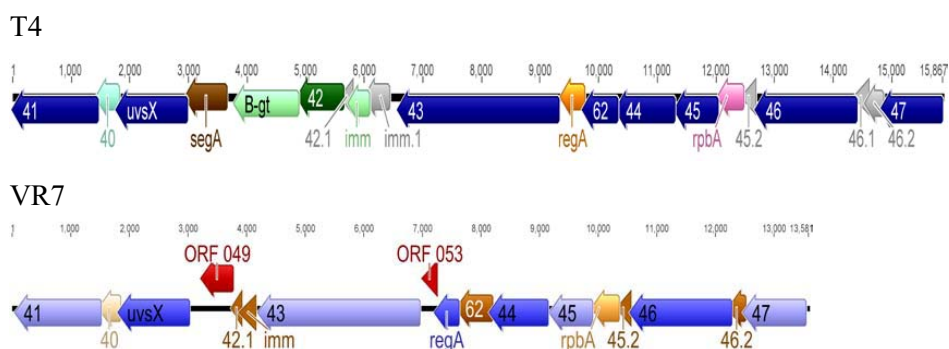
Bakteriofago VR7 genomineje DNR RRR procesų baltymus koduojantys genai formuoja kelias gana nutolusias policistronines sankaupas, esančias abipus struktūrinių genų modulių. Išimtis tėra reparacijos–rekombinacijos komplekso baltymus koduojantys genai *UvsW* ir *UvsX* (aptikti didžiajame struktūrinių genų modulyje) bei įvairiu atstumu nuo RRR genų sankaupų nutolę genai *49*, *dda*, *39+60*, *30* ir *52*. Abiejuose RRR sankaupose aptikti ir kitų funkcijų baltymus (transkripcijos reguliatorius, nukleotidų metabolizmo fermentus) koduojantys genai bei daugybė nežinomos funkcijos ASR analogų. Priešingai nei struktūrinių genų atveju, visi fago VR7 RRR genai yra nurašomi nuo (–) DNR grandinės, o didžiausi replikacijos–reparacijos–rekombinacijos genų sankaupų schematiniai neatitikimai T4, nustatyti funkcinių analogų neturinčių genų pozicijose.

Bakteriofago VR7 genomineje DNR aptikti beveik visi fago T4 RRR genų atitikmenys, o jų koduojamų baltymų pirminės struktūros tapatumas – nuo 83% (*gp49*) iki 46% (*gp40*) identiškų aminorūgščių. Topoizomerazės didijį subvienetą koduojančių genų atvejis yra vienintelis RRR genų schematinio neatitikimo pavyzdys fagų VR7 bei T4 genomuose. Fago VR7, kaip ir daugumos kitų T4 giminingų bakteriofagų atveju, topoizomerazės didysis subvienetas yra koduojamas vieno *39+60* geno, tuo tarpu fage T4 dviejų – *g39* ir *g60*. VR7 *g39+60* koduoja baltymą, kurio N-galinių aminorūgščių (477 ar) sekos tapatumas fago T4 *gp39* yra 74%, o likusios – 132 C-galinės aminorūgštys – 72% atitinka T4 *gp60* pirminę struktūrą.

Fago VR7 genai, koduojantys DNR polimerazę (*gp43*), polimerazės procesyvumo veiksnį (*gp45*), žiedo užkėlėją formuojančius baltymus (*gp44/62*), replikatyvinę helikazę (*gp41*) bei rekombinacijos baltymus (*UvsX*, *gp46*, *gp47*), formuoja didžiąją ~14 kb RRR genų sankaupą, kurioje dar yra keli su replikacija nesusiję fago T4 genų atitikmenys. Šioje RRR genų sankaupoje esančių genų koduojamų baltymų panašumas atitinkamiems fago



T4 baltymams – nuo 55% (gp62) iki 79% (gpUvsX). Kita, daug mažesnė, replikacijos genų (g32, g59 bei *rnh*) sankaupa yra priešingame VR7 chromosomos gale. Šios sankaupos genų koduojami baltymai gp32 (SSB), gp59 (helikazės užkėlėjas) ir RNh (ribonukleazė H) 61%, 75% bei 56% a.r. atitinka analogiškus fago T4 baltymus.



**24 pav. Bakteriofagų VR7 bei T4 replikacijos genų sankaupos struktūros palyginimas.** Fago T4 atveju, spalvų reikšmės yra: tamsiai mėlyna – DNR replikacija, rekombinacija, reparacija; tamsiai ruda – mobilios nukleazės; šviesiai žalia – sąveikos su ląst./ kitais fagais balt.; tamsiai žalia – nukleotidų metabolizmo baltymai; žydra – šaperonai; ružava – transkripcijos baltymai. Bakteriofago VR7 atveju, spalvos atitinka homologiją (id a.r.): mėlyna – 70% – 80%; šviesiai mėlyna – 60% – 70%; ruda – 50% – 60%; oranžinė – 40%–50%; kreminė – 30% – 40%; raudona – fago VR7 ASR, kuriems homologų T4 genome nėra

Fago T4 replikacijos procesą galima būtų suskirstyti į du etapus. Ankstyvoje infekcijos stadijoje prasideda nuo *ori* priklausoma replikacija, kurioje svarbiausias vaidmuo tenka išimtinai replisomos baltymams (Nossal ir kiti, 2001). Neilgai trukus, prasideda nuo rekombinacijos priklausomos replikacijos etapas, inicijuojamas, kaip manoma atsitiktinėse genomo vietose (Kreuzer, 2000). Šio proceso metu, be pagrindinės replikacijos baltymų sistemos, itin svarbus yra trijų baltymų UvsW, UvsX bei UvsY kompleksas, kurio pagrindinė paskirtis – homologinės rekombinacijos metu atsiradusių DNR pažaidų reparacija (Drake ir Ripley, 1994). Bakteriofago genominė DNR koduoja visus tris WXY sistemos baltymus, kurių tapatumas fago T4 UvsW, UvsX bei UvsY atitinkamai yra 74%, 79% bei 61% identiškų aminorūgščių. Be paminėtų, fago VR7 DNR koduojami tokie reparacijoje svarbūs T4

homologai, kaip pirimidinų dimerų N-glikozidazė DenV (77% identiškų a.r.) bei heterodupleksų rezolvazė gp49 (73% identiškų a.r.).

Palyginamoji bakteriofago VR7 RRR baltymų analizė parodė, kad daugelio VR7 replikacijos baltymų aminorūgščių sekos motyvai, atsakingi už sąveiką su kitais šios funkcinės grupės baltymais, skiriasi nuo atitinkamų fago T4 gp sričių. Pavyzdžiu galima būtų paminėti DNR polimerazę. Bakteriofago VR7 DNR polimerazės genas 43 koduoja 904 ar baltymą, kurio aminorūgščių seka yra 60% identiška T4 gp43. Panašios homologijos į T4 gp43 (64% identiškų aminorūgščių) yra ir fago RB69 geno 43 koduojamas baltymas (Wang ir kiti, 1995). RB69 gp43 yra bene geriausiai ištirta T4 giminingų fagų polimerazė, kuri buvo iškristalinta įvairiose konformacijose (Wang ir kiti, 1997; Hogg ir kiti, 2004). VR7 gp43, kaip ir RB69 DNR polimerazės, nykščio domenas yra 1 a.r. ilgesnis, be to šių abiejų baltymų aminorūgščių seka yra panašesnė – 74% identiškų a.r. Palyginus fagų T4, RB69 bei VR7 gp43 pirminę struktūrą nustatyta, kad Petrov ir bendraautorių (2006) identifikuotos absoliučiai konservatyvios 29 aminorūgštys, esančios RB69 DNR polimerazės aktyvumui svarbiose srityse (POL, EGZO, dNTP surišimo ir t.t.), yra ir fago VR7 gp43 atveju. Tuo tarpu kitos minėtų sričių aminorūgštys bei DNR polimerazės pirminės struktūros motyvai, kurie, kaip manoma, yra reikalingi sąveikai su kitais replisomos baltymais (pvz. gp59), VR7 gp43 atveju, yra gan pakitę.

Įdomu tai, kad fago VR7 RRR sistemos baltymų aminorūgščių sekos yra gana mozaikiškos ta prasme, kad šių baltymų pirminės struktūros neatitikimo T4 vietose, dažnai aptinkamos tokios aminorūgštys, kokios yra kitų T4 tipo fagų atitinkamų RRR baltymų aminorūgščių sekose. Gp59 yra vienas panašiausių baltymų VR7 bei T4 replikacijos baltymų grupėje (75% identiškų a.r.), tačiau sritis, atsakinga už gp59–gp43 sąveiką (25 pav.), ganėtinai skiriasi. Įdomu tai, kad gp59 Cys215, dėl kurio tariamai konkuruoja gp43 bei gp41 (Xi ir kiti, 2005), yra aptikta ir bakteriofago VR7 gp59 C-galinėje dalyje.

```

59_T4      YRKILNIDSQKAKNVFIETVK--SCKY----- 25
59_RB32   YRKILNIDSQKAKNVFIETVK--SCKY----- 25
59_RB69   YRKILQIDVNAAKKLFETIK--SCKY----- 25
59_RB49   YKKLLVIDAAKARALFVKVVK--ECKEISQLKVVETNS 35
59_VR7    YKKILNIDALEARKLFETVK--GCKF----- 25
59_KVP40  YDKLLKIDEEELAKELFIQVKN--QSKI----- 25
59_44RR   YRKLVVINKDTAKRKFIHVKAFKDQV----- 27
59_Aeh1   YRQLTLINKEQAKACFIEIAN--QNKL----- 25
59_RB43   YRKLVEISNEEIVK-YRNLMKQTLIKLNK----- 29
*  ::  * .      :  :  :      :

```

**25 pav. Bakteriofago VR7 bei įvairių T4 giminingų fagų gp59 C-galinio domeno aminorūgščių palyginimas.** „\*“ žymi identiškas aminorūgštis, „:“ – konservatyvias aminorūgštis ir „-“ – pusiau konservatyvias aminorūgštis. Brūkšneliu žymima delecija aminorūgščių sekoje.

VR7 gp 41 yra 65% homologiškas T4 RNR praimazei (26 pav.), tačiau šio baltymo C-galinis segmentas, kuris, kaip teigiama, yra svarbus heksamero formavimuisi bei sąveikai su gp59 (Delagoutte ir von Hippel, 2005), yra itin pakitęs.

Be to, šiuo metu vykdomo jungtinio Biotechnologijos instituto bei Genų inžinerijos skyriaus projekto tyrimų metu nustatyta, kad plazmidėje esantis VR7 g41 itin silpnai komplementuoja fago T4 mutanto T4K10Δ41 vystymąsi sistemoje *in vivo* (nepublikuoti duomenys).

```

41_RB32   KWNKFLMGVQKGNQKWEIEQD---STPSEVSEVAGSQQIQAEQNRVQRN---ESTRAQL 466
41_T4     KWNKFLMGVQKGNQKWEIEQD---STPTEVNEVAGSQQIQAEQNRVQRN---ESTRAQL 466
41_RB69   KWNKFLMGVVRKGNQKWEIEQEGM-NTPTVNEENAGAMRQAEVNRTERVKGAKATRADL 471
41_VR7    YYNKFKMGVKKGNQRWYEVDDDSAPKQGPVKEATGEMNRQAEEMNRQTRV-----NRSDDL 467
41_44RR   YINKFRMGVVRKGNQRWYDLEEE-----GQSAPKPGAAPARQADHTKGSNN-----REKLL 459
41_RB43   HFNHFKLEVRKGNQRWMDTNS---DIGFKSDYKGRQMPKTVEEAQGAMVKAEGNRSKL 467
41_RB49   YYSRFNVGVKKGNQRWYEVPNQ-----IADQENAVKPKQSAQQAE-----KREKLL 461
41_KVP40  QDQTFMIAVNGKQQRWGDIDGTAN---YSAPAQSQAASASPPAQKKESSAK----- 460
41_Aeh1   KFSRFNLCVDKGQRWHEPDGNFGGNLNDANDRMQATHKDNVAKAKDLSTRNKMDQLSAM 474
.  *  :  *  **  :  *  *  :

```

```

41_RB32   DALANELKF-- 475
41_T4     DALANELKF-- 475
41_RB69   DSLANELKF-- 480
41_VR7    DDLAAQMKF-- 476
41_44RR   DELAGIMNF-- 468
41_RB43   AEAAKSMNIEF 478
41_RB49   DELANNMTF-- 470
41_KVP40  ---AEAVNW-- 466
41_Aeh1   GDASDAVDWGI 485
:  :

```

**27 pav. Bakteriofago VR7 bei įvairių T4 giminingų fagų gp41 C-galinio domeno aminorūgščių palyginimas.** „\*“ žymi identiškas aminorūgštis, „:“ – konservatyvias aminorūgštis ir „-“ – pusiau konservatyvias aminorūgštis. Brūkšneliu žymima delecija aminorūgščių sekoje.

Visi šie duomenys atitinka vyraujančią nuomonę, kad replikacijos ir su ja susijusių procesų genų pirminė seka yra gana plastiška, tačiau dauguma skirtumų koncentruoti jų koduojamų baltymų tarpusavio sąveikos srityse.

### 3.2.3. Kitų funkcinų grupių fago VR7 genai

Kaip jau buvo minėta aukščiau, fago VR7 genome nebuvo aptikta dCMP hidroksimetilazės geno 42 analogo bei  $\alpha$  ir  $\beta$  gliukoziltransferazės koduojančių genų  $\alpha$ -gt,  $\beta$ -gt. Ištyrus vienuolikos T4 giminingų bakteriofagų genomus buvo nustatyta, kad minėtų genų homologai neaptinkami faguose, kurių DNR vietoje HmC yra citozinas (Petrov ir kiti, 2006). Tuo tarpu, restrikinė bakteriofago VR7 genomines DNR analizė parodė, kad šio fago DNR yra panašiai modifikuota, kaip ir fago T4. Be to, VR7 genome yra genai, koduojantys fago T4 baltymų DenB (endonukleazė IV, blokuojanti biosintezę nuo dCMP turinčios DNR) bei Alc (blokuoja transkripciją nuo dCMP turinčios DNR) homologus, kurių neaptinkama nmodifikuotą DNR turinčiuose faguose. Bakteriofago RB69 atveju, T4 gp42 funkcinis analogas yra ORFRB69125c (Nolan ir kiti, 2006). VR7 genomineje DNR atitiktis šiam RB69 ASR nėra, tačiau T4 gp42 pozicijoje aptikti du nežinomos funkcijos ASR. Gali būti, kad kažkuris iš jų, ar kitoje genomo pozicijoje esantis nežinomos funkcijos ASR, pakeičia fago T4 dCMP hidroksimetilazę.

Bakteriofago VR7 genomineje DNR aptikti daugelio fago T4 baltymų, atsakingų už dNTP konversiją bei pirimidinų biosintezę homologų. Fago VR7 dCMP deaminazė Cd, dTMP sintazė Td, reduktazė Frd, dNMP kinazė gp1 bei timidinų kinazė Tk yra homologiškos fago T4 nukleotidų metabolizmo fermentams atitinkamai 86%, 65%, 66%, 48% bei 72% identiškų a.r. Be paminėtų, bakteriofago VR7 genomineje DNR taip pat buvo aptiktas T4 dUTP – azės baltymą koduojančio geno atitikmuo. Fago VR7 gp56 net 76% tapatus atitinkamam T4 baltymui, kas, vėlgi, kelia VR7 DNR modifikacijos klausimą – paprastai, bakteriofagų, kurių DNR citozinai nėra modifikuojami, dUTP – azės

analogai būna panašesni į bakterinius, nei į fago T4 gp56 (Miller ir kiti, 2003b).

Kaip jau buvo minėta, fago VR7 aerobinės reduktazės subvienetas NrdA yra vienas iš šešių bakteriofago VR7 baltymų, kurių homologija atitinkamiems fago T4 baltymams viršija 90%. Kitų dviejų aerobinės nukleotidų reduktazės subvienetų NrdB bei NrdC tapatumas atitinkamiems fago T4 baltymams yra atitinkamai 87% bei 84% identiškų aminorūgščių. Įdomu tai, kad iš trijų anaerobinės reduktazės komplekso baltymų, fago VR7 genome aptiktas tik NrdH baltymas, 68% aminorūgščių tapatus fago T4 nrdH geno produktui. Nežinia sutapimas tai, ar ne, tačiau fago VR7 dauginimo metu buvo pastebėta, kad kultūros aeracija įtakoja šio fago vystymąsi – kuo aeracija geresnė, tuo fago VR7 išeiga didesnė.

Net 11% koduojančios bakteriofago T4 DNR dalies sudaro penkiolikos mobilių endonukleazių – *seg*, *i-tev* bei *mob* grupių – genai. Manoma, kad būtent mobilios endonuklezės yra atsakingos už įvairių genomo segmentų mainus tarp T4 giminingų bakteriofagų (Brok-Volchanskaya ir kiti, 2008; Wilson ir Edgell, 2009). Fago VR7 genomineje DNR koduojamos penkios hipotetinės mobilios endonuklezės. Bakteriofago T4 endonukleazių SegF ir SegG genų homologai (65% ir 54% id ar) aptikti VR7 genomo pozicijose atitinkančiose šių genų pozicijas fage T4. Tuo tarpu tris hipotetines VR7 Mob endonukleazes koduojantys genai aptikti kitose genomo pozicijose nei fage T4. Įdomu tai, kad didžiausia struktūrinė įvairovė VR7 genome nustatyta srityse, atitinkančiose fago T4 genomo segmentus, kuriuos šiame fage riboja mobilių endonukleazių genai.

#### **3.2.4. T4 genome homologų neturintys VR7 ASR**

Bakteriofago VR7 genome aptikti 46 ASR neturintys homologų fago T4 DNR. Penki iš jų koduoja RB32, T6, Pol, JS98 bei RB69 hipotetiniams IP baltymams homologiškus baltymus (sk. 3.2.1.2.), o 41 VR7 ASR yra homologiški įvairių T4 tipo fagų nežinomos funkcijos genams. Didžioji dalis minėtų VR7 ASR yra fagų JS98 bei RB69 įvairių nežinomos funkcijos genų

homologai (~80%), keli ASR koduoja į fago T6 panašius baltymus, tuo tarpu penki – labiau nuo T4 nutolusių fagų RB32, RB23, 44RR2.8t hipotetinių baltymų atitikmenys. Dauguma šių genų nurašomi nuo (–) DNR grandinės, o jų pozicijos VR7 bei paminėtų fagų genomuose daugmaž atitinka. Iš 18 pav. Matyti, kad dauguma nežinomos funkcijos fago VR7 ASR yra išsidėstę geno srityse, abipus didžiojo struktūrinių genų klasterio. Rekombinacijos dažnis šiose geno srityse, kaip nustatyta daugelio T4 tipo fagų atveju, yra itin didelis. Todėl kažkurie iš paminėtų ASR gali būti genetinių mainų tarp giminingų fagų pasekmė. Dalis šių ASR galbūt yra gana konservatyvūs išvardintų fagų atveju ir gali būti svarbūs jų vystymuisi tam tikromis sąlygomis.

Atlikus genominės bakteriofago VR7 DNR analizę nustatyta, kad 36 šio fago ASR, neturi homologų kitų T4 giminingų fagų genomuose. Iš jų keturi ASR (1 lentelė) koduoja baltymus, kurie yra homologiški įvairiems ne T4 tipo fagų baltymams, o penki ASR – įvairių bakterinių baltymų homologus (2 lentelė).

VR7ORF290c koduojamas baltymas yra 36% tapatus *Myoviridae* šeimos SPO1 tipo virusų atstovo *Staphylococcus* fago G1 HNH nukleazei. Turint omeny, kad fago T4 nukleazės Mob bei I-TevIII taip pat priklauso HNH nukleazių šeimai, o apsikeitimas jomis būdingas visų T4 tipo fagų genomams, galima numanyti, jog VR7ORF290c papildo mobilių fago VR7 nukleazių sąrašą. Likę trys 1 lentelėje paminėti bakteriofago VR7 ASR koduoja hipotetinius baltymus, kurie yra panašūs į *Siphoviridae* ir *Podoviridae* šeimos T7 tipo bakterinių virusų EcoDS1, *Pseudomonas* fago D3 bei *Salmonella* fago 5 nežinomos funkcijos hipotetinių ASR baltymus.

Du bakterinės kilmės fago VR7 ASR iš tiesų yra, ko gero, genetinės rekombinacijos tarp ląstelės šeimininkės genome esančio profago (gal net defektyvaus profago) ir fago VR7 genominės DNR. Visų pirma, ištyrus šių VR7 ASR nukleotidų sudėtį nustatyta, kad VR7ORF003c bei ORF196w G+C nukleotidų santykis panašus absoliučiam šio fago G+C nukleotidų santykiui ir yra atitinkamai 42% ir 45%. Be to, ORF003c

koduojamas baltymas yra homologiškas faginės kilmės bakteriniam baltymui, o gpORF196w homologiškas kolageno tipo trigubos spiralės motyvą turinčiam bakterinės kilmės baltymui, tačiau būtent tokio tipo baltymai neretai yra ir *Siphoviridae* šeimos fagų struktūriniai baltymai (pvz. *Mycobacterium* fago Pukovnik gp7).

**1 lentelė.** Bakteriofago VR7 ASR artimiausi ne T4 tipo fagų homologai

VR7 ASR	Artimiausias homologas (sekos ilgis ar)	Organizmas	Homologinio baltymo funkcija	Identiškos ar /panašios ar (persid. segmento ilgis ar)	E įvertis
ORF006c (231)	Gp13.5 (133)	<i>Enterobacteria</i> fagas EcoDS1	Hipotetinis baltymas	45/66 (131)	3.5e-11
ORF135c (216)	ORF78 (210)	<i>Pseudomonas</i> fagas D3	Hipotetinis baltymas	54/87 (147)	2.1e-22
ORF137c (55)	ORF trn 2.19.-1 (55)	<i>Salmonella</i> fagas 5	Hipotetinis baltymas	27/33(57)	0.25
ORF290c (163)	ORF058 (211)	<i>Staphylococcus</i> fagas G1	HNH nukleazė	55/81 (150)	3.0e-21

Prisiminus, kad fago VR7 genomineje DNR yra ir keli *Siphoviridae* šeimos fagų ASR homologai, *ORF196w* galėtų būti dar vienas jų. Įdomu tai, kad šis VR7 ASR, kaip jau buvo minėta skyriuje 3.2.1., yra aptiktas struktūrinių fago genų klasteryje, šalia geno *hocw*. Galima prielaida, kad abu šie ASR yra to paties genetinių mainų atvejo pasekmė.

Kitų 2 lentelėje išvardintų VR7 ASR G+C nukleotidų santykis taip pat neviršija absoliutaus vidurkio (40.3%), o ORF109c atveju, net yra ženkliai mažesnis – tik 32%. ORF109c koduojamas hipotetinis baltymas yra 38% aminorūgščių sekos tapatus *Chitinophaga pinensis* LuxR šeimos transkripcijos faktoriui. Kaip matyti 2 lentelėje, abu minėtus baltymus sieja nedidelis identiškų ir panašių aminorūgščių kiekis, be to E koeficiento vertė rodo, kad šis panašumas nėra itin patikimas. Galima prielaida, kad ORF109c iš tiesų yra tik

fagai VR7 specifinis genas (o gal tai net baltymo nekoduojanti DNR seka). Kita vertus, tiriant bakteriofago VR7 fiziologines ypatybes buvo pastebėta, kad šis fagas vystosi stacionarios fazės *E. coli* ląstelėse (OD<sub>600</sub> 4.0), o fagas T4 tokiose ląstelėse nesivysto.

**2 lentelė.** Bakteriniai fago VR7 ASR homologai

VR7 ASR	Artimiausias homologas (sekos ilgis ar)	Organizmas	Homologinio baltymo funkcija	Identiškos ar /panašios ar (persid. segmento ilgis ar)	E įvertis
ORF003c (99)	Avi_1970 (425)	<i>Agrobacterium vitis</i>	Didysis kapsidės tipo baltymas	25/38 (77)	0.14
ORF023c (77)	OTBS_1247 (rpoH) (299)	<i>Orientia tsusugamushi</i>	RNR polimerazės faktorius sigma 32	27/41(79)	0.43
ORF109c (72)	Cpin_4278 (213)	<i>Chitinophaga pinensis</i>	LuxR šeimos transkripcijos faktorius	13/18(34)	0.021
ORF147c (141)	RPC_1770 (522)	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	Citidinu/ deoksycitidilat deaminazė	33/57 (117)	2.0e-05
ORF196w (427)	BCE_G9241_4821 (1300)	<i>Bacillus cereus</i>	Kolageno tipo baltymas	109/132 (284)	4.2e-36

Yra žinoma, kad stacionarios fazės ląstelėse vystosi T7 tipo fagai, kurių genomineje DNR koduojama faginė RNR polimerazė. Bakteriofago VR7 genome RNR polimerazė nekoduojama, tačiau gpORF109c bei gpORF023c yra su transkripcija susijusių bakterinių baltymų homologai. Tokiu būdu, jei šie ASR koduoja veiksnius baltymus, gali būti, kad tai yra su ląstelės šeiminkės RNR polimerazės kompleksu sąveikaujantys baltymai, kurių dėka VR7 gali vystytis stacionarios fazės ląstelėse. Tačiau tam, kad šią prielaidą patvirtinti arba paneigti, reikalingi papildomi tyrimai.



### 3.3. Fago VR7 genų raiškos tyrimas

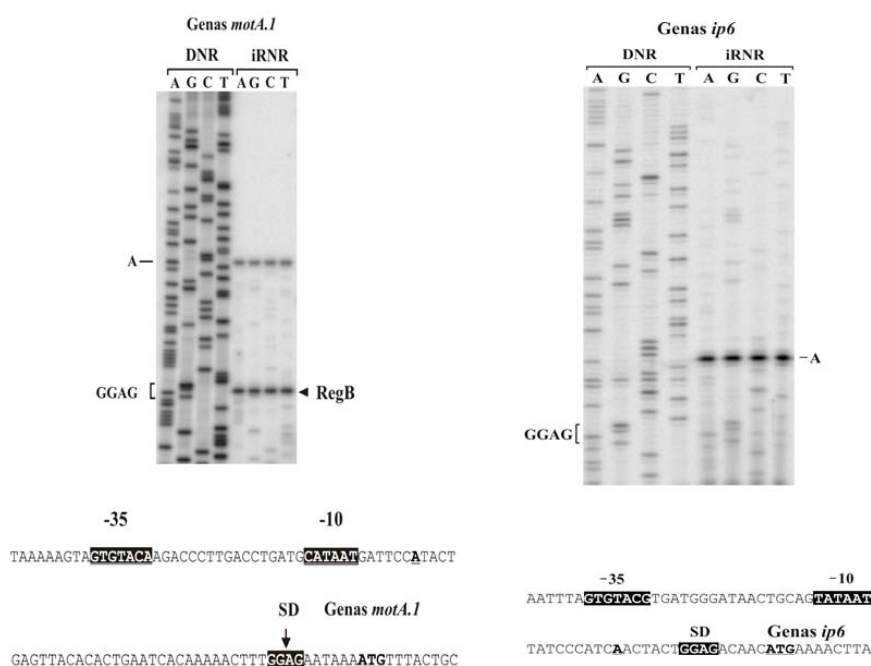
T4 giminingų bakteriofagų genų raiškos reguliacija laike vykdoma transkripcijos nuo skirtingų klasių promotorių aktyvavimo bei laipsniško ląstelės šeimininkės RNR polimerazės modifikavimo keliu. Tiriant fago VR7 genų raiškos reguliacijos ypatumus buvo vykdoma promotorinių sekų genominiame DNR paieška, o taip pat genų, koduojančių svarbius fago T4 transkripcijos proceso baltymus, analogų paieška bei jų koduojamų baltymų pirminės struktūros palyginamoji analizė. Bakteriofago VR7 promotorinių sekų paieškos metu buvo vadovaujama sekančiais kriterijais: *E. coli* bei fago T4 promotorių konservatyvios sritys, atstumas tarp šių sričių, promotoriaus pozicija genominiame DNR. Fago VR7 promotorių padėtys nurodytos 1 priedo lentelėje.

#### 3.3.1. Ankstyvosios transkripcijos reguliacija

Ankstyvieji bakteriofago T4 promotoriai ( $P_E$ ) turi: GTTTAC(a/t)tt -35 srityje bei Ta(t/c)(a/t)AT -10 srityje esančias konservatyvias sekas ir GTG motyvą, esantį -16 – -14 padėtyse. Be to, stiprūs T4 promotoriai -52 ir -42 padėtyse taip pat turi sekas, primenančias *E. coli* promotorių UP elementus. (Keilty ir Rosenberg, 1987; Wilkens ir Rüger, 1996).

Bakteriofago VR7 genomines DNR analizės metu buvo aptikti 43 hipotetiniai ankstyvieji promotoriai ( $P_E$ ). Net trisdešimt penkių  $P_E$  nukleotidų seka -34 pozicijoje (T→G) ir/arba -12 pozicijoje (T→C) skiriasi nuo fago T4 ankstyvųjų promotorių tipinės sekos. Siekiant išaiškinti ar tokios sudėties fago VR7 reguliacinės sekos apskritai yra transkripciškai aktyvios, buvo patikrintas labiausiai nuo T4  $P_E$  besiskiriančių, trijų VR7 ankstyvųjų promotorių –  $P_{E24.3}$ ,  $P_{EmotA.1}$  bei  $P_{Eip6}$  – aktyvumas sistemoje *in vivo*. Fago T4 atveju, genas 24.3 yra nurašomas nuo viduriniojo promotoriaus, tuo tarpu VR7 geno 24.3 5'-galinėje dalyje, vietoje viduriniojo promotoriaus, rastas klasikinis fago T4 ankstyvasis  $P_{E24.3}$ . Šiuo atveju daug įdomiau yra tai, kad genas 24.3 aptiktas visų tirtų T-lyginių fagų bei pseudo-T-lyginio fago RB49 genominiame DNR (Nolan ir kiti, 2006). Gali būti, kad šio ASR koduojamas nežinomos funkcijos

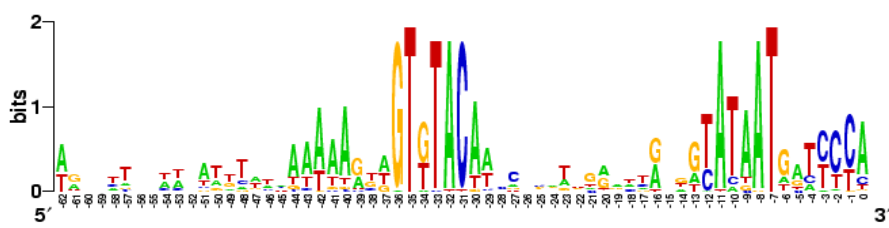
hipotetinis baltymas yra svarbus kolifagų vystymuisi gamtoje. Fago VR7 P<sub>Eip6</sub> bei P<sub>E</sub>motA.1 buvo pasirinkti tyrimui dėl T4 anktyviesiems promotoriams nebūdingų G ir C nukleotidų –34 ir –12 padėtyse, o taip pat, VR7 P<sub>Eip6</sub> atveju, G nukleotido –30 padėtyje (28 pav.). Tyrimui buvo naudojama bendroji iRNR, išskirta iš fagu VR7 infekuotų *E. coli* B<sup>E</sup> kamieno ląstelių, trečią infekcinės stadijos minutę. Nustatyta, kad tirtos hipotetinės VR7 P<sub>E</sub> sekos sistemoje *in vivo* aktyvuoja ankstyvųjų bakteriofago VR7 transkriptų sintezę.



**28 pav. Fago VR7 genų *motA.1* bei *ip6* iRNR nukleotidų sekos nustatymas Sengerio dideoksiterminacijos metodu, panaudojant PMV atvirkštinę transkriptazę.** Viršuje pažymėti nukleotidų takeliai. Kairėje pusėje brūkšniu pažymėti inicijacijos kodonai ir SD seka, skaldoma endonukleazės RegB. Apačioje pateikta genomo srities prieš tirtą geną seka bei paryškintos ankstyvojo promotoriaus konservatyvios sritys

Palyginus trijų tirtų bei dar 40 potencialių ankstyvųjų promotorių nukleotidų sekas, gauta bakteriofago VR7 P<sub>E</sub> tipinė seka, kurios –35 bei –10 sričių padėtyse –34, –12, –10, –9 bei –8 skiriasi nuo atitinkamų fago T4 P<sub>E</sub> padėčių (29 pav.). Be to, ankstyvųjų promotorių –40 srityje esantis UP elementas, kuris, kartu su –33T, yra ypač svarbus ribozilintai RNR polimerazei inicijuojant transkripciją nuo ankstyvųjų fago T4 promotorių (Sommer ir kiti,

2000), fago VR7  $P_E$  atveju yra labiau konservatyvus, nei T4  $P_E$ . Dėl šios priežasties galima teigti, kad dauguma VR7 ankstyvųjų promotorių yra ypač stiprūs faginiai promotoriai su sąlyga, kad šio fago genome yra koduojama aktyvi ADF-riboziltransferazė.



**29 pav. Ankstyvųjų bakteriofago VR7 promotorių tipinė seka sudaryta palyginus trijų tirtų bei 38 potencialių ankstyvųjų promotorių nukleotidų seką.**

Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgos skyriuje 1.3.1.1., bakteriofago T4 ankstyvosios transkripcijos etapo metu, ląstelės šeimininkės RNR polimerazės  $\alpha$  subvienetas yra modifikuojamas fago koduojamą AD F-riboziltransferazių. Bakteriofago T4 genome yra koduojamos trys Mono-ADF-riboziltransferazės Alt, ModA bei ModB. *E.coli* RNR polimerazė yra modifikuojama Alt ir ModA: gpAlt ribozilina tik vieną iš dviejų RNR polimerazės  $\alpha$  subvienetų, dėl ko transkripcijos nuo ankstyvųjų fago promotorių efektyvumas padėja net du kartus. Vėliau gpModA ADF-ribozilina RNR polimerazės abu  $\alpha$  subvienetus ir ankstyvoji transkriptų sintezė yra trikdama (Rohrer, 1975; Koch ir kiti, 1995; Tiemann ir kiti, 1999; Sommer ir kiti, 2000). Tuo tarpu T4 ADF-riboziltransferazė ModB ADP-ribozilina *E.coli* ribosomos 30S baltymą S1 bei translacijos elongacijos veiksnį EF-Tu, dėl ko yra trikdama *E.coli* iRNR translacija, o fago T4 iRNR translacijos efektyvumas padidinamas (Depping ir kiti, 2005). Reikia pasakyti, kad fago T4 ADF-riboziltransferazės yra linkę agreguoti su kitais baltymais, o jų vykdoma ribozilinimo reakcija itin dideliu substratiniu specifiskumu nepasizymi (Tiemann ir kiti, 1999). Be to, kiekviena fago T4 riboziltransferazė be jau paminėtų, modifikuoja dar po kelis *E. coli* baltymus (Alt ~27, ModA ~5, ModB ~8), tame tarpe ir visus RNRP subvienetus (Depping ir kiti, 2005).

Fago VR7 genomineje DNR aptikti visas tris mono-ADP-riboziltransferazes koduojantys genai *alt*, *modA* ir *modB*. VR7 gpAlt, gpModA bei gpModB amino rūgščių sekos tapatumas atitinkamiems fago T4 baltymams yra 35%, 32% bei 31% identiškų ar. Nepaisant ženklių pirminės struktūros skirtumų, fago VR7 Alt amino rūgščių sekoje aptikti mono-ADP-riboziltransferazių šeimos baltymų katalitiniam aktyvumui svarbūs (Domenighini ir kiti, 1994; Domenighini ir Rappuoli, 1996) W-R bei Glu-X-Glu motyvai, o taip pat Arg (toje pačioje pozicijoje kaip T4 Alt), kuris, yra atsakingas už teisingą NAD<sup>+</sup> orientavimą bei kitos Alt baltymo aktyvumui svarbios aminorūgštys.

Tuo tarpu, VR7 ModA bei ModB atvejais labiau kompliktuotas. Kaip matyti X pav., fago VR7 abu aukščiau paminėti, ADF-riboziltransferazių aktyvumui svarbūs, aminorūgščių sekos motyvai bei motyvas X-R yra ir abiejų VR7 Mod baltymų atveju. Tačiau, atlikus kryptingą fago T4 *modA* bei *modB* mutagenezę nustatyta, kad šių genų koduojamų baltymų aktyvumui taip pat yra svarbus arom-X-arom motyvas bei aukščiau jo esantis serinas, o ModB atveju, dar ir galinio IP motyvo izoleucinas. Fago VR7 MotA baltymo atveju, šios svarbios aminorūgštys yra nepakitę, tačiau ModB serinas yra pakeistas alaninu,

```

T4_ModB      -MIINLADVEQLSIKAESVDFQYDMYKKVCEK-FTDFEQSVLWQCMEAKKNEALHKKHLE 58
VR7_ModA     MLYTDDVLNGIIDTAASSEFRDQCQAEIDAL-YTDNEQSVLWQCMEAKKNEALHKKHLE 58
T4_ModA      -MKYSVMQLKDFKIKSMDASVRASIREELLSEGFNLSEIELLIHCITNKP--DDHSLWNE 57
VR7_ModB     -----MNIKSDTEPNQLK-----FSEMEIASLFECRTSKVDKTLHNSVNS 41
              .. : ..: ..: ..: * * * * * .. ..

T4_ModB      I IKKHLTKSP-YQRYRIGISKSTKELIKDLQ-VGEVFNTRVDSFTTSLHTACSFS-YAEY 115
VR7_ModA     I IRNNLNTEPHAALRFRIGISKKTMEHLEDLRYVGATIEFNRMVMSFSRDWQVARNEFASYSFY 118
T4_ModA      I IKSRLVPND-KPLWRRGVPAETKQVLNQGII--DIITFDKVVVSASYDKNIALHFASGLE 113
VR7_ModB     I IKSRLSVPD-TVLWRRGVTQQEIDLLEAKESMQPFEGFRITSFTEGYGIARDFA-AMEY 99
              **:.** *:*:*:. : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *

T4_ModB      FTRITILRLK-TDKAFNYSDHISDIISSPNTEFKYTYEDTDGLDSERTDNLMMIVRQEW 174
VR7_ModA     GTRNIFCINNAPYAYNYQEAIRFKMICGAPPEEFGAYPEAT----RKSNHLVNDEDEF 173
T4_ModA      NTQVIFEFK-APMVFNQEYAIKALR-CKEYNPNKFPDSH----RYRNMELVSDEQEV 166
VR7_ModB     VTRRITIVRLN-QTEAFCYHDAMRKLALDVPLKFFNTASGSKQEEATLRREYMDMIDSELEW 158
              * . * . : : . : : : . : . : . * : : : * *

T4_ModB      MTEIGK----- 180
VR7_ModA     MFEAGTFLRVDLIETHPLNNLYTVWHLTVLN--- 204
T4_ModA      MIEAGSVFRIADRYEYKKCSTYTIYTLDFEGFNL 200
VR7_ModB     FVEVDQKFVIVDAGFVGDYVLVLCVQEQ----- 186
              : . * .

```

30 pav. Bakteriofagų VR7 bei T4 Mono-ADP-riboziltransferazių Mod aminorūgščių sekos palyginimas. Raudonai pažymėtos kryptingos mutagenezės būdu keistos (X→A) fago T4 ModB aminorūgštys.

o IP motyvo izoleucinas – valinu. Kryptingos ModB mutagenezės metu visos 30 pav. raudonai pažymėtos aminorūgštys buvo keičiamos alaninu, po ko paaiškėjo, kad pakaita S→A, kuri T4 ModA atveju sąlygojo ženklų baltymo aktyvumo sumažėjimą, ModB aktyvumui jokios įtakos neturėjo. Tuo tarpu, pakeitus izoleuciną, ModB tapo visiškai neaktyvus. Šie duomenys rodo, kad ADP-riboziltransferazių Mod aktyvumui įtakos turi ne tik aukščiau minėti visoms Mono-ADP-riboziltransferazėms svarbūs motyvai, bet ir pavienės aminorūgštys. Todėl šiame tyrimų etape yra gan sudėtinga nuspėti ar abi fago VR7 Mono-ADP riboziltransferazės Mod yra aktyvūs baltymų modifikatoriai. Taip pat, nepaisant to, kad VR7 ModA bei ModB koduojantys genai buvo pavadinti remiantis šių genų tarpusavio padėtimi atitinkamame fago T4 DNR segmente, drąsiai teigti, jog VR7 ModA yra ankstyvosios transkripcijos terminacijos baltymas, o ne ląstelės šeiminkės transliaciją trikdantis ModB, šiame tyrimų etape negalima.

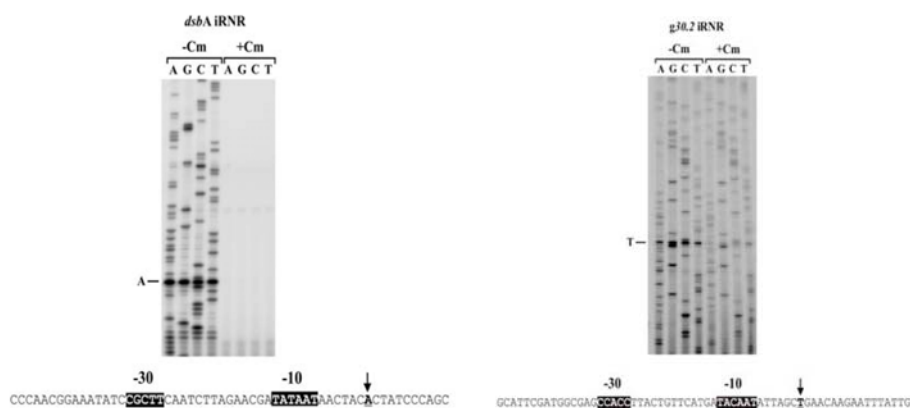
### 3.3.2. Vidurinėsios transkripcijos etapas

Fago T4 viduriniai promotoriai –10 srityje turi *E. coli*  $\sigma^{70}$  promotoriams būdingą konservatyvią seką TAnnnT, bei specifinę seką –30 srityje, (a/t)(a/t)TGCTT(c/t)A, kurią atpažįsta šių promotorių aktyvatorius, fago T4 ankstyvasis baltymas MotA. Tačiau, iš 58 nustatytų fago T4 viduriniųjų promotorių, trisdešimties MotA atpažinimo seka skiriasi nuo tipinės –30 srities sekos. Nepaisant to, nustatyta, kad visi T4 PM yra priklausomi nuo vidurinėsios transkripcijos aktyvatoriaus MotA bei koaktyvatoriaus AsiA (Brody ir kiti, 1983; Guild ir kiti, 1988; Truncaite ir kiti, 2003; Stoškiene ir kiti, 2007).

Fago T4 viduriniųjų genų transkripcijos priklausomybė nuo MotA tiriama naudojant fagų T4 *motA*<sup>+</sup> ir T4 *motA*<sup>-</sup> sistemą. T4 *motA*<sup>+</sup> turi *amber* mutacijas genuose 33, 45 ir 55, kurių produktai yra būtini transkripcijai nuo vėlyvųjų promotorių (Williams ir kiti, 1994), todėl šio fago infekcijos metu nesintetinami vėlyvieji transkriptai, kas palengvina viduriniųjų transkriptų analizę. Tuo tarpu fagas T4 *motA*<sup>-</sup> be minėtų *amber* mutacijų genuose 33, 45 ir

55 dar turi mutaciją tsG1 gene *motA*, kuri sąlygoja baltymo MotA jautrumą temperatūrai. Taigi, šio fago infekcijos metu, 42°C temperatūroje, MotA yra inaktyvuojamas, todėl sutrikdomi ne tik vėlyvosios, bet ir vidurinėsios transkripcijos etapai.

Tiriant bakteriofago VR7 viduriniųjų promotorių aktyvumą, aukščiau aprašyto metodo taikyti neįmanoma, nes nėra sistemos VR7 *motA*<sup>-</sup> fagui sukonstruoti. Dėl šios priežasties buvo pasirinktas kitas metodas – panaudotas baltymų sintezės inhibitorius chloramfenikolis, kurio dėka faginių baltymų sintezė yra blokuojama. Tokiu būdu, nesant vidurinėsios transkripcijos aktyvatorių, tiriant nuo MotA priklausančio promotoriaus aktyvumą, galimas dvejopas vaizdinis rezultatas. Tuo atveju, kai tiriamas pagrindinis konkretų transkriptą inicijuojantis promotorius, šio transkripto bendros iRNR, išskirtos iš ląstelių, kurios augo terpėje su chloramfenikoliu, tarpe nebus (31 pav. A). Tuo tarpu, jei tiriamas transkriptas be viduriniojo promotoriaus yra nurašomas dar ir nuo ankstyvojo promotoriaus, išsidėsčiusio aukščiau už tiriamą P<sub>M</sub>, transkriptą atitinkanti iRNR, išskirta iš ląstelių augusių terpėje su chloramfenikoliu, yra gaunama (31 pav. B). Todėl, vienu metu galima išsiaiškinti du dalykus: fago vidurinėsios transkripcijos etapo priklausomybę nuo paties fago koduojamų baltymų bei tiriamo promotoriaus aktyvumą.

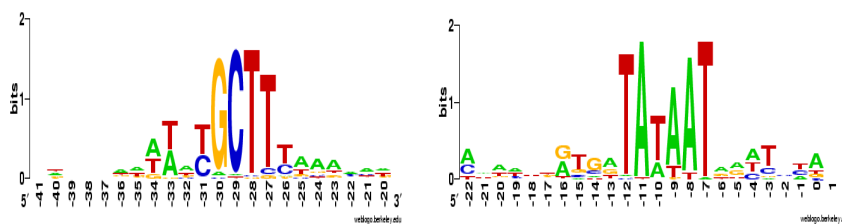


31 pav. Fago VR7 genų *dsbA* (A) ir *g30.2* (B) iRNR nukleotidų sekos nustatymas Sengerio dideoksiterminacijos metodu panaudojant PMV atvirkštinę transkriptazę, naudojant bendrąją iRNR, išskirtą iš *E. coli* BE kamieno ląstelių (augintų terpėje su ir be chloramfenikolio) 6 minutę po infekcijos VR7 fagu. Viršuje pažymėti nukleotidų takeliai. Kairėje pusėje brūkšniu pažymėtas inicijacijos nukleotidas. Apačioje pateikta genomo sritys prieš genus *dsbA* ir *g30.2* nukleotidų sekos bei paryškintos promotoriaus konservatyvios sritys

Ištirus bakteriofago VR7 genomines DNR nukleotidų seką, aptikti 67 potencialūs viduriniai promotoriai. Net trisdešimt devynių hipotetinių VR7 P<sub>M</sub> nukleotidų seką ženkliai skyrėsi, lyginant su fago T4 P<sub>M</sub> tipine seką. Ištirus 40 potencialių VR7 P<sub>M</sub> aktyvumą *in vivo* nustatyta, kad 16 promotorių yra aktyvūs, be to vidurinėsios šio fago transkripcijos etapas yra priklausomas nuo faginių baltymų – aktyvatorių (pvz., 31 paveikslėlyje pateikti P<sub>M</sub>dsbA ir P<sub>M</sub>g30.2).

Tuo tarpu, 24 iš tirtų hipotetinių P<sub>M</sub> *in vivo* buvo transkripciškai neaktyvūs, taigi šios sekos, sudarant bakteriofago VR7 viduriniųjų promotorių tipinę seką, naudojamos nebuvo. Nepaisant to, reikia pasakyti, kad promotorių tyrimai *in vivo* ne visada atitinka tyrimų *in vitro* metu gaunamus rezultatus. Dėl šios priežasties buvo suformuluota prielaida, kad kai kurie promotoriai, kurie tyrimų *in vivo* metu pasirodo beesą neaktyvūs, iš tiesų yra aktyvūs, tik nuo jų sintetiniai itin nestabilūs transkriptai (Guild, 1988; Marshall, 1999; Stoškiene ir kiti, 2007).

Palyginus 17 tirtų bei 26 hipotetinių viduriniųjų promotorių nukleotidų seką, gauta bakteriofago VR7 P<sub>M</sub> tipinė seką. Iš 32 pav. matyti, kad fago VR7 viduriniųjų promotorių, lyginant su fago T4 P<sub>M</sub>, –30 srities –31 – –27 padėtyse esančių nukleotidų ir –10 srities –12 – –8 padėtyse esančių nukleotidų dažnis bei sudėtis skiriasi. Be to, VR7 PM –30 sritis yra prailginta –35 bei –34 padėtyse esančia (a/t)(t/a) seką, o šių promotorių –6 – –3 sritis yra konservatyvesnė.



**32 pav. Bakteriofago VR7 viduriniųjų promotorių tipinė seką sudaryta palyginus 17 tirtų bei 26 hipotetinių viduriniųjų promotorių sekas. Sekos, atitinkančios –30 ir –10 sritis, buvo palygintos nepriklausomai.**

Palyginus bakteriofago VR7 viduriniųjų promotorių tipinę seką su kitų T4 giminingų P<sub>M</sub> tipinėmis sekomis, pateiktomis 11 pav., matyti, kad tiriamo fago P<sub>M</sub> tam tikrose –30 srities pozicijose yra būdingi RB69 bei 44RR2.8t P<sub>M</sub> aptinkami nukleotidai, tačiau bendras bakteriofago VR7 viduriniųjų promotorių tipinės sekos schematinis vaizdas yra gan savitas.

Kaip jau buvo paminėta, bakteriofago T4 vidurinėsios transkripcijos metu itin svarbūs yra du faginiai baltymai: aktyvatorius MotA bei koaktyvatorius AsiA. Tiriant fago VR7 genomine DNR buvo aptikti abu šiuos baltymus koduojančių genų analogai. Nustatyta, kad bakteriofago VR7 geno *motA* koduojamo baltymo aminorūgščių sekos tapatumas fago T4 MotA yra 34%, o homologija RB69 MotA baltymui – 42% (33 pav.).

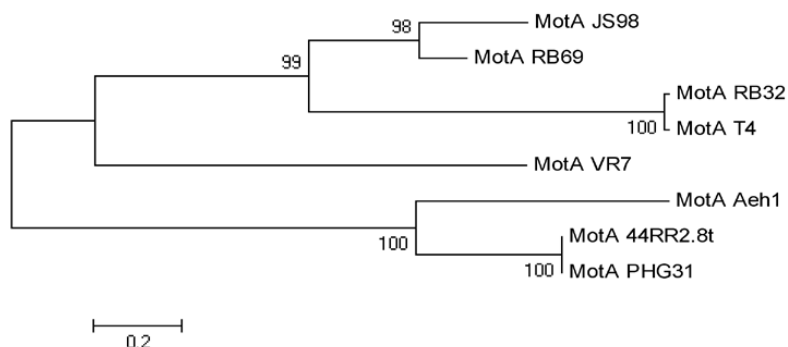
MotA_T4	MSKVTYIIKASNDVINEKTATILITIAKDFITAAEVREVHPDLGNA-VVNSNIGVLIKK	59
MotA_RB69	MSKVTYIIKASENALNEKTAAIMVYIINKNFETAANVREALEAEYNASVVNSNIGVLIKK	60
MotA_VR7	MNKLNYIVKCSQNALNETDVNALVFVYKNNFVRP----EVVLDQQNT-SIDS-VQTLLNN	54
	*.:*:	
MotA_T4	GLVEKSGDGLIITGEAQDIISNAATLYAQENAPPELLKTRKAREITSDMEEDKDLMLK	119
MotA_RB69	GLVEKSGDGLVATGEAMDIIQKADLFAQENAPELLOKRNTRKARGVTFEMHELANFVFE	120
MotA_VR7	NYVEASGDGLMITKGVLDLILDAELWANENNPDLLEVKKTPTKRGVTDMEATAEYIKE	114
	. ** ***** : * : . * : * . * * * : * : * * * : * : * . * : * : * : . : : :	
MotA_T4	LLDKNGFVLKKEIYRSNYLAILEKRTNGIRNFEEINNGNMRIFGYKMEHHIQKFTDIG	179
MotA_RB69	NI-KDKVEVKEIGENRSNLEVRFAKRVLGIQIEIRRDGALRIFAYNMSSETSKLFTSLE	179
MotA_VR7	QLLSIGIDFKSISEDRSNLIVKF-KRVKTLKQIDVRRDQQIRVHAYNTEQKIVKQFTDVG	173
	: . . . * . : . * * * . : * * . : : : : : : * : * : * : : : * * : :	
MotA_T4	MSCKIAKNGN-VYLDIKRSAENIEAVITVASEL	211
MotA_RB69	NDVKIKIGGKYTYIDFPNVSKEIITLVTNVL--	210
MotA_VR7	FSVKVG--GLNTYIDNHMSTENIQHVINILK--	202
	. * : . * . * : * : * : : * : * : : . :	

33 pav. Bakteriofagų T4, RB69 bei VR7 MotA baltymo amino rūgščių sekos palyginimas. „\*“ žymi identiškas amino rūgštis, „:“ – konservatyvias amino rūgštis ir „.” – pusiau konservatyvias aminorūgštis. Brūkšneliu žymima delecija amino rūgščių sekoje.

Pirminė VR7 AsiA struktūra yra 51,1% amino rūgščių identiška abiejų minėtų fagų AsiA baltymui. Bakteriofagų AehI bei KVP40 AsiA baltymai yra atitinkamai 28% bei 27% tapatūs fago T4 geno *asiA* baltymui (Pineda ir kiti, 2004). Tokiu būdu, VR7 AsiA yra anaipol ne tolimiausias T4 AsiA homologas. Tuo tarpu, VR7 *gpmotA* yra labiausiai pakitęs MotA grupės baltymas (34 pav.). Pirminės AsiA baltymų struktūros įtaka aktyvumui buvo tirta Pineda ir bendraautorių (2004). Tuo tarpu MotA panašiu būdu tirtas



nebuvo. Todėl buvo nuspręsta išsiaiškinti ar VR7 MotA yra pajėgus aktyvuoti viduriniųjų fago T4 transkriptų sintezę T4 *motA*<sup>-</sup> infekcijos metu.



**34 pav. MotA baltymo filogenetinis medis sudarytas artimiausių grupių apjungimo būdu.** Palyginti bakteriofago VR7 ir bakteriofagų, kurių genomų sekos deponuotos <http://phage.bioc.tulane.edu> duomenų bazėje, MotA. Šalia atsišakojimų nurodyta procentinė įkėlos sutapimo su tiriamu baltymu išraiška. Mastelis atitinka pakeistų aminorūgščių skaičių, tenkantį vienai pozicijai.

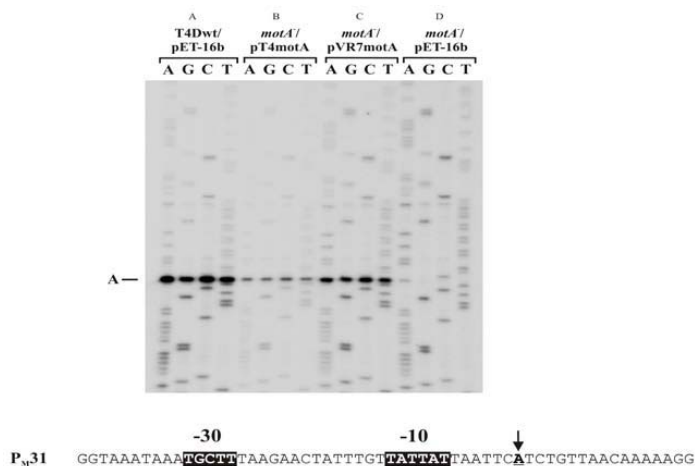
Siekiant ištirti VR7 MotA baltymo pirminės struktūros įtaką jo aktyvumui T4 fago sistemoje *in vivo*, buvo nuspręsta šį baltymą klonuoti. Kadangi geno *motA* koduojamas baltymas yra toksiškas ląstelei šeimininkei, klonavimo darbams buvo naudojama plazmidė pET16b, o klonuoto geno superekspresijai pasirinktas *E. coli* kamienas C41(DE3). Tokios sistemos pasirinkimas pasiteisino fago T4 Mod baltymų, kurie taip pat yra itin toksiški ląstelei, tyrimo metu.

Reikia pasakyti, kad fago VR7 *motA* klonavimą itin apsunkino tai, kad šio geno koduojančioje sekoje yra ankstyvasis promotorius P<sub>E</sub>arn.4. Tiriant ankstyvuosius fago T4 promotorius buvo pastebėta, kad jų neįmanoma klonuoti į standartinius ekspresijos vektorius (Wilkens ir Rüger, 1996). Tačiau, fago VR7 P<sub>E</sub> lig šiol niekada nebuvo klonuoti, todėl genas VR7 *motA* buvo padaugintas PGR būdu bei klonuotas į pET16b ekspresijos vektorių. Įdomu tai, kad po transformacijos tebuvo gauta vienintelė *E. coli* ląstelių kolonija, o išskyrus rekombinantinę plazmidinę DNR bei nustačius klonuoto fragmento seką, buvo aptikta mutacija T→C ankstyvojo promotoriaus -35 srityje (GTTTACA→GTCTACA), keičianti *motA* koduojamo baltymo aminorūgštį

F→S. Kadangi buvo nuspręsta, jog tai dar ne pakankamas įrodymas, kad ir VR7 P<sub>E</sub> neįmanoma klonuoti į pET sistemos vektorius, buvo atlikta kryptinga VR7 *motA* mutagenezė, atstatanti pakeistą fenilalaniną. Tačiau, ląstelės, transformuotos tokia plazmide, neišgyvendavo ir kolonijų neformavo. Tokiu būdu išsiaiškinta, kad šio fago ankstyvųjų promotorių aktyvumui pakaita – 34T→C yra kritinė.

Sekančiu etapu buvo atlikta kryptinga klonuoto *motA* mutagenezė, atstatant mutuoatą aminorūgštį bei pakeičiant ankstyvojo promotoriaus –10 srities seką (TAAAGT → G AAG GT) taip, kad pirminė VR7 MotA struktūra (Val (GTT), Lys (AAA)) nepakistų.

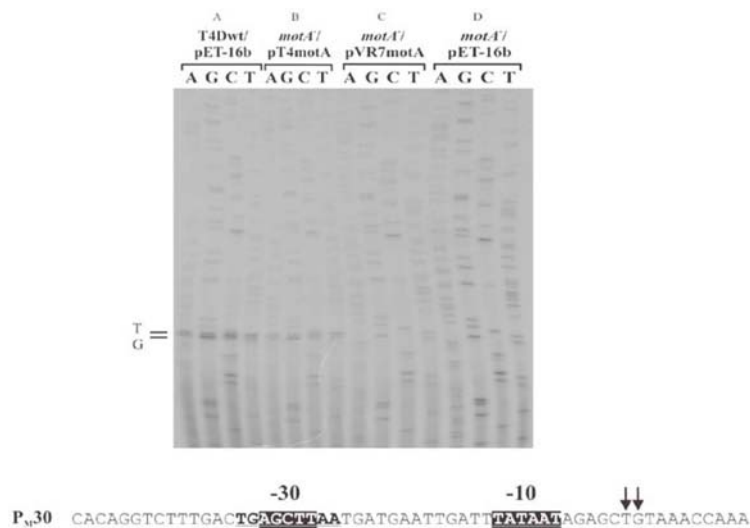
Mutavus P<sub>E</sub>, fago VR7 genas *motA* buvo klonuotas. Tuomet buvo patikrintas šio baltymo gebėjimas kompensuoti *motA* deleciją fago T4 *motA*Δ vystymosi metu bei atliktas funkcijos komplementacijos tyrimas fago T4 sistemoje *in vivo*. Tyrimui buvo naudota bendroji iRNR, išskirta iš fagais T4 D<sup>+</sup> ir T4 *motA*<sup>-</sup> 30°C temperatūroje infekuotų *E. coli* B<sup>E</sup> kamieno ląstelių, transformuotų klonuotą geną turinčia plazmide.



35 pav. Bakteriofago VR7 MotA funkcijos komplementacijos tyrimas fago T4*motA*<sup>-</sup> sistemoje nuo T4 P<sub>Mg31</sub> *in vivo*.

Klonuoto *motA* koduojamo baltymo komplementacijos tyrimo *in vivo* metu nustatyta, kad VR7 MotA kompensuoja *motA* deleciją T4 *motA*Δ

vystymosi metu bei aktyvuoja transkripciją nuo fago T4 viduriniojo promotoriaus P<sub>M</sub>31, fagu T4 *motA*<sup>-</sup> infekuotose ląstelėse. Kaip matyti pateiktame 35 paveikslėlyje, T4 P<sub>M</sub>g31 yra idealus fago T4 vidurinis promotorius. Todėl buvo nuspręsta patikrinti VR7 MotA gebėjimą aktyvuoti tokius T4 P<sub>M</sub>, kurių -30 sritis, lyginant su tipine fago viduriniųjų promotorių seka, yra ganėtinai pakitusi be to, tokios MotA atpažinimo sekos VR7 P<sub>M</sub> tarpe, nėra. Tuo tikslu buvo pasirinktas T4 P<sub>M</sub>g30 ir nustatyta, kad VR7 MotA nevykdo transkripcijos nuo fago T4 viduriniojo promotoriaus esančio prieš ligazės geną *g30* (36 pav.).



36 pav. Bakteriofago VR7 MotA funkcinės komplementacijos tyrimas fago T4*motA*<sup>-</sup> sistemoje nuo T4 P<sub>M</sub>g30 *in vivo*.

Reikia paminėti, kad be *g30* viduriniojo promotoriaus aktyvacijos, buvo vykdomi dar ir prieš *nrdA* geną esančių viduriniųjų promotorių aktyvacijos komplementacijos tyrimai (rezultatai nepateikiami). Buvo pastebėta, kad ir šios fago T4 genomo srities promotorių aktyvacija VR7 MotA baltymu skiriasi nuo T4 MotA.

Minėtų tyrimų rezultatai byloja, kad aptikti skirtumai bakteriofago VR7 MotA amino rūgščių sekoje, lyginant su fago T4 MotA, sąlygoja ne tik baltymo pirminės struktūros, bet ir funkcinis šių abiejų baltymų skirtumas –

nepaisant to, kad VR7 MotA atstato T4 motA<sup>-</sup> gyvybingumą, vidurinieji fago T4 promotoriai su itin nuo tipinės P<sub>M</sub> sekos besiskiriančiomis –30 sritimis, VR7 MotA nėra aktyvuojami. Įdomu tai, kad VR7 MotA neaktyvuoja –31 padėtyje A nukleotidą turinčius fago T4 P<sub>M</sub>. Viduriniųjų VR7 promotorių paieškos metu buvo aptikti du –31 padėtyje A nukleotidą turintys potencialūs P<sub>M</sub>, tačiau abu jie pasirodė beesą neaktyvūs. Gali būti, kad fago VR7 vidurinėsios transkripcijos aktyvatorius MotA neatpažįsta –31 padėtyje A nukleotidą turinčių promotorių.

Fago T4 baltymas MotA turi du 10 kDa domenų, atskirtus lanksčia jungtimi (Finnin ir kiti, 1994, 1997). MotA C-galinis domenas sąveikauja su promotoriaus MotA seka, o N-galinis domenas su  $\sigma^{70}$  C-galinio domeno tolimesniaja 4 sritimi. (Schmidt ir kiti, 1992; Gerber ir kiti, 1996; Pande ir kiti, 2002). Remiantis minėtais duomenimis, buvo suformuluota prielaida, jog būtent VR7 MotA C galinio domeno struktūra įtakoja šio baltymo aktyvumo T4motA<sup>-</sup> sistemoje pobūdį.

Kaip jau buvo minėta, bakteriofago T4 baltymas MotA yra itin toksiškas *E. coli* ląstelėms. Vyrauja nuomonė, kad T4 MotA toksiškumas susijęs su šio baltymo savybe blokuoti ląstelės šeimininkės DNR, o, kaip minėta, už sąveiką su DNR, yra atsakingas MotA-C. Todėl, buvo suformuluota prielaida, kad VR7 MotA, kurio C-galinio domeno struktūra bei, galbūt, sąveikos su DNR pobūdis skiriasi, lyginant su T4 MotA, gali būti mažiau toksiškas *E. coli*. Taigi, buvo nuspręsta palyginti fagų VR7 bei T4 MotA toksiškumą. Tuo tikslu, *E. coli* kamienų BL21(DE3) ir C41(DE3) ląstelės buvo transformuotos plazmide pET-16b, turinčia T4 *motA* arba VR7 *motA* genus, o toksiškumo tyrimo metu buvo stebima, kaip tiriamų baltymų indukcija įtakoja ląstelės-šeimininkės gyvybingumą, lyginant su ląstelėmis, augintomis neindukcinėmis sąlygomis. Toksiškumo įvertinimui pasirinkta (+/-) sistema, rezultatai pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. gyvybingumas *E. coli* ląstelių, turinčių pET/T4*motA* bei pET/VR7*motA* plazmidės.

<i>E. coli</i> C41(DE3)					
	0,01 mM IPTG	0,05 mM IPTG	0,1 mM IPTG	0.5 mM IPTG	1 mM IPTG
T4 MotA	+	–	–	–	–
VR7 MotA	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> BL21(DE3)					
	0,01 mM IPTG	0,05 mM IPTG	0,1 mM IPTG	0.5 mM IPTG	1 mM IPTG
T4 MotA	++	–	–	–	–
VR7 MotA	+	+	++	+++	

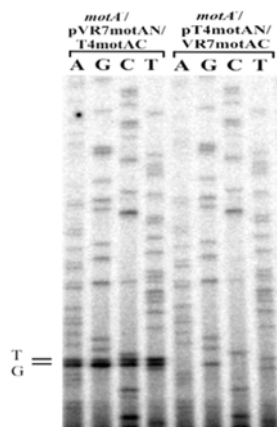
(++) - kolonijų, išaugusių ant agarizuotos terpės su IPTG, dydis mažesnis nei kolonijų, išaugusių ant agarizuotos terpės be IPTG;

(+++)- kolonijų, išaugusių ant agarizuotos terpės su IPTG, dydis daug mažesnis nei kolonijų, išaugusių ant agarizuotos terpės be IPTG

(-) – ląstelių kolonijos ant agarizuotos terpės su IPTG neužaugo.

Kaip matyti iš pateiktų toksiškumo tyrimo rezultatų, bakteriofago VR7 MotA yra ženkliai mažiau kenksmingas ląstelei šeimininkei, nei fago T4 MotA. Todėl, buvo suformuluota prielaida, jog būtent fago VR7 MotA C galinio domeno struktūra įtakoja tiek šio baltymo toksiškumo tyrimo rezultatus, tiek ir jo aktyvumo T4*motA*<sup>-</sup> sistemoje pobūdį. Siekiant iširti šią prielaidą, buvo sukonstruoti chimeriniai MotA baltymai t.y. T4MotA N-galinis domenas sulietas su VR7 MotA C-galiniu domenu bei atvirkščiai – VR7 MotA N-galinis domenas sulietas su T4 MotA C-galiniu domenu, didžiausios homologijos lanksčiosios šių baltymų jungties vietoje (T4 – RATRKARE, VR7 – KKTRTKRG).

Visų pirma, buvo patikrintas chimerinių baltymų gebėjimas kompensuoti geno *motA* deleciją T4 *motA*Δ vystymosi metu. Gavus teigiamus tyrimo rezultatus abiejų baltymų atveju, buvo atliktas funkcinės komplementacijos fago T4*motA*<sup>-</sup> sistemoje *in vivo* tyrimas (37 pav.). Šio tyrimo metu nustatyta, kad VR7N\_T4C\_MotA baltymas vykdo transkripcijos nuo T4 P<sub>Mg30</sub> aktyvaciją, tuo tarpu baltymas T4N\_VR7C\_MotA – ne.



P<sub>M</sub>30 CACAGGTCCTTGACTGAGCTTAAATGATGAATTGATTATATAATAGAGCTGTAAACCAA

37 pav. Chimerinių baltymų VR7N\_T4C\_MotA ir T4N\_VR7C\_MotA komplementacijos tyrimas fago T4motA<sup>-</sup> sistemoje *in vivo*.

Tuo tarpu, ištyrus „chimerinių“ MotA baltymų toksiškumą nustatyta, kad tiek VR7N\_T4C\_MotA, tiek ir T4N\_VR7C\_MotA yra tik nežymiai mažiau toksiški ląstelei šeimininkei, lyginant su laukinio tipo T4 MotA (4 lentelė).

4 lentelė. Gyvybingumas *E. coli* ląstelių, turinčių pET/T4motAN\_VR7motAC bei pET/VR7motAN\_T4motAC plazmidės.

	<i>E. coli</i> C41(DE3)				
	0,01 mM IPTG	0,05 mM IPTG	0,1 mM IPTG	0,5 mM IPTG	1 mM IPTG
<b>T4MotAN_VR7MotAC</b>	+	+	++	-	-
<b>VR7MotAN_T4MotAC</b>	+	+	++	-	-

(++) - kolonijų, išaugusių ant agarizuotos terpės su IPTG, dydis mažesnis nei kolonijų, išaugusių ant agarizuotos terpės be IPTG;  
 (-) – ląstelių kolonijos ant agarizuotos terpės su IPTG neužaugo.

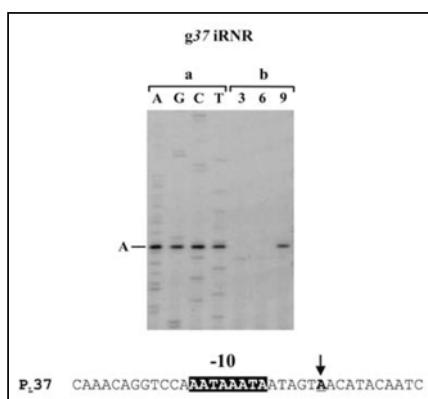
Apibendrinus VR7 MotA bei P<sub>M</sub> tyrimo rezultatus galima padaryti sekančias išvadas: bakteriofago VR7 MotA aktyvuoja transkripciją nuo VR7 P<sub>M</sub>, kurių tipinė seka skiriasi nuo tipinės T4 P<sub>M</sub> sekos. Be to, šis baltymas kompensuoja geno *motA* deleciją T4 *motA*Δ vystymosi metu, tačiau

neaktyvuoja tą T4 P<sub>M</sub>, kurių MotA atpažinimo seka itin pakitusi. Visi minėti procesai, veikiausiai, sąlygojami VR7 MotA C-galinio domeno struktūros ypatybių, tačiau mažesni už T4 MotA toksiškumą apsprendžia ne C-galinis VR7 MotA domenas.

### 3.3.3. Vėlyvųjų transkriptų sintezės reguliacija

Vienintelis fago T4 vėlyvųjų klasės promotorių konservatyvus motyvas –10 srityje būdinga TATAAATA seka. Šiai dienai yra žinomas arba teoriškai numatytas 41 T4 P<sub>L</sub> (Brody ir kiti, 1995; Williams ir kiti, 1994). Bakteriofago VR7 genomines DNR analizės metu buvo aptikti 46 hipotetiniai fago VR7 vėlyvieji promotoriai. Dešimties jų sekos, lyginant su fago T4 P<sub>L</sub> tipine seka, –13 padėtyje (38 pav.) ir/arba –12 padėtyje yra pakitę, o aktyvumo tyrimai buvo atlikti dviejų fago VR7 P<sub>L</sub> atveju. Tyrimui buvo naudojama bendroji iRNR, išskirta 3', 6', 9' ir 15' iš fagu VR7 30°C temperatūroje, infekuotų *E. coli* B<sup>E</sup> kamieno ląstelių.

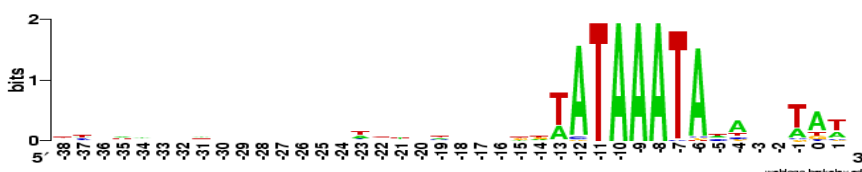
Vienas iš tirtų hipotetinių fago VR7 P<sub>L</sub> yra transkripciškai aktyvus vėlyvasis promotorius, tuo tarpu sekos P<sub>L</sub>g67 aktyvumo sistemoje *in vivo* nenustatyta.



38 pav. Fago VR7 geno 37 iRNR nukleotidų sekos nustatymas Sengerio dideoksiterminacijos metodu, panaudojant PMV atvirkštinę transkriptazę bei bendrąją iRNR, išskirtą iš *E. coli* BE kamieno ląstelių įvairiu laiku po infekcijos VR7 fagu. Viršuje pažymėti nukleotidų takeliai bei RNR skyrimo laikas (minutės po infekcijos). Kairėje pusėje brūkšniu pažymėtas g37 inicijacijos kodonas. Apačioje pateikta genomo srities prieš geną 37 seka bei paryškintos promotoriaus konservatyvios sritys.

Palyginus hipotetinių bei tirtų P<sub>L</sub> nukleotidų sekas, sudaryta tipinė bakteriofago VR7 vėlyvųjų promotorių seka. Kaip matyti 38 pav., fago VR7 P<sub>L</sub>, lyginant su T4 vėlyvais promotoriais, –10 srities pozicijose –12, –10, –9, –

7 bei –6 esančių nukleotidų dažnis skiriasi. Bakteriofago VR7 vėlyvųjų promotorių tarpe, centrinė –10 srities seka TAAAT yra konservatyvesnė, nei fago T4 P<sub>L</sub>.



**39 pav. Bakteriofago VR7 vėlyvųjų promotorių tipinė seka sudaryta palyginus 44 promotorių sekas.**

Penki bakteriofago T4 baltymai įtakoja vėlyvųjų transkriptų sintezės etapą. Gp55 ir gp33 pakeičia *E. coli* RNR polimerazės  $\sigma^{70}$ , o gp45 (kurio užnėrimui ant DNR reikalingas gp44/gp62 baltymų kompleksas) yra vėlyvosios transkripcijos aktyvatorius. Bakteriofago VR7 genomines DNR analizės metu buvo aptikti visų minėtų baltymų analogus koduojantys genai. Genų 55, 33, 45, 44 ir 46 koduojamų baltymų pirminės struktūros tapatumas atitinkamiems fago T4 baltymams yra 80%, 64%, 60%, 72% bei 71% identiškų amino rūgščių. Akivaizdu, kad labiausiai amino rūgščių seka besiskiriantys yra fagų T4 bei VR7 vėlyvosios transkripcijos reguliacijoje dalyvaujantys replikacijos baltymai. Šių baltymų struktūriniai ypatumai buvo nagrinėjami replikacijos ir su ja susijusių procesų genų analizės skyriuje 3.2.2., todėl šiame skyriuje pateiktos fago VR7 vėlyvosios transkripcijos faktoriaus gp55 bei aktyvatoriaus gp33 struktūrinės ypatybės.

Fago VR7 gp33 aminorūgščių seka, kaip paminėta aukščiau, gan skiriasi nuo T4 gp33. Tačiau P<sub>L</sub> aktyvacijai bei sąveikai su ląstelės šeimininkės RNR polimeraze yra svarbūs tik du motyvai, atitinkamai: C-galinio domeno 6 a.r. motyvas bei C-galinį domeną su likusia baltymo dalimi jungianti aminorūgščių sekos sritis. Nustatyta, kad minėtų motyvų aminorūgščių sekos skirtinguose T4 tipo faguose yra itin konservatyvios, o N-galinė gp33 sritis, T4 tipo fagų atveju, yra variabili (Nechaev ir Geiduschek, 2008).



```

33_VR7 ----MSSLVNFDTQ-----KTESP--SGAISKQQNGLDIEAMVESTEMSYLEATT 45
33_T4  MTQFSLNDIRPVDETGLSEKELSIKKEKDEIAKLLDRQENGFIEKMVEEFGMSYLEATT 60
      ...: .*          *.*: : :*:**:* ** ***. *****

33_VR7 AWLEERGVPENFARYIPAGIIDKIMNEAYDDNLLRPSMSRTQKTNLDFFLL 97
33_T4  AFLEENSIPETQFAKFIPSGIIEKIQSEAI DENLLRPSVVRCEKTNLDFFLL 112
      *:***...*:** :*:**:*:***:*** ** *:*:***: * :*****

```

**40 pav. Bakteriofagų VR7 bei T4 gp33 aminorūgščių sekos palyginimas.** Pažymėti PL aktyvavimui bei sąveikai su RNR polimeraze (pilka spalva), o taip pat sąveikai su gp45 (žalia spalva) svarbūs motyvai.

Kaip matyti 40 pav., fago VR7 sąveikos su gp45 srities aminorūgščių seka yra identiška atitinkamai T4 gp33 sričiai. Tačiau šiek tiek skirtingos aminorūgštys yra šių baltymų jungiančiojo domeno srityje, o N-galiniai domenai nehomologiški. Jungiančiojo domeno aminorūgščių skirtumai gali būti susiję su fagų T4 bei VR7 šeimininkų rato skirtumais, tačiau nei N-galinis domenas, nei jungiančioji gp33 dalis promotorių atpažinimo neįtakoja.

Svarbiausias vaidmuo vėlyvųjų faginių promotorių atpažinime tenka baltymui gp55. Atlikus palyginamąją VR7 gp55 pirminės struktūros analizę nustatyta, kad labiausiai skiriasi fagų T4 bei VR7 gp55 C-galinio domeno (41 pav.) 32 amino rūgščių sritis (šios baltymo dalies atitikimas 41%, o likusios baltymo dalies – 86% identiškų amino rūgščių), kuri yra MotA lanksčiosios jungties atitikmuo. Tuo tarpu 8 ar C-galinis motyvas, kuris sąveikauja su gp45 yra ganėtinai konservatyvus, kas buvo nustatyta ir kitų T4 tipo fagų gp55 atveju (Nechaev ir Geiduschek, 2008).

```

          10      20      30      40      50      60
55_VR7  MNEIKLTKNNYVNNKELLKAISEWKQKLNANTDPNKIIRQNDVIGLAIMLIAEGLSKRFN
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
55_T4  MSETK-PKYNYVNNKELLQAIIDWKTELANNKDPNKVVRQNDTIGLAIMLIAEGLSKRFN
          10      20      30      40      50

          70      80      90      100     110     120
55_VR7  FSGYTQSWKQEMIADGIEAAIKGLHNFDETKYDNPHAYITMACFNAFVQRIKKERKEMAK
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
55_T4  FSGYTQSWKQEMIADGIEASIKGLHNFDETKYKNPHAYITQACFNAFVQRIKKERKEVAK
      60      70      80      90      100     110

          130     140     150     160     170     180
55_VR7  KYSYFVHNVDSDRDDDMVALADETFIQDIYDKMTQYESSLVKAPGSDK-SAKDKEGDLDFLYGTSI
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
55_T4  KYSYFVHNVDSDRDDDMVALVDETFIQDIYDKMTHYEESTYRTPGAEKKSVDSDSPSLDFLYEAND
      120     130     140     150     160     170     180

```

**41 pav. Bakteriofagų VR7 bei T4 gp55 aminorūgščių sekos palyginimas.** Pažymėti PL – 10 srities atpažinimui (pilka spalva) bei sąveikai su gp45 (žalia spalva) svarbūs motyvai.

Tuo tarpu sigma 70 2 domeną atitinkanti gp55 sritis ~42–140 a.r., o ypač už sąveiką su vėlyvojo promotoriaus –10 sritimi atsakinga 118–134 aminorūgščių seka, beveik identiška fago T4 gp55. Tai nestebina, nes kaip tik VR7 P<sub>L</sub> –10 sritis yra dar labiau išreikšta, nei fago T4 P<sub>L</sub> atveju.

### 3.3.4. Transkripcijos terminatoriai

Bakteriofago VR7 genomines nukleotidų sekos analizės metu buvo aptikti 28, keturių bp ilgio kilputę formuojantys, nuo Rho nepriklausomi hipotetiniai terminatoriai. Net 18 iš jų kilputės motyvas yra UUCG. Toks kilputės tetranukleotidas dominuoja T4 bakteriofagų terminatorių tarpe, o fago T4 atveju, buvo įrodyta tokio motyvo svarba išskirtinai stabilios RNR antrinės struktūros formavimui (Tuerk ir kiti, 1988; Miller ir kiti, 2003a). Likę potencialūs fago VR7 terminatoriai turi CGAA (7 term.), GAAA (1 term.), UUUC (1 term.) bei CAAA (1 term.) kilputės motyvą. Be to, fago VR7 DNR dar buvo aptikti 12 nekanonines (3, 5 bei 6 nt ilgio) kilputes formuojančių hipotetinių terminatorių. Daugelio fago VR7 nuo Rho nepriklausomų terminatorių nukleotidų sekos bei išsidėstymas genomineje DNR byloja, kad jie gali būti aktyvūs abiejų DNR grandinių atveju.

### 3.3.5. Potranskripcinės reguliacijos ypatumai

Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgos 1.3.2. skyriuje, daugelis (jei ne visi) potranskripcinės reguliacijos signalų glūdi bakteriofago T4 iRNR sekose. Iš jų svarbiausi yra: iniciacijos bei terminacijos (beprasmiškie) kodonai, Šaino ir Dalgarno (SD) seka bei antrinės iRNR struktūros.

Didžiosios dalies bakteriofago VR7 ASR, kaip ir visų T4 giminingų fagų atveju, iniciacijos kodonas yra AUG. Septynių genų – VR7ORF016w, *rpbA*, VR7ORF101c, VR7ORF162c(*mobE*), 5.1 bei 32.1 – iniciacijos kodonas yra UUG, o penkių (41, 46.2, *nrhH*, VR7ORF087c(*mobE*) ir 19.1) – GUG. Išvardintų genų tarpe, tik *g41* bei, iš dalies, VR7ORF162c(*mobE*) iniciacijos kodonai VR7 bei T4 faguose sutampa. Fago T4 atveju, tik vieno geno (*g26*) iniciacijos kodonas yra AUU, o UUG apskritai nenaudojamas.

Tuo tarpu fago VR7 hipotetinių ASR tarpe, nenustatytas inicijacijos kodonas AUU. Dominuojantis bakteriofago VR7 SD sekos motyvas, kaip ir fago T4 atveju, yra AGGA, kurio atstumas nuo inicijacijos kodono dažniausiai yra 7 bp (58%) bei 6 bp (31%). Pastebėta, kad galiniais nukleotidais persidengiančių genų SD sekos motyvas nėra išreikštas.

Bakteriofago T4 genomineje DNR koduojami trys transliacijos represoriai. Baltymas RegA yra universalus transliacijos represorius, tuo tarpu du replikacijos sistemos baltymai (gp32 bei gp43), esant didelėms jų koncentracijoms, represuoja sintezę nuo savo pačių iRNR. Šių baltymų atpažinimo taikiniai yra smeigtuko pavidalo antrinės, arba sudėtingesnės (pseudomazgų) struktūros, kurias prieš transliacijos iniciacijos sritis formuoja jų iRNR (Russel ir kiti, 1976; Pavlov ir Karam, 1994; Phillips ir kiti, 1996; Brown ir kiti, 1997). Bakteriofago VR7 lyderinėje g32 bei g43 nukleotidų sekoje, reguliacines struktūras formuojančios sekos, būdingos atitinkamoms fago T4 DNR sritims, aptiktos nebuvo. Tuo tarpu genas *regA*, buvo aptiktas fago VR7 genomines DNR sekos analizės metu. Nustatyta, kad 79% VR7 bei T4 RegA amino rūgščių yra identiškos, tačiau ką nors pasakyti apie fago VR7 geno *regA* koduojamo baltymo taikinius yra sudėtinga, kadangi šio represoriaus taikinių ilgis bei nukleotidų sekos nėra konservatyvios.

Genominės DNR nukleotidų sekos analizės metu buvo identifikuota viena bakteriofago VR7 tRNR<sup>Met</sup>, kurios 72 bp seka yra panaši (67% id bp) fago AehI tRNR<sup>Met</sup>. Įdomu tai, kad tRNR<sup>MET</sup> aptiktos tik fagų AehI bei 44RR2.8t genomineje DNR. Pasak Nolan`o bei bendraautorių (2006), vykdant bakteriofagų transportinių RNR paiešką tRNAscan-SE internetine programa, fagų tRNR<sup>Ile</sup> yra klaidingai priskiriamos tRNR<sup>Met</sup> grupei. Ir tą, kaip manoma, liudija *E. coli* izoleucil-tRNR sintetazės atpažinimo signalai, aptinkami fagų tRNR<sup>Met</sup> bei tRNR<sup>Ile</sup> sekose. Kad ir kaip bebūtų, jokių šią hipotezę įrodančių tyrimų, minėti autoriai, nėra publikavę.

### 3.4. VR grupės bakteriofagai

1980 metais tiriant bakteriofagų, išskirtų iš gamtinių vandens išteklių mėginių vystymosi priklausomybę nuo temperatūros, buvo nustatyta, kad gamtoje egzistuoja trys fagų tipai, besivystantys esant žemai, vidutinei bei aukštai temperatūrai (Seeley ir Primrose, 1980). *Escherichia coli* infekuojantys bakteriofagai dažniausiai yra išskiriami iš nutekamojo vandens pavyzdžių bei sрутų, o optimali jų vystymosi temperatūra yra artima ląstelės šeimininkės vystymosi temperatūrai t.y., 37°C. Taigi, šie fagai yra mezofiliniai bakteriofagai. Psichrofilinių fagų (t.y. tokių, kurie geba vystytis esant žemai temperatūrai) yra aptinkama *Aeromonas sp.* infekuojančių virusų tarpe, tačiau lig šiol tokio temperatūrinio spektro T4 tipo *E. coli* bakteriofagų aprašyta nebuvo.

Atlikus *E. coli* infekuojančių T4 giminingų bakteriofagų paiešką užteršto vandens šaltiniuose Lietuvoje, buvo surinkta >100 įvairių fagų kolekcija (Klausa ir kiti, 2003). Analizuojant šios kolekcijos bakteriofagų išsėjimo efektyvumą, buvo atrinkti du temperatūrai jautrūs fagai VR7 bei VR20. Kadangi fago viriono baltymų, *regB* geno bei kiti tyrimų rezultatai parodė, kad VR7 bei VR20 yra itin panašios genetinės sandaros, genomo nukleotidų seka buvo nuodugniai tiriama tik fago VR7 atveju. Šiems tyrimams įpusėjus buvo pastebėta, kad dar vienas mūsų skyriaus darbuotojo Dr. V. Klausos surinktos kolekcijos bakteriofagas – VR5 – formuoja itin mažas kolonijas, esant 37°C temperatūrai. Atlikus viriono baltymų bei atsitiktinių šio fago DNR sekų tyrimus, buvo nustatyta, kad VR5 genomines DNR seka galėtų būti labiau panaši į T4, nei fagų VR7 bei VR5. Bakteriofago VR7 genomines DNR nukleotidų seka buvo nustatyta šio darbo metu, fago VR5 DNR šiuo metu sekvenuojama JAV, tačiau norint publikuoti šių fagų genomines DNR tyrimo rezultatus, laikantis ICTV pateiktų rekomendacijų, reikia šiuos fagus klasifikuoti. Pagrindiniai fagų klasifikavimo metodai yra paremti fago vystymosi ląstelėje ypatumų tyrimu bei morfologijos identifikavimu. Bakteriofagų VR5, VR7 bei VR20 morfologinės charakteristikos aprašytos literatūros apžvalgoje.

Tam, kad nustatyti vystymosi *E. coli* ląstelėse ypatumus, buvo atliktas laboratorinių *Escherichia coli* kamienų jautrumo fagams VR5, VR7 bei VR20 tyrimas (5 lentelė) bei šių bakterinių virusų vystymosi efektyvumo priklausomybė nuo temperatūros. (angl. e.o.p.).

5 lentelė. Laboratorinių *E. coli* kamienų jautrumo fagams VR5, VR7 bei VR20 tyrimas.

	B <sub>E</sub>	B40	K12	MH1	Nova Blue (DE3)	GM 2163	CR63	BL21 (DE3)
VR5	+	+	+	+	+	+	+	+
VR7	+	+	+*	+*	-	+**	+**	+
VR20	+	+*	+*	+	+*	+	+	+
T4	+	+	+	+	+	+	+	+

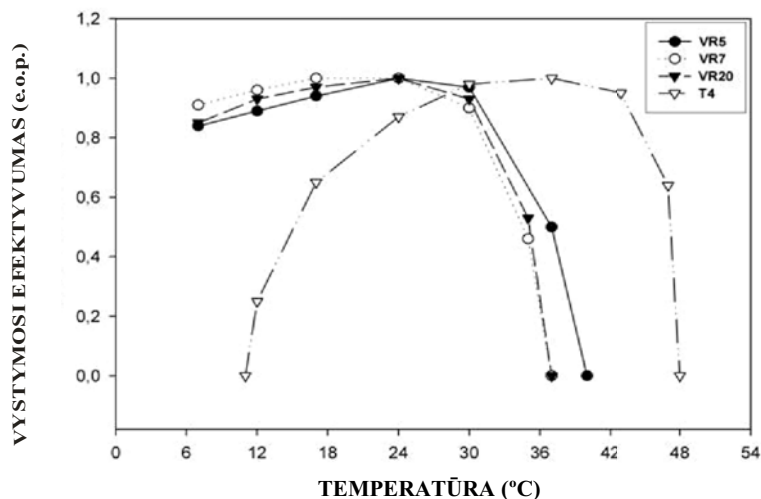
+\* labai mažos faginės kolonijos;

+\*\* difuzinės faginės kolonijos.

Laboratorinių *E. coli* kamienų jautrumo fagams VR5, VR7 bei VR20 tyrimas parodė, kad bakteriofagų VR7 bei VR20 vystymasis tyrimui naudotuose kamienuose, yra skirtingas, lyginant su T4. Bakteriofagas VR7 itin prastai vystosi *E. coli* K-12 artimų kamienų ląstelėse, o Nova Blue (DE3) kamieno ląstelės šiam fagui nejautrios. Kad VR7 bei T4 šeimininkų spektras gali skirtis, buvo paminėta ir fago VR7 genomines DNR sekos analizės skyriuje (3.2. bei 3.3), tačiau būtent šio tyrimo rezultatai hipotezę patvirtino. Reikia paminėti, kad šio tyrimo metu taip pat buvo tirtas įvairių klinikinių *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Salmonella* ir *Aeromonas salmonicida* bei *Aeromonas hydrophyla* kamienų ląstelių jautrumas minėtiems VR grupės bakteriofagams, tačiau šių kamienų ląstelėse fagai VR5, VR7 ir VR20 nesivystė. Todėl buvo suformuluota prielaida, kad VR grupės fagai yra tik *E. coli* infekuojantys fagai.

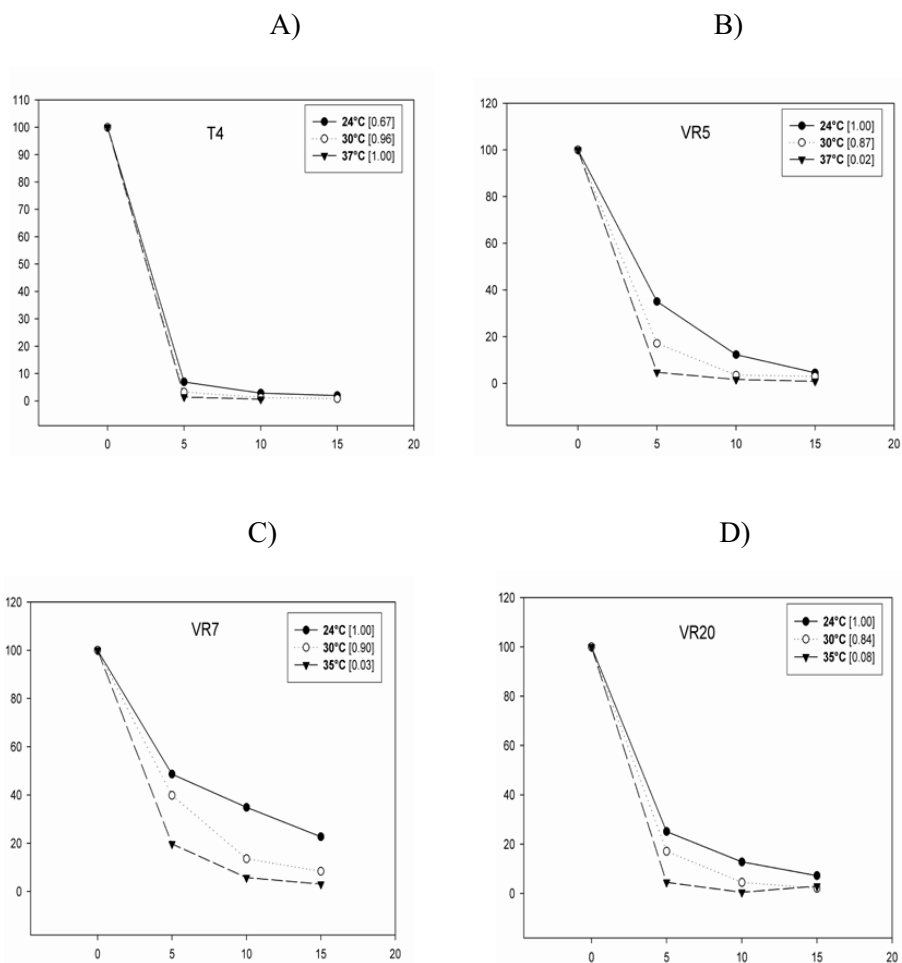
Toliau buvo tiriamas minėtų fagų gebėjimas vystytis *E. coli* B<sub>E</sub> kamieno ląstelėse esant įvairiai inkubacijos temperatūrai nuo +7 iki +40°C. Tyrimų metu paaiškėjo, kad fagams VR5, VR7 bei VR20 būdingas lig šiol literatūros šaltiniuose neaprašytas temperatūrinis vystymosi fenotipas (42 pav.). Kaip matyti iš pateiktos diagramos, tirtų VR grupės bakteriofagų faginių kolonijų

formavimosi efektyvumas esant temperatūrai nuo 24 °C iki 10 °C išlieka beveik stabilus, tuo tarpu nuo 27 °C iki 35 °C ženkliai sumažėja. Fagai VR7 bei VR20 nebesivysto esant 37 °C temperatūrai, o fagas VR5 – esant 40°C temperatūrai.



42 pav. Bakteriofagų VR5, VR7, VR20 bei T4 (kontrolė) temperatūrinė vystymosi priklausomybė.

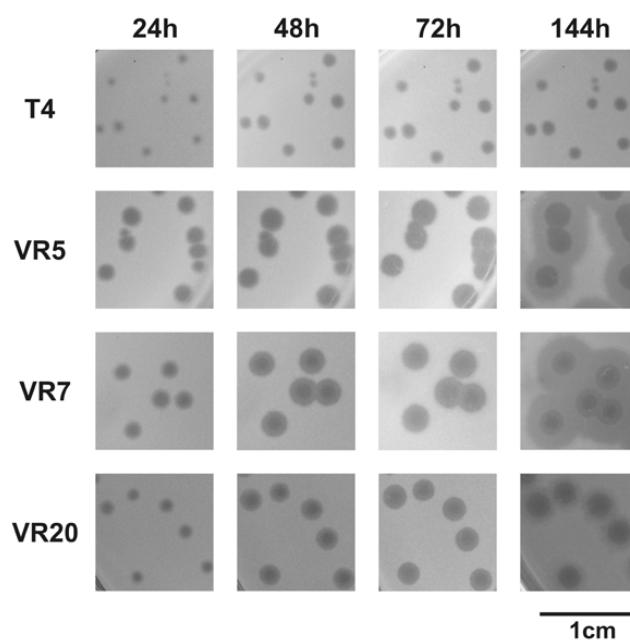
Yra kelios priežastys, dėl kurių bakteriofagas negali vystytis esant tam tikrai temperatūrai: dėl sutrikdytos adsorbcijos arba dėl sutrikusio fago vystymosi ląstelėje. Atlikus VR grupės fagų adsorbcijos prie skirtingų temperatūrų tyrimą, buvo nustatyta, kad padidinus temperatūrą, tirtų fagų adsorbcijos efektyvumas padidėja, tačiau faginė išeiga sumažėja ženkliai (43 pav.). Todėl buvo padaryta išvada, kad esant aukštesnei nei 27°C temperatūrai, sutrinka ne fagų VR5 ir VR7 adsorbcija, o vystymasis *E. coli* ląstelėse. Kaip matyti 43 pav. D, bakteriofago VR20 adsorbcijos ant *E. coli* ląstelių paviršiaus temperatūrinės priklausomybės tyrimo rezultatai rodo, kad esant 35°C temperatūrai, šiam fagui yra būdinga taip vadinama abortatyvi adsorbcija. Galima numanyti, kad bakteriofago VR20 atveju, esant aukštesnei temperatūrai sutrinka ne tik adsorbcijos, bet ir vystymosi procesai.



**43 pav. Bakteriofagų T4 (kontr.), VR5, VR7 bei VR20 adsorbcijos efektyvumo temperatūrinė priklausomybė.** Skaičiai X ašyje atitinka laiką (min.), o Y ašyje – neadsorbuotų fagų kiekį (%). Dešiniajame viršutiniame kampe, rištiniuose skliaustuose, pateikiama galutinės fagų išeigos skaitinė išraiška (didžiausias išsivysčiusių fagų skaičius atitinka 1.00).

Tiriant bakteriofagų VR5, VR7 bei VR20 kolonijų morfologiją, buvo pastebėtas dar vienas T4 tipo fagams nebūdingas bruožas – nuolat didėjančios šių fagų kolonijos. Be abejo, terminas „nuolat“ nereiškia, kad kolonijos didėja amžinai. „Nuolat“ didėjančias (angl. *constantly growing*) kolonijas formuoja T7 tipo bakteriofagai. Kolonijų dydžio kaita, tokių fagų atvejais, stebima apie 120 – 140 h, o jų plėtimąsi įtakoja tokie faktoriai, kaip dehidracija, lėkštelės dydis, inkubavimo temperatūra ir pan. (Fort ir Méndez, 2002). T4 tipo bakteriofagų kolonijų dydis, priklausomai nuo temperatūros, kinta nuo ~24h

(37°C) iki ~48h (24°C) (Kutter ir kiti, 1994a). Tuo tarpu, tirtos VR grupės bakteriofagų kolonijų dydžio pokytis esant 24°C temperatūrai, buvo stebimas iki ~144 h (44 pav.). Be to, kolonijų didėjimas buvo nustatytas net laikant lėkštes šaldytuve t.y. 4°C. Manoma, kad „nuolat“ didėjančias kolonijas formuoja fagai, kurie geba infekuoti bei vystytis stacionarios fazės ląstelėse (Fort ir Méndez, 2002). Pradiniai fagų VR5, VR7 bei VR20 tyrimai rodo, kad šie fagai vystosi OD<sub>600</sub> 2.5 ląstelių kultūroje, o VR7 net ir OD<sub>600</sub> 4.0 *E. coli* B<sub>E</sub> kamieno kultūroje.

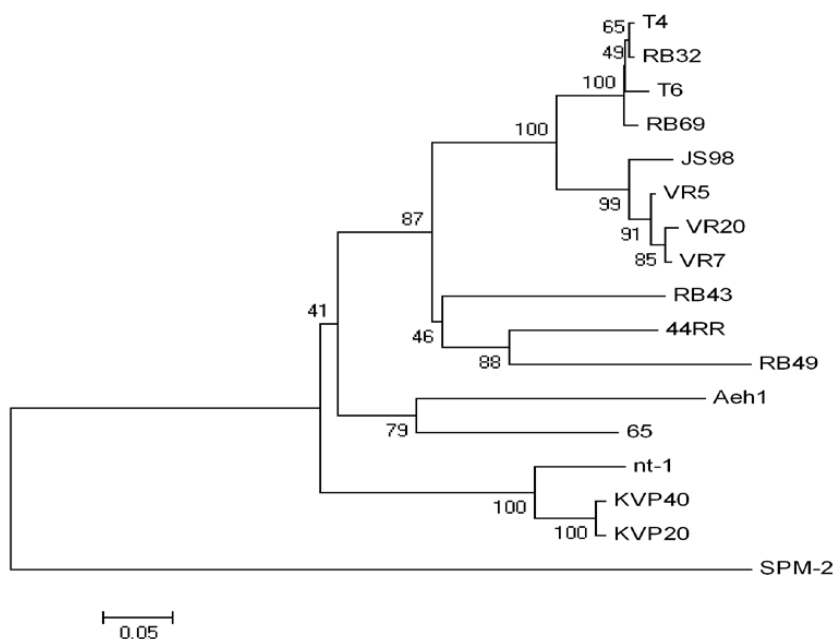


**44 pav. Bakteriofagų VR5, VR7, VR20 ir T4 (kontrolė) kolonijų augimas esant 24°C temperatūrai.** Viršuje nurodytas inkubacijos laikas (val.), apačioje esantis brūkšnylis atitinka 1 centimetrą.

Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgos 1.1. skyriuje, T4 giminųjų fagų klasifikacijai dažniausiai naudojama diagnostinės PGR reakcijos metu gautų *g23* fragmentų palyginamoji analizė. Pritaikius šį metodą buvo atlikta fagų VR5, VR7 bei VR20 diagnostinė PGR. Nustačius centrinę *g23* sekos dalį atitinkančių diagnostinių PGR fragmentų (600 bp) sekas (sekų numeriai genų banke: FN641800, FN641801 and FN641802), atlikta palyginamoji nukleotidų



sekų bei jas atitinkančių aminorūgščių sekų analizė. Tokiu būdu nustatyta, kad VR grupės bakteriofagų minėto g23 fragmento sekos yra itin panašios tiek nukleotidų, tiek ir aminorūgščių lygmeny (97% – 98% identiškų ar bei nt). Tuo tarpu, lyginant su atitinkama fago T4 gp23 sekos dalimi, fagų VR5, VR7 bei VR20 centrinio gp23 segmento aminorūgščių sekos panašumas yra atitinkamai 84%, 84% bei 83%. Siekiant fagus VR5, VR7 bei VR20 klasifikuoti, buvo sudaryta filogenetinė T4 giminingų fagų gp23 diagrama (45. Pav).



**45 pav. Filogenetinė T4 giminingų fagų diagrama, sudaryta artimiausių grupių apjungimo metodu.** Palyginti diagnostiniai fagų VR5, VR7 bei VR20 g23 PGR fragmentai (600 bp centrinės geno dalies) bei atitinkami DNR fragmentai fagų, kurių genomų sekos deponuotos internetinėse <http://phage.bioc.tulane.edu> ir NCBI duomenų bazėse. Šalia atsišakojimų nurodyta procentinė įkėlos sutapimo su tiriamu baltymu išraiška. Mastelis atitinka pakeistų aminorūgščių skaičių, tenkantį vienai pozicijai.

Pateiktoje diagramoje matyti, kad visi trys VR grupės bakteriofagai, kartu su fagu JS98, formuoja atskirą T4 giminingų fagų pogrupį. Apibendrinant gautus rezultatus galima teigti, kad VR grupės T4 giminingi fagai bei T-lyginis bakteriofagas T4 skiriasi tiek g23 seka, tiek ir fiziologinėmis savybėmis.

### 3.5 Reziუმė

Apžvelgiant visus pateiktų tyrimų rezultatus, pirmiausiai reikia atsakyti į klausimą: ar gali bakteriofagas VR7 būti priskirtas T4 giminingų fagų T-lyginiam pogrupiui?

T-lyginių bakteriofagų pogrupiui priskiriami tie fagai, kurių genominės DNR sekos yra >90% tapačios T4, o likusi (10%) geno dalis skiriasi, tačiau didžioji dalis skirtumų aptinkami neesminių, nežinomos funkcijos genų pozicijose (Desplats ir Krisch, 2003). Labiau nuo T4 „nutolusio“ T-lyginio bakteriofago RB69 atveju, tokių besiskiriančių DNR sričių yra šiek tiek daugiau, tačiau net ir šio fago didžioji dalis geno yra bemaž identiška T4. Tuo tarpu, šiame darbe aprašyto bakteriofago VR7 genomas, tik 41% DNR nukleotidų sekos yra kolinearūs fago T4 DNR, tačiau net ir šios dalies tapatumas nesiekia 75%. Genominės DNR analizės metu nustatyta, kad 72% fago VR7 ASR koduoja baltymus homologiškus atitinkamiems T4 genų produktams, bet net 88% šių baltymų aminorūgščių sekų tapatumas tėra nuo 20% iki 79%. Ištyrus bakteriofago VR7 transkripcijos reguliaciją paaiškėjo, kad visų klasių promotorių tipinė seka skiriasi, lyginant su atitinkamomis fago T4 promotorių tipinėmis sekomis, be to, genų raiškos reguliacijoje dalyvaujančių VR7 bei T4 baltymų aminorūgščių sekos taip pat ženkliai skiriasi. Dar daugiau, ištyrus fago VR7 vystymosi *E. coli* ląstelėse ypatybes paaiškėjo, kad šio fago fiziologinės savybės yra nebūdingos jokiam žinomam T-lyginiam bakteriofagui. Galų gale, T4 tipo fagų klasifikacijoje naudojamas gp18, gp19 bei gp23 aminorūgščių sekos palyginimas parodė, kad nė vienas šių baltymų nėra >90% homologiškas atitinkamų fago T4 genų produktams, kas yra būtina sąlyga, priskiriant tiriamą bakteriofagą T-lyginių fagų pogrupiui.

Kadangi šio darbo tikslas buvo atrinkti bei ištirti filogenetiškai tiek nuo T-lyginių, tiek ir nuo pseudo T-lyginių fagų nutolusį bakteriofagą, reikia atsakyti į dar vieną klausimą: ar fagas VR7 nėra pseudo T-lyginis? Tipinis pseudo T-lyginių fagų atstovas yra bakteriofagas RB49. Pasinaudojus BlastN programa buvo nustatyta, kad šio bakteriofago genominės DNR nukleotidų seka yra absoliučiai nehomologiška T4 (Desplats ir Krisch, 2003), tačiau

aminorūgščių lygyje 45% fago RB49 genų koduojamų baltymų yra 20% - 70% homologiškai atitinkamiems T4 baltymams (Nolan ir kt., 2006). Palyginamosios fago RB49 gp18, gp19 bei gp23 analizės metu nustatyta, kad šių baltymų homologija atitinkamiems fago T4 baltymams tėra 54%. Be to, bakteriofago T4, kaip ir šiame darbe aprašyto fago VR7 atveju, transkripcijos reguliacija laike vyksta trimis etapais, aktyvuojant trijų skirtingų klasių promotorius. Fago RB49 atveju aptiktos tik dvi klasės promotorių, o viduriniuosius promotorius atitinkančių sekų bei su šiuo transkripcijos etapu susijusius baltymus koduojančių genų RB49 genomineje DNR nėra. Taigi, palyginus visus paminėtus faktus akivaizdu, kad fagas VR7 nėra pseudo T-lyginis bakteriofagas.

Reikia pasakyti, kad bakteriofago VR7 tyrimo rezultatai uždavė daugiau klausimų, nei pateikė atsakymų. Šiai dienai neįmanoma pasakyti kodėl šis T4 tipo bakteriofagas yra jautrus temperatūrai, kodėl kitaip nei visi kiti T4 giminingi fagai jis vystosi stacionarios fazės ląstelėse. Galiausiai, kokią įtaką šio fago fiziologinėms savybėms turi vienokie ar kitokie genominės DNR neatitikimai, lyginant su fagu T4. Kol kas tegalima numanyti, kad temperatūrai jautrus fago VR7 fenotipas, ko gero, yra sąlygotas šio bakteriofago struktūrinių bei replikacijoje dalyvaujančių baltymų sąveikos ypatybių, nes būtent šie du procesai viruso vystymosi metu yra itin jautrūs temperatūrai. Tačiau, kažką konkrečiau pasakyti šiuo klausimu neįmanoma, nes be atitinkamų baltymų sistemos tyrimų, remtis tik palyginamąją sekos analize su T4, esant tokiam dideliame skaičiui neatitikimų yra nenaudinga.

VR7 genomo tyrimo metu buvo nustatyta, kad vieno T4 tipo bakteriofago – JS98 – genominės DNR nukleotidų seka yra panašesnė VR7, nei fago T4. Bakteriofagas JS98 buvo išskirtas 2003 m. Indijoje iš diarėja sergančių pacientų fekalijų. Šio *E. coli* infekuojančio viruso genominė DNR buvo Zuber ir bendraautorių publikuota 2007 metais, tačiau kaip tik tuo metu buvo pasiūlyta visa eilė T4 tipo fagų klasifikacijos naujovių, dėl ko JS98 taip ir nebuvo deramai klasifikuotas ir tėra apibūdinamas kaip “tolimas T-lyginis”, formuojantis atskirą pogrupį RB49, RB69 bei T4 fagų grupėje. Kad ir kaip ten

bebūtų, 68% šiame darbe aprašyto fago VR7 genomines DNR yra kolinearai JS98 genomui vidutiniškai 77% identiškų nukleotidų (žr. 2 priedą). Iš disertacinio darbo priede pateikto paveikslo matyti, kad fago VR7 bei JS98 genomines DNR seka yra panašesnė, nei lyginant su T4. Būna tik apgailestauti, kad JS98 buvo išskirtas terapiniu tikslu, todėl nuodugniau šio fago genomo ypatybės tirtos nebuvo ir daugiau nieko, išskyrus genomo seką, baltymus ir tam tikras fiziologines savybes, apie šį bakteriofagą nėra žinoma. Akivaizdu tik tiek, kad fagas VR7, kartu su kitais VR grupės fagais bei JS98, formuoja atskirą fiziologinėmis savybėmis itin besiskiriančių fagų pogrupį T4 giminingų bakteriofagų tarpe.

Tikėtina, kad šiuo metu Biotechnologijos institute atliekami bakteriofago VR7 replisomos baltymų tyrimai, Craig Venter institute JAV nustatoma fago VR5 DNR seka, bei toliau tęsiami bakteriofago VR7 fiziologijos ypatybių tiriamieji darbai leis atsakyti į bent vieną iš aukščiau paminėtų klausimų. Kita vertus, džiugu, kad VR grupės fagų tyrimas gali pagelbėti ne tik siekiant išsiaiškinti T4 giminingų bakteriofagų paplitimo gamtoje dėsningumus bei evoliucinius ryšius tarp T-lyginių bei Pseudo T-lyginių fagų, bet ir atveria naujas fago-ląstelės šeimininkės sistemos tyrimų galimybes.

## IŠVADOS

1. LZ grupės fagų genomo srities 30 - 31 struktūra yra būdinga T-lyginiams bakteriofagams. Tuo tarpu ženklaus struktūriniai pokyčiai bakteriofago VR7 genomo srityje 30.4 – 30.2 niekada nebuvo aptikti jokių T-lyginių fagų atveju.
2. Nustačius 169,285 bp bakteriofago VR7 genomo seką aptikti 293 hipotetiniai ASR, iš kurių 211 koduoja baltymus, homologiškus fago T4 baltymams ribose nuo 27% – 97%; 46 ASR neturi analogų T4, bet aptinkami kitų T4 giminingų fagų genomuose; 9 ASR yra nebūdingi T4 tipo fagams bei 27 ASR koduoja baltymus, kuriems patikimų homologų NCBI duomenų bazėje nėra.
3. Bakteriofago VR7 genų raiškai būdinga tripakopė transkripcijos reguliacija, kontroliuojama ankstyvųjų, viduriniųjų bei vėlyvųjų promotorių. Šio fago genomineje DNR koduojami visi fago T4 transkripcijos reguliacijai būtini baltymai. Laboratorinėmis sąlygomis, plazmidėje koduojamas fago VR7 vidurinėsios transkripcijos aktyvatorius MotA, kurio homologija T4 MotA tėra 34%, atstato fago T4*motA*Δ gyvybingumą.
4. Bakteriofagų VR7, VR5 bei VR20 fiziologinės savybės yra nebūdingos jokiam žinomam *E. coli* infekuojančiam T4 tipo bakteriofagui.
5. Remiantis nustatytais T4 tipo bakteriofagų klasifikacijos kriterijais, fagas VR7 negali būti priskiriamas T-lyginių bakteriofagų pogrupiui. Kartu su bakteriofagu JS98, VR grupės fagai formuoja atskirą T4 giminingų bakteriofagų pogrupį.

## PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

- 1) Tiemann, B., Depping, R., Gineikiene, E., **Kaliniene, L.**, Nivinskas, R. and Rüger, W. (2004). ModA and ModB, Two ADP-Ribosyltransferases Encoded by Bacteriophage T4: Catalytic Properties and Mutation Analysis. *J. Bacteriology*, 186:7262-7272.
- 2) **Kalinienė, L.**, Truncaitė, L., Arlauskas, A., Stoškienė, G., Zajančauskaitė, A., Nivinskas, R. (2006). Structural organization of the genomic region between genes 30 and 31 in T4-related bacteriophages LZ, LZ1 and LZ9. *Biologija*, 4:5-9.
- 3) Truncaitė, L., Stoškienė, G., **Kalinienė, L.**, Strazdaitė, Ž., Nivinskas, R. (2006). *In vivo* and *in vitro* activities of the bacteriophage T4 early promoters. *Biologija*, 3:8-11.
- 4) **Kalinienė, L.**, Klausas, V., Truncaitė, L. (2010). Low-temperature T4-like coliphages vB\_EcoM-VR5, vB\_EcoM-VR7 and vB\_EcoM-VR20. *Archives of Virology*, (priimta spausdinti); doi:10.1007/s00705-010-0656-6.

### **Kitos publikacijos:**

Rubikas, J., **Kalinienė, L.** (2006). Gyvybės evoliucijos veiksniai: sąveika, dauginimasis, kitimas, atranka. *Laboratorinė medicina*, 4:20-29.

### **Padėka**

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui habil. dr. Rimui Nivinskui už suteiktą galimybę atlikti šį darbą, už vertingus patarimus, kantrybę ir paramą.

Noriu nuoširdžiai padėkoti mokslinio darbo konsultantei dr. Lidijai Truncaitei už patarimus bei didžiulę pagalbą ruošiant disertaciją.

Dėkoju visiems Genų inžinerijos skyriaus darbuotojams, o ypač dr. Aurelijai Zajančkauskaitei, dr. Vytautui Klausai ir Nijolei Uždavienei, už nuoširdžią pagalbą bei vertingus patarimus.

Esu nepaprastai dėkinga dr. Rolandui Meškiui už vertingas pastabas bei didžiulę paramą ruošiant disertaciją. Taip pat norėčiau padėkoti visam Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus kolektyvui už nuolatinę paramą bei nuostabią kaiminystę.

Noriu nuoširdžiai padėkoti dr. Editai Sužiedėlienei už vertingus patarimus bei pastabas.

Taip pat norėčiau padėkoti dr. Virginijai Bukelskienei už neįkainojamą pagalbą ruošiant visus doktorantūros dokumentus.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abedon, S.T. (1989) Selection for bacteriophage latent period length by bacterial density: a theoretical examination. *Microb. Ecol.* 18:79-88.
2. Abedon, S.T. (1992) Lysis of lysis-inhibited bacteriophage T4-infected cells. *J. Bacteriol.* 174:8073-8080.
3. Ackerman, H.-W. (1999) Tailed bacteriophages. The order *Caudovirales*. *Adv. Virus Res.* 51:135-201.
4. Ackerman, H.-W. (2001) Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch. Virol.* 146:843-857.
5. Ackerman, H.-W. (2003) Bacteriophage observations and evolution. *Res. Microbiol.* 154:245-251.
6. Ackermann, H.-W. and Krisch, H.M. (1997) A catalogue of T4-type bacteriophages. *Arch. Virol.* 142:2329-2345.
7. Ackermann, H.-W., DuBow, M.S., Gershman, M., Karska-Wysocki, B., Kasatiya, S.S., Loessner, M.J., Mamet-Bratley, M.D., and Regue, M. (1997) Taxonomic changes in tailed phages of enterobacteria. *Arch. Virol.* 142:1381-1390.
8. Adams, M.H. (1959) *Bacteriophages* Interscience, Publishers, Inc., New York, p. 527.
9. Adelman, K., Brody, E.N. and Buckle, M. (1998) Stimulation of bacteriophage T4 middle transcription by the T4 proteins MotA and AsiA occurs at two distinct steps in the transcription cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15247-15252.
10. Aiyar, S.E., Gourse, R.L. and Ross, W. (1998) Upstream A-tracts increase bacterial promoter activity through interactions with the RNA polymerase  $\alpha$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14652-14657.
11. Arbiol, C., Comeau, A.M., Kutateladze, M., Adamia, R., Krisch, H.M. (2010) Mobile regulatory cassettes mediate modular shuffling in T4-Type phage genomes. *Genome Biol. Evol.* 2010:140-152.
12. Arisaka, F., (2005) Assembly and infection process of bacteriophage T4. *Chaos* 15, 047502.
13. Bailly-Bechet, M., Vergassola, M. and Rocha, E. (2007) Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages. *Genome Res.* 10: 1486-1495.
14. Balter, M. (2000) Evolution on life's fringes. *Science* 289:1866-1867.
15. Barth, K.A., Powell, D., Trupin, M., Mosig, G. (1988) Regulation of two nested proteins from gene 49 (recombination endonuclease VII) and of a lambda RexA-like protein of bacteriophage T4. *Genetics* 120:329-343.
16. Belasco, J.G. and Brawerman, G. (1993) Experimental approaches to the study of mRNA decay. In *Control of messenger RNA stability*. Belasco, J.G. and Brawerman, G. (eds.) San Diego: Academic Press, pp. 475-493.
17. Black, L.W. Showe, M.K. and Steven, A.C. (1994) Morphogenesis of the T4 head. In *Molecular Biology of Bacteriophage T4* (Karam, J.D., editor-in-chief). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 369-382.
18. Bonocora, R.P., Caignan, G., Woodrell, C., Werner, M.H., Hinton, D.M. (2008) A basic/hydrophobic cleft of the T4 activator MotA interacts with the C-terminus of *E. coli*  $\sigma^{70}$  to activate middle gene transcription. *Mol. Microbiol.* 69:331-343.
19. Borjac-Natour, J.M., Petrov, V.M., Karam, J.D. (2004) Divergence of the mRNA targets for the Ssb proteins of bacteriophages T4 and RB69. *Virology J.* 1:4.



20. Brody, E., Rabussay, D. and Hall, D.H. (1983) Regulation of transcription of prereplicative genes. In *Bacteriophage T4* (Mathews, C.K., Kutter, E.M., Mosig, G., Berget, P.B., eds.). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 174-183.
21. Brody, E.N., Kassavetis, G.A., Ouhammouch, M., Sanders, G.M., Tinker, R.L., Geiduschek, E.P. (1995) Old phage, new insights: Two recently recognized mechanisms of transcriptional regulation in bacteriophage T4 development. *FEMS Microbiol. Lett.* 128:1-8.
22. Brok-Volchanskaya, V.S., Kadyrov, F.A., Sivogrivov, D.E., Kolosov, P.M., Sokolov, A.S., Shlyapnikov, M.G., Kryukov, V.M., Granovsky, I.E. (2008) Phage T4 SegB protein is a homing endonuclease required for the preferred inheritance of T4 tRNA gene region occurring in co-infection with a related phage. *Nucleic Acids Res.* 36:2094-2105.
23. Brown, D., Brown, J., Kang, C., Gold, L. and Allen, P. (1997) Single-stranded RNA recognition by the bacteriophage T4 translational repressor, RegA. *J. Biol. Chem.* 272:14969-14974.
24. Brown, M.C., Stockwell, P.A., Trotman, C.N.A., and Tate, W.P. (1990) The signal for the termination of protein synthesis in prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 18:2079-2086.
25. Campbell, E.A., Westblade, L.F., Darst, S.A. (2008) Regulation of bacterial RNA polymerase  $\sigma$  factor activity: a structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 11:121-127.
26. Carlson, K., Raleigh, E.A. and Hattman, S. (1994) Restriction and modification. In *Molecular Biology of Bacteriophage T4* (Karam, J.D., editor-in-chief). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 369-382.
27. Carver T, Berriman M, Tivey A, Patel C, Böhme U, Barrell BG, Parkhill J and Rajandream MA (2008) Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics*, 23:2672-6.
28. Chen, C.R., Lin, C.H., Lin, J.W., Chang, C.I., Tseng, Y.H., Weng, S.F. (2007) Characterization of a novel T4-type *Stenotrophomonas maltophilia* virulent phage Smp14. *Arch Microbiol.* 188:191-197.
29. Chen, H., Tang, H., Ebright, R.H. (2003) Functional interaction between RNA polymerase  $\alpha$  subunit C-terminal domain and  $\sigma^{70}$  in UP-element-and-activator-dependent transcription. *Mol. Cell* 11:1621-1633.
30. Chibani-Chennoufi, S., Canchaya, C., Bruttin, A., Brüssow, H. (2004b) Comparative genomics of the T4-like *Escherichia coli* phage JS98: implications for the evolution of T4 phages. *J. Bacteriol.* 186:8276-8286.
31. Chibani-Chennoufi, S., Sidoti, J., Bruttin, A., Dillmann, M-L., Kutter, E., Quadri, F., Sarker, S-A., Brüssow, H. (2004a) Isolation of *Escherichia coli* bacteriophages from the stool of pediatric diarrhea patients in Bangladesh. *J. Bacteriol.* 186:8287-8294.
32. Clowes, R.C. and Hayes, W. (1968) Experiments in microbial genetics. Blackwell scientific publications. Oxford and Edinburgh. p. 247.
33. Comeau, A.M. and Krish, H.M. (2005) War is peace-Dispatches from the bacterial and phage killing fields. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:488-494.
34. Comeau, A.M. and Krish, H.M. (2008) The capsid of the T4 phage superfamily: the evolution, diversity, and structure of some of the most prevalent proteins in the biosphere. *Mol. Biol. Evol.* 25:1321-1332.
35. Comeau, A.M., Bertrand, C., Letarov, A., Tetart, F., Krish, H.M. (2007) Modular architecture of the T4 phage superfamily: a conserved core genome and a plastic periphery. *Virology* 362:384-396.
36. Condon, C. and Putzer, H. (2002) The phylogenetic distribution of bacterial ribonucleases. *Nucleic Acids Res.* 30:5339-5346.

37. Coombs, D.H. and Arisaka, F. (1994) T4 tail structure and function. In *Molecular Biology of Bacteriophage T4* (Karam, J.D., editor-in-chief). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 259-282.
38. Dabrowska, K., Switala-Jelen, K., Opolski, A., Gorski, A. (2006) Possible association between phages' Hoc protein, and the immune system. *Arch. Virol.* 151:209-215.
39. Datta, D. B., Arden, B., Henning, U. (1977) Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. *J. Bacteriol.* 131:821-829.
40. de Smit, M.H. and van Duin, J. (1994) Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine–Dalgarno interaction. *J. Mol. Biol.* 235:173-184.
41. Delagoutte, E. and von Hippel, P.H. (2005) Mechanistic studies of the T4 DNA (gp41) replication helicase: functional interactions of the C-terminal tails of the helicase subunits with the T4 (gp59) helicase loader protein. *J. Mol. Biol.* 347:257-275.
42. Depping, R., Lohaus, C., Meyer, H.E. and Rürger, W. (2005) The mono-ADP-ribosyltransferases Alt and ModB of bacteriophage T4: Target proteins identified. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335:1217-23.
43. Desplats, C. and Krisch, H.M. (2003) The diversity and evolution of the T4-type bacteriophages. *Res. in Microbiol.* 154, 259-267.
44. Desplats, C., Dez, C., Tétart, F., Eleaume, H., Krisch, H.M. (2002) Snapshot of the genome of the pseudo-T-even bacteriophage RB49. *J. Bacteriol.* 184:2789-2804.
45. Deutscher, M.P. (1993) Ribonuclease multiplicity, diversity and complexity. *J. Biol. Chem.* 268:13011-13014.
46. Domenighini M., Magagnoli C., Pizza M., Rappuoli R. (1994). Common features of the NAD-binding and catalytic site of ADP-ribosylating toxins. *Mol. Microbiol.* 1:41-50.
47. Domenighini M., Rappuoli R. (1996). Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding and catalytic site of ADP-ribosylating enzymes. Expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages. *Mol. Microbiol.* 4: 667-674.
48. Dove, S.L., Darst, S.A., Hochschild, A. (2003) Region 4 of  $\sigma$  as a target for transcription regulation. *Mol. Microbiol.* 48:863-874.
49. Drake, J.W. and Kreuzer, K.N. (1994) DNA transactions in T4-infected *Escherichia coli*. In *Molecular Biology of Bacteriophage T4* (Karam, J.D., editor-in-chief). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 11-13.
50. Drake, J.W. and Ripley, L.S. (1994) Mutagenesis. In *Molecular Biology of Bacteriophage T4* (Karam, J.D., editor-in-chief). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 98-124.
51. Elliot, T. and Geiduschek, E.P. (1984). Defining a bacteriophage T4 late promoter: absence of a “–35” region. *Cell* 36:211-219.
52. Engman, H.W. and Kreuzer, K.N. (1993) Deletion of the essential gene 24 from the bacteriophage T4 genome. *Gene* 123:69-74.
53. Epstein, R.H., Bolle, A., Steinberg, C.M., Kellenberger, E., Boy de la Tour, E., Chevalley, R., Edgar, R.S., Susman, M., Denhardt, G.H. and Lielausis, A. (1963). Physiological studies of conditional lethal mutants of Bacteriophage T4D. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:375-394.
54. Estrem, S.T., Gaal, T., Ross, W. and Gourse, R.L. (1998) Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9761-9766.
55. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

56. Filée, J., Bapteste, E., Susko, E., Krisch, H.M. (2006) A selective barrier to horizontal gene transfer in the T4-type bacteriophages that has preserved a core genome with the viral replication and structural genes. *Mol. Biol. Evol.* 23:1688-1696.
57. Filée, J., Tétart, F., Suttle, C.A., Krisch, H.M. (2005) Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 102:12471-12476.
58. Finnin, M.S., Cicero, M.P., Davies, C., Porter, S.J., White, S.W. and Kreuzer, K.N. (1997) The activation domain of the MotA transcription factor from bacteriophage T4. *EMBO J.* 16:1992-2003.
59. Finnin, M.S., Hoffman, D.W. and White, S.W. (1994) The DNA-binding domain of the MotA transcription factor from bacteriophage T4 shows structural similarity to the TATA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10972-10976.
60. Finnin, M.S., Hoffman, D.W., Kreuzer, K.N., Porter, S.J., Schmidt, R.P., White, S.W. (1993) The MotA protein from bacteriophage T4 contains two domains. Preliminary structural analysis by X-ray diffraction and nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* 232:301-304.
61. Fokine A., Chipman, P.R., Leiman, P.G., Mesyanzhinov, V.V., Rao, V.B., Rossmann, M.G. (2004) Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6003-6008.
62. Fort J, Méndez V (2002) Time-delayed spread of viruses in growing plaques. *Phys. Rev. Lett.* 17:178101-1-178101-4.
63. Fujii, T., Nakayama, N., Nishida, M., Sekiya, H., Kato, N., Asakawa, S., Kimura, M. (2008) Novel capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages in a Japanese paddy field. *Soil Biol. Biochem.* 40:1049-1058.
64. Gerber, J.S. and Hinton, D.M. (1996) An N-terminal mutation in the bacteriophage T4 *motA* gene yields a protein that binds DNA but is defective for activation of transcription. *J. Bacteriol.* 178:6133-6139.
65. Geszvain, K., Gruber, T.M., Mooney, R.A., Gross, C.A., Landick, R. (2004) A hydrophobic patch on the flap-tip helix of *E. coli* RNA polymerase mediates  $\sigma^{70}$  region 4 function. *J. Mol. Biol.* 343:569-587.
66. Gineikienė, E., Klausas, V., Driukas, A., Petkūnienė, G., Nivinskas, R. (2006) Post-transcriptional control of gene *regB* expression in T4-related bacteriophage VR7. *Biologija.* 2:9-13.
67. Goff, C.G. (1974) Chemical structure and modification of the *Escherichia coli* ribonucleic acid polymerase alpha polypeptides induced by bacteriophage T4 infection. *J. Biol. Chem.* 249:6181-6190.
68. Goff, C.G. and Setzer, J. (1980) ADP ribosylation of *Escherichia coli* RNA polymerase is nonessential for bacteriophage T4 development. *J. Virol.* 33:547-549.
69. Gold, L. (1988) Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 57:199-233.
70. Goldfarb, A. and Palm, P. (1981) Control of promoter utilization by bacteriophage T4-induced modification of RNA polymerase alpha subunit. *Nucleic Acids Res.* 9:4863-4878.
71. Gram, H., Liebig, H.D., Hack, A., Niggemann, E., Ruger, W. (1984) A physical map of bacteriophage T4 including the positions of strong promoters and terminators recognized *in vitro*. *Mol. Gen. Genet.* 194: 232-40.
72. Gregory, B.D., Deighan, P., Hochschild, A. (2005) An artificial activator that contacts a normally occluded surface of the RNA polymerase holoenzyme. *J. Mol. Biol.* 353:497-506.
73. Gregory, B.D., Nickels, B.E., Garrity, S.J., Severinova, E., Minakhin, L., Bieber Urbauer, R.J., Urbauer, J.L., Heyduk, T., Severinov, K., Hochschild, A. (2004) A regulator that inhibits

- transcription by targeting an intersubunit interaction of the RNA polymerase holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:4554-4559.
74. Gribskov, M and Burgess, R. (1986) Sigma factors from *E. coli*, *B. subtilis*, Phage SPO1, and phage T4 are homologous proteins. *Nucleic Acids Res.* 14:6745-6763.
  75. Gross, C.A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J., Young, B. (1998) The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63:141-155.
  76. Gruber, T.M., Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:441-466.
  77. Gualerzi, C.O. and Pon, C.L. (1990) Initiation of mRNA translation in procaryotes. *Biochemistry* 29:5881-5889.
  78. Guild, N., Gayle, M., Sweeney, R., Hollingsworth, T., Modeer, T. and Gold, L. (1988) Transcriptional activation of bacteriophage T4 middle promoters by the motA Protein. *J. Mol. Biol.* 199:241-258.
  79. Hambly, E., Tétart, F., Desplats, C., Wilson, W.H., Krisch, H.M. & Mann, N.H. (2001) A conserved genetic module that encodes the major virion components in both the coliphage T4 and the marine cyanophage S-PM2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98:11411-11416.
  80. Haugen, S.P., Berkmen, M.B., Ross, W., Gaal, T., Ward, C., Gourse, R.L. (2006) rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of  $\sigma$  region 1.2.: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell* 125:1069-1082.
  81. Haugen, S.P., Ross, W., Manrique, M., Gourse, R.L. (2008) Fine structure of the promoter-  $\sigma$  region 1.2 interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:3292-3297.
  82. Helmann, J.D. (1999) Anti-sigma factors. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:135-141.
  83. Herendeen, D.R., Kassavetis, G.A. & Geiduschek, E.P. (1992) A transcriptional enhancer whose function imposes a requirement that proteins track along DNA. *Science* 256:1298-1303.
  84. Herendeen, D.R., Kassavetis, G.A., Barry, J., Alberts, B.M. and Geiduschek, E.P. (1989) Enhancement of bacteriophage T4 late transcription by components of the T4 DNA replication apparatus. *Science* 245:952-958.
  85. Herendeen, D.R., Kassavetis, G.A., Geiduschek, E.P. (1990) An RNA polymerase-binding protein that is required for communication between an enhancer and a promoter. *Science* 248:573-578.
  86. Hinton, D. M., Pande, S., Wais, N., Johnson, X. B., Vuthoori, M., Makela, A. and Hook-Barnard, I. (2005). Transcriptional takeover by  $\sigma$  appropriation: remodelling of the  $\sigma^{70}$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase by the bacteriophage T4 activator MotA and co-activator AsiA. *Microbiol.* 151:1729-1740.
  87. Hogg, M., Wallace, S. S., and Doublet, S. (2004). Crystallographic snapshots of a replicative DNA polymerase encountering an abasic site. *Embo J.* 23:1483-1493.
  88. Hollingsworth, H.C. and Nossal, N.G. (1991) Bacteriophage T4 encodes an RNase H, which removes RNA primers made by the T4 DNA replication system *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 266:1888-1897.
  89. Hook-Barnard, I.G., Hinton, D.M. (2007) Transcription initiation by mix and match elements: Flexibility for polymerase binding to bacterial promoters. *Gene Regul. Syst. Biol.* 2007:275-293.
  90. Hook-Barnard, I.G., Hinton, D.M. (2009) The promoter spacer influences transcription initiation via  $\sigma^{70}$  region 1.1. of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:737-742.
  91. Hsu, T. and Karam, J.D. (1990) Transcriptional mapping of a DNA replication gene cluster in bacteriophage T4. Sites for initiation, termination and mRNA processing. *J. Biol Chem.* 265:5303-5316.

92. Hughes, K.T. and Mathee, K. (1998) The anti-sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:231-286.
93. Ishihama, A. (1993) Protein-protein communication within the transcription apparatus. *J. Bacteriol.* 175:2483-2489.
94. Ishii, T. and Yanagida, M. (1977) The two dispensable structural proteins (soc and hoc) of the T4 phage capsid; their purification and properties, isolation and characterisation of the defective mutants, and their binding with the defective heads *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 109:487-514.
95. Jia, Z., Ishihara, R., Nakajima, Y., Asakawa, S., Kimura, M. (2007) Molecular characterization of T4-type bacteriophages in a rice field. *Env. Microbiol.* 9:1091-1096.
96. Jozwik, C.E., Miller, E.S. (1994) Polymerase chain reaction amplification of DNA from T4 plaques. In *Molecular Biology of Bacteriophage T4* (Karam, J.D., editor-in-chief). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 464-465
97. Kanasaki, T., Hamada, T., Yonesaki, T. (2005) Opposite roles of the dmd gene in the control of Rnase E and Rnase LS activities. *Genes Genet. Syst.* 80:241-249.
98. Kassavetis, G.A. and Geiduschek, E.P. (1984) Defining a bacteriophage T4 late promoter: bacteriophage T4 gene 55 protein suffices for directing late promoter recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5101-5105.
99. Kassavetis, G.A., Elliot, T., Rabussay, D.P. and Geiduschek, E.P. (1983) Initiation of transcription at phage T4 late promoters with purified RNA polymerase. *Cell* 33:887-897.
100. Keilty, S. and Rosenberg, M. (1987) Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J. Biol. Chem.* 262:6389-6395.
101. Kim, J.S. and Davidson, N. (1974) Electron microscope heteroduplex study of sequence relations of T2, T4, and T6 bacteriophage DNAs. *Virology* 57:93-111.
102. Klaus, V., Piešiniene, L., Staniulis, J., Nivinskas, R. (2003) Abundance of T4-type bacteriophages in municipal wastewater and sewage. *Ekologija* 1:47-50.
103. Koch, T., Raudonikiene, A., Wilkens, K. and Rürger, W. (1995) Overexpression, purification, and characterization of the ADP-ribosyltransferase (gpAlt) of bacteriophage T4: ADP-ribosylation of *E. coli* RNA polymerase modulates T4 “early” transcription. *Gene Expression* 4:253-264.
104. Kolesinskienė, G., Zajančauskaitė, A., Arlauskas, A., Klaus, V., Nivinskas, R. (2003) Nucleotide sequences of the overlapping genes 30.3 and 30.3' of T4-related bacteriophages. *Biologija*, 2:15-19.
105. Kreuzer, K.N. (2000) Recombination –dependent DNA replication in phage T4. *Trends Biochem. Sci.* 25:165-173.
106. Krickler, M.C., Tindall, K.R. (1989) Direct sequencing of bacteriophage T4 DNA with thermostable DNA polymerase. *Gene* 85:199-204.
107. Kumar, A., Malloch, R.A., Fujita, N., Smillie, D.A., Ishihama, A., Hayward, R.S. (1993) The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an ‘extended minus 10’ promoter. *J. Mol. Biol.* 232:406-418.
108. Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (2005) Bacteriophages: biology and applications. CRC Press, Boca Raton.
109. Kutter, E., Gachechiladze, K., Poglazov, A., Marusich, E., Shneider, M., Aronsson, P., Napuli, A., Porter, D., & Mesyanzhinov, V. (1996) Evolution of T4-related phages. *Virus Genes* 11:285-297.
110. Kutter, E., Kellenberger, E., Carlson, K., Eddy, S., Neitzel, J., Messinger, L., North, J. and Guttman B. (1994a) Effect of bacterial growth conditions and physiology on T4 infection. In *Molecular Biology of Bacteriophage T4* (Karam, J.D., editor-in-chief). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp.406-418.

111. Kutter, E., Stitham, T., Guttman, B., Kutter, E., Batts, D., Peterson, S., Djavakhishvili, T., Arisaka, F., Mesyanzhinov, V., Rüger, W., Mosig, G. (1994b) Genomic map of bacteriophage T4. In *Molecular Biology of Bacteriophage T4* (Karam, J.D., editor-in-chief). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 491-519.
112. Kuznedelov, K., Minakhin, L., Niedziela-Majka, A., Dove, S.L., Rogulja, D., Nickels, B.E., Hochschild, A., Heyduk, T., Severinov, K. (2002) A role for interaction of the RNA polymerase flap domain with the sigma subunit in promoter recognition. *Science* 295:855-857.
113. Lambert, L.J., Wei, Y., Schirt, V., Demeler, B. and Werner, M.H. (2004) T4 AsiA blocks DNA recognition by remodeling sigma (70) region 4. *EMBO J.* 23:952-2962.
114. Lavigne, R., Darius, P., Summer, E.J., Seto, D., Mahadevan, P., Nilsson, A., Ackerman, H.W., Kropinski, A.M. (2009) Classification of *Myoviridae* bacteriophages using protein sequence similarity. *BMC Microbiology* 9:224.
115. Lehman, I.R. and Pratt, E.A. (1960) On the structure of the glucosylated hydroxymethylcytosine nucleotides of coliphages T2, T4 and T6. *J. Biol. Chem.* 235:3254-3259.
116. Leiman, P.G., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F., Rossmann, M.G. (2003) Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cell. Mol. Life. Sci.* 60:2356-2370.
117. Letarov, A., Manival, X., Desplats, C., Krisch, H.M. (2005) gpwac of the T4-Type bacteriophages: structure, function, and evolution of a segmented coiled-coil protein that controls viral infectivity. *J. Bacteriol.* 187:1055-1066.
118. Li, Q., Shivachandra, S.B., Zhang, Z., Rao, V.B. (2007) Assembly of the small outer capsid protein, soc, on bacteriophage T4: a novel system for high density display of multiple large antrax toxins and foreign proteins on phage capsid. *J. Mol. Biol.* 370:1006-1019.
119. Liebig, H.-D. and Rüger, W. (1989) Bacteriophage T4 early promoter regions consensus sequences of promoters and ribosome-binding sites. *J. Mol. Biol.* 208:517-536.
120. Lissner, S. and Margalit, H. (1993) Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 21:1507-1515.
121. Lonetto, M., Gribskov, M., Gross, C.A. (1992) The  $\sigma^{70}$  family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* 174:3843-3849.
122. Lonetto, M.A., Rhodius, V., Lamberg, K., Kiley, P., Busby, S., Gross, C.A. (1998) Identification of a contact site for different transcription activators in region 4 of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma^{70}$  subunit. *J. Mol. Biol.* 284:1353-1365.
123. Loayza, D., Carpousis, A. J. & Krisch, H. M. (1991). Gene 32 transcription and mRNA processing in T4-related bacteriophages. *Mol. Microbiol.* 5, 715-725.
124. Macdonald, P.M., Kutter, E., Mosig, G. (1984) Regulation of a bacteriophage T4 late gene, soc, which maps in an early region. *Genetics* 106:17-27.
125. Maeda, H., Fujita, N. and Ishihama, A. (2000) Competition among seven *Escherichia coli*  $\sigma$  subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 28:3497-3503.
126. Malys, N. and Nivinskas, R. (2009) Non-canonical RNA arrangement in T4-even phages: accommodated ribosome binding site at the gene 26-25 intercistronic junction. *Mol. Microbiol.* 73:1115-1127.
127. Mann, N.H., Clokie, M.R.J., Millard, A., Cook, A., Wilson, W.H., Wheatley, P.J., Letarov, A., Krisch, H.M. (2005) The genome of S-PM2, a "photosynthetic" T4-type bacteriophage that infects marine *Synechococcus* starins. *J. Bacteriol.* 187:3188-3200.
128. Marshall, P., Sharma, M. and Hinton, D.M. (1999) The bacteriophage T4 transcriptional activator MotA accepts various base-pair changes within its binding sequence. *J. Mol. Biol.* 285:931-944.

129. Mattson, T., Richardson, J., Goodin, D. (1974) Mutant of bacteriophage T4D affecting expression of many early genes. *Nature* 250:48-50.
130. Mattson, T., Van Houve, G., Epstein, R.H. (1978) Isolation and characterisation of conditional lethal mutations in the *mot* gene of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 126:551-570.
131. McCarthy, J.E.G. and Brimacombe, R. (1994) Prokaryotic translation: the interactive pathway leading to initiation. *Trends Genet.* 10:402-407.
132. McCarthy, J.E.G. and Gualerzi, C. (1990) Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends Genet.* 6:78-85.
133. McPheeters, D.S., Christensen, A., Young, E.T., Stormo, G. and Gold, L. (1986) Translational regulation of expression of the bacteriophage T4 lysozyme gene. *Nucleic Acids Res.* 14:5813-5826.
134. Mendoza-Vargas, A., Olvera, L., Olvera, M., Grande, R., Vega-Alvarado, L., Taboada, B., Jimenez-Jacinto, V., Salgado, H., Juárez, K., Contreras-Moreira, B., Huerta, A.M., Collado-Vides, J., Morett, E. (2009) Genome-wide identification of transcription start sites, promoters and transcription factor binding sites in *E. coli*. *PLoS ONE* 4:e7526.
135. Miller, E. S., Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Durkin, A. S., Ciecko, A., Feldblyum, T. V., White, O., Paulsen, I. T., Nierman, W. C., Lee, J., Szczypinski, B., Ans Fraser, C. M. (2003b) Complete genome sequence of broad host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage. *J. Bact.* 5220-5233.
136. Miller, E. S., Karam, J.D. and Spicer, E. (1994) Control of translation initiation: mRNA structure and protein repressors. In *Bacteriophage T4* (Mathews, C.K., Kutter, E.M., Mosig, G., Berget, P.B., eds.). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 193-205.
137. Miller, E. S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T. and Rügner, W. (2003a) Bacteriophage T4 genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 86-156.
138. Miller, E.S. and Jozwik, C.E. (1990) Sequence analysis of conserved RegA and variable orf 43.1 genes in T4 like bacteriophages. *J. Bacteriol.* 172:5180-5186.
139. Miroux, B. and Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 186-256.
140. Monod, C., Repoila, F., Kutateladze, M., Tétart, F. and Krisch, H.M. (1997) The genome of the pseudo T-even bacteriophages, a diverse group that resembles T4. *J. Mol. Biol.* 267:237-249.
141. Montag, D., Riede, I., Eschbach, M.-L., Degen, M. and Henning, U. (1987) Receptor-recognizing proteins of T-even type bacteriophages. Constant and hypervariable regions and an unusual case of evolution. *J. Mol. Biol.* 196:165-174.
142. Mosig, G. and Hall, D.H. (1994) Gene expression: a paradigm of integrated circuits. In *Bacteriophage T4* (Mathews, C.K., Kutter, E.M., Mosig, G., and Berget, P.B. eds.) Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 127-131.
143. Mudd, E.A., Carpousis, A.J. and Krisch, H.M. (1990) *Escherichia coli* RNase E has a role in the decay of bacteriophage T4 mRNA. *Genes Dev.* 4:873-881.
144. Mudd, E.A., Prentki, P., Belin, D. and Krisch, H.M. (1988) Processing of unstable bacteriophage T4 gene 32 mRNAs into a stable species requires *Escherichia coli* ribonuclease E. *EMBO J.* 7:3601-3607.
145. Murakami, K.S. and Darst, S.A. (2003) Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:31-39.

146. Murakami, K.S., Masuda, S., Campbell, E.A., Muzzin, O., Darst, S.A. (2002a) Structural basis of transcriptional initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* 296:1285-1290.
147. Murakami, K.S., Masuda, S., Darst, S.A. (2002b) Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* 296:1280-1284.
148. Nechaev, S. and Geiduschek, E.P. (2006) The role of an upstream promoter interaction in initiation of bacterial transcription. *The EMBO J.* 25:1700-1709.
149. Nechaev, S. and Geiduschek, E.P. (2008) Dissection of the bacteriophage T4 late promoter complex. *J. Mol. Biol.* 379:402-413.
150. Nechaev, S., Kamali-Moghaddam, M., André, E., Léonetti, J.P., Geiduschek, E.P. (2004) The bacteriophage T4 late-transcription coactivator gp33 binds the flap domain of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17365-17370.
151. Nivinskis, R., Malys, N., Klaus, V., Vaiskunaite, R. and Gineikiene, E. (1999) Post-transcriptional control of bacteriophage T4 gene 25 expression: mRNA secondary structures that enhances translational initiation. *J. Mol. Biol.* 288:291-304.
152. Nivinskis, R., Raudonikiene, A. A. and Guild, N. (1989). New early gene upstream from the middle gene 31 of the bacteriophage T4: cloning and expression. *Mol. Biol. (Moscow)*, 23:739-749.
153. Nivinskis, R., Vaiškunaite, R. and Raudonikiene, A. (1992a) An internal AUU codon initiates a smaller peptide encoded by bacteriophage T4 baseplate gene 26. *Mol. Gen. Genet.* 232:257-261.
154. Nivinskis, R., Vaiškunaite, R. and Raudonikiene, A. (1993) Expression of bacteriophage T4 gene 25 is regulated via RNA secondary structure in the translational initiation region. *J. Mol. Biol.* 230:717-721.
155. Nivinskis, R., Zajančauskaite, A., Raudonikiene, A. and Viteniene, I. (1992b) The nucleotide sequence between genes 31 and 30 of bacteriophage T4. *DNA Sequence – J. DNA Sequencing and Mapping* 2:405-409.
156. Nolan, J.M., Petrov, V., Bertrand, C., Krish, H.M., Karam, J.D. (2006) Genetic diversity among five T4-like bacteriophages. *Virology* 33:30.
157. Nossal, N.G., Dudas, K.C., Kreuzer, K.N. (2001) Bacteriophage T4 proteins replicate plasmids with a performed R loop at the T4 ori (uvsY) replication origin in vitro. *Mol. Cell.* 7:31-41.
158. Nossal, N.G. (1994) The Bacteriophage T4 DNA replication fork. In *Bacteriophage T4* (Mathews, C.K., Kutter, E.M., Mosig, G., Berget, P.B., eds.). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 43-54.
159. Oliver, D.B. and Crowther, R.A. (1981) DNA sequence of the tail fiber genes 36 and 37 of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 153:545-568.
160. Orsini, G., Ouhammouch, M., Le Caer, J.-P. and Brody, E.N. (1993) The *asiA* gene of bacteriophage T4 codes for the anti- $\sigma^{70}$  protein. *J. Bacteriol.* 175:85-93.
161. Otsuka, Y. and Yonesaki, T. (2005) A novel endoribonuclease, RNase LS, in *Escherichia coli*. *Genetics* 169:13-20.
162. Otsuka, Y., Ueno, H. and Yonesaki, T. (2003) *Escherichia coli* endoribonucleases involved in cleavage of bacteriophage T4 mRNAs. *J. Mol. Biol.* 185:1017-1026.
163. Ouhammouch, M., Adelman, K., Harvey, S.R., Orsini, G. and Brody, E.N. (1995) Bacteriophage T4 MotA and AsiA proteins suffice to direct *Escherichia coli* RNA polymerase to initiate transcription at T4 middle promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1451-1455.
164. Ozoline, O.N., Fujita, N. and Ishihama, A. (2000) Transcription activation mediated by the carboxyl-terminal domain of the RNA polymerase  $\alpha$ -subunit. Multipoint monitoring using a fluorescent probe. *J. Biol. Chem.* 275:1119-1127.



165. Paget, M.S. and Helmann, J.D. (2003) The  $\sigma^{70}$  family of sigma factors. *Genome Biol.* 4:203.
166. Pande, S., Makela, A., Dove, S.L., Nickels B.E., Hochschild, A. and Hinton, D. M. (2002) The bacteriophage T4 transcription activator MotA interacts with the far-C-terminal region of the  $\sigma^{70}$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 184:3957-3964.
167. Pavlov, A.R. and Karam, J.D. (1994) Binding specificity of T4 DNA polymerase to RNA. *J. Biol. Chem.* 269:12968-12972.
168. Petrov, V.M., Nolan, J.M., Bertrand, C., Levy, D., Desplats, C., Krish, H.M., Karam, J.D. (2006) Plasticity of the gene functions for DNA replication in the T4-like phages. *J. Mol. Biol.* 361:46-68.
169. Phillips, C.A., Gordon, J. and Spicer, E.K. (1996) Bacteriophage T4 reg A protein binds RNA as a monomer, overcoming dimer interactions. *Nucleic Acids Res.* 24:4319-4326.
170. Piešiniene, L., Truncaite, L., Zajanckauskaite, A. and Nivinskas R. (2004) The sequences and activities of RegB endoribonucleases of T4-related bacteriophages. *Nucleic Acids Res.* 32:5582-5595.
171. Pietroni, P. and von Hippel, P.H. (2008) Multiple ATP binding is required to stabilize the "activated" (clamp open) clamp loader of the T4 DNA replication complex. *J Biol Chem.* 283: 28338–28353.
172. Pineda, M., Gregory, B.D., Szczypinski, B., Baxter, K.R., Hochschild, A., Miller, E.S., Hinton, D.M. (2004) A family of anti-sigma70 proteins in T4-type phages and bacteria that are similar to AsiA, a Transcription inhibitor and co-activator of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 344:1183-1197.
173. Pole, E.S., Brown, C.M. and Tate, W.P. (1995) The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of *in vivo* translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14:151-158.
174. Prilipov, A.G., Mesyanzhinov, V., Aebi, U. and Kellenberger, E. (1990) Cloning and sequencing of bacteriophage T4 genes between map positions 128.3-130.3. *Nucl. Acids Res.* 18:3635.
175. Raudonikene, A., Nivinskas, R. (1992) Gene *rIII* is the nearest downstream neighbour of bacteriophage T4 gene *3I*. *Gene* 114: 85-90.
176. Raya, R.R., Varey, P., Oot, R.A., Dyen, M.R., Callaway, T.R., Edrington, T.S., Kutter, E.M., Brabban, A.D. (2006) Isolation and characterisation of a new T-Even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep. *Appl. Environ Microbiol.* 72:6405-6410
177. Revel, H.R. (1981) Organization of bacteriophage T4 tail fiber gene cluster *34-38*. *Prog Clin Biol Res* 64:353-364.
178. Repoila, F., Tétart, F., Bouet, J.-Y. and Krisch, H.M. (1994) Genomic polymorphism in the T-even bacteriophages. *EMBO Journal* 13:4181-4192.
179. Rifat, D., Wright, N.T., Varney, K.M., Weber, D.J., Black, L.W. (2008) Restriction nuclease inhibitor IPI\* of bacteriophage T4: A novel structure for a dedicated target. *J. Mol. Biol.* 375(3):720-734.
180. Ringquist, S., MacDonald, M., Gibson, T. and Gold, L. (1993) Nature of the ribosomal mRNA tracks: analysis of ribosome-binding sites containing different sequences and secondary structures. *Biochemistry* 32:10254-10262.
181. Ringquist, S., Shinedling, S., Barrick, D., Green, L., Binkley, J., Stormo, G.D. and Gold, L. (1992) Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.* 6:1219-1229.
182. Rohrer, H., Zilling, W. And Mailhammer, R. (1975) ADP-ribosylation of DNA-dependent RNA polymerase of *Escherichia coli* by NAD<sup>+</sup>: protein ADP-ribosyltransferase from bacteriophage T4. *Eur. J. Biochem.* 60:227-238.

183. Ross, W., Aiyar, S.E., Salomon, J. and Gourse, R.L. (1998) *Escherichia coli* promoters with UP elements of different strength: modular structure of bacterial promoters. *J. Bacteriol.* 180:5375-5383.
184. Ross, W., Ernst, A. and Gourse, R.L. (2001) Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove. *Genes Dev.* 15:491-506.
185. Ross, W., Schneider, D.A., Paul, B.J., Mertens, A., Gourse, R.L. (2003) An intersubunit contact stimulating transcription initiation by *E. coli* RNA polymerase: interaction of the  $\alpha$ C-terminal domain and  $\sigma$  region 4. *Genes Dev.* 17:1293-1307.
186. Rossmann, M.G., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F., Leiman, P.G. (2004) The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:171-180.
187. Ruckman, J., Parma, D., Tuerk, C., Hall, D.H. and Gold, L. (1989) Identification of a T4 gene required for bacteriophage mRNA processing. *New Biol.* 1:54-65.
188. Russell, M., Gold, L., Morrisett, H. and O'Farrell, P.Z. (1976) Translational, autogenous regulation of gene 32 expression during bacteriophage T4 infection. *J. Biol. Chem.* 251:7263-7270.
189. Saïda, F., Uzan, M. and Bontems, F. (2003) The phage T4 restriction endoribonuclease RegB: a cyclizing enzyme that requires two histidines to be fully active. *Nucleic Acids Res.* 31:2751-2758.
190. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
191. Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
192. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2(nd) ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
193. Sanders, G.M., Kassavetis, G.A. and Geiduschek, E.P. (1995) Rules governing the efficiency and polarity of loading a tracking clamp protein onto DNA: determinants of enhancement in bacteriophage T4 late transcription. *EMBO J.* 14:3966-3976.
194. Sanderson, A., Mitchell, J.E., Minchin, S.D., Busby, S.J. (2003) Substitutions in the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma^{70}$  factor that affect recognition of extended -10 elements at promoters. *FEBS Lett.* 544:199-205.
195. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
196. Sanson, B., Hu, R.-M., Troitskaya, E., Mathy, N. and Uzan, M. (2000) Endoribonuclease RegB from bacteriophage T4 is necessary for the degradation of early but not middle or late mRNAs. *J. Mol. Biol.* 297:1063-1074.
197. Schmidt, F.J. and Apirion, D. (1983) T4 transfer RNAs: paradigmatic system for the study of RNA processing. In *Bacteriophage T4* (Mathews, C.K., Kutter, E.M., Mosig, G., Berget, P.B., eds.). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 208-217.
198. Schmidt, R.P. and Kreuzer, K.N. (1992) Purified MotA protein binds the -30 region of a bacteriophage T4 middle-mode promoter and activates transcription *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 267:11399-11407.
199. Schopf, J.W. (1992) The oldest fossils and what they mean, in *Major Events in the History of Life* (Schopf, J.W., Ed., Jones and Barlett), Boston, 29-63.
200. Seeley ND, Primrose SB (1980) The effect of temperature on the ecology of aquatic bacteriophages. *J. gen. Virol.* 46:87-95.
201. Selick, H.E., Kreuzer, K.N. and Alberts, B.M. (1988) The bacteriophage T4 insertion/substitution vector system. *J. Biol. Chem.* 263:11336-11347.

202. Severinova, E., Severinov, K. and Darst, S.A. (1998) Inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase by bacteriophage T4 AsiA. *J. Mol. Biol.* 279:9-18.
203. Shine, J. and Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1342-1346.
204. Simeonov, M.F., Bieber Urbauer, R.J., Gilmore, J.M., Adelman, K., Brody, E.N., Niedziela-Majka, A., Minakhin, L., Heyduk, T. and Urbauer, J.L. (2003) Characterization of the interactions between the bacteriophage T4 AsiA protein and RNA polymerase. *Biochemistry* 42:7717-7726.
205. Skorko, R., Zilling, W., Rohrer, H., Fujiki, H. and Maikhammer, R. (1977) Purification and properties of the NAD<sup>+</sup>: protein ADP-ribosyltransferase responsible for the T4 phage induced modification of the  $\alpha$  subunit of DNA-dependent RNA polymerase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 79:55-66.
206. Sommer, N., Šalniene, V., Gineikiene, E., Nivinskas, R. and Ruger, W. (2000) T4 early promoter strength probed *in vivo* with unribosylated and ADP-ribosylated *Escherichia coli* RNA polymerase: a mutation analysis. *Microbiology*, 146:2643-2653.
207. Stevens, A. (1976) A salt-promoted inhibitor of RNA polymerase isolated from T4 phage-infected *E. coli*. In *RNA polymerase* (Losick, R. and Chamberlin, M. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
208. Stitt, B. and Hinton, D. (1994) Regulation of middle-mode transcription. In *Bacteriophage T4* (Mathews, C.K., Kutter, E.M., Mosig, G., and Berget, P.B. eds.) Washington, D.C: American Society for Microbiology, pp. 142-160.
209. Stormo, G.D. (1986) Translation initiation. In: *Maximizing Gene Expression*. Reznikoff, W. and Gold, L. Editors. Butterworth, Boston, 1986:195-224.
210. Stoškiene, G., Truncaite, L., Zajančauskaite, A., Nivinskas, R. (2007) Middle promoters constitute the most abundant and diverse class of promoters in bacteriophage T4. *Mol. Microbiol.* 64:421-434.
211. Streisinger, G., Edgar, R.S., Denhart, G.H. (1964) Chromosome structure in phage T4. I. Circularity of the linkage map. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51:775-779.
212. Sullivan, M.B., Coleman, M.L., Weigele, P., Rohwer, F., Chisholm, S.W. (2005) Three Prochlorococcus cyanophage genomes: signature features and ecological interpretations. *PLoS Biol.* 3, e144.
213. Szewczak, A.A., Webster, K.R., Spicer, E.K. and Moore, P.B. (1991) An NMR characterization of the RegA protein-binding site of bacteriophage T4 gene 44 mRNA. *J. Biol. Chem.* 266:17832-17837.
214. Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-9.
215. Tetart, F., Desplats, C. and Krisch, H.M. (1998) Genome plasticity in the distal tail fiber locus of the T-even bacteriophage: recombination between conserved motifs swaps adhesin specificity. *J. Mol. Biol.* 282:543-556.
216. Tetart, F., Desplats, C., Kutateladze, M., Monod, C., Ackermann, H.-W. and Krisch, H.M. (2001) Phylogeny of the major head and tail genes of the wide-ranging T4-type bacteriophages. *J. Bacteriol.* 183:358-366.
217. Tiemann, B., Depping, R. and Ruger, W. (1999) Overexpression, purification, and partial characterization of ADP-ribosyltransferases ModA and ModB of bacteriophage T4. *Gene expression*, 8:187-196.

218. Tinker, R.L., Williams, K.P., Kassavetis, G.A. & Geiduschek, E.P. (1994) Transcriptional activation by a DNA-tracking protein: structural consequences of enhancement at the T4 late promoter. *Cell*, 77:225–237.
219. Tock, M.R. and Dryden, D.T.F. (2005) The biology of restriction and antirestriction. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:466-472.
220. Truncaitė, L., Kolesinskienė, G., Piešiniėnė, L., Zajančauskaitė, A., Nivinskas, R. (2004) Divergence of an early gene cluster between genes *30.9* and *30.3* in the bacteriophages T4 and Tula. *Biologija*, 2:25-28.
221. Truncaitė, L., Piešiniėnė, L., Kolesinskienė, G., Zajančauskaitė, A., Driukas, A., Klausas, V., Nivinskas, R. (2003) Twelve new MotA-dependent middle promoters of bacteriophage T4: consensus sequence revised. *J. Mol. Biol.* 327:335-346.
222. Truncaite, L., Zajančauskaite, A. and Nivinskas, R. (2002) Identification of two middle promoters upstream DNA ligase gene 30 of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 317:179-190.
223. Truncaite, L., Zajančauskaite, A., Arlauskas, A. and Nivinskas, R. (2005) Transcription and RNA processing during expression of genes preceding DNA ligase gene 30 in T4-related bacteriophages. *Virology*, 344:378-390.
224. Tuerk, C., Gauss, P., Thermes, C., Groebe, D.R., Gayle, M., Guild, N., Stormo, G., d'Aubenton-Carafa, Y., Uhlenbeck, O.C., Tinoco, I. Jr., Brody, E.N., Gold, L. (1988) CUUCGG hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1364-1368.
225. Ueno, H. and Yonesaki, T. (2001) Recognition and specific degradation of bacteriophage T4 mRNAs. *Genetics* 158:7-17.
226. Uzan, M., Favre, R. and Brody, E. (1988) A nuclease that cuts specifically in the ribosome binding site of some T4 mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8895-8899.
227. Voskuil, M.I., Voepel, K., Chambliss, G.H. (1995) The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 17:271-279.
228. Wang, C. C., Yeh, L.-S., Karam, J. D. (1995) Modular organisation of T4 DNA polymerase. Evidence from phylogenetics. *J. Biol. Chem.* 270:26558-26564.
229. Wang, J., Sattar, A. K., Wang, C. C., Karam, J. D., Konigsberg, W. H., and Steitz, T. A. (1997). Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell*, 89:1087-1099.
230. Webster, K.R. and Spicer, E.K. (1990) Characterization of bacteriophage T4 RegA protein-nucleic acid interaction. *J. Biol. Chem.* 265:19007-19014.
231. Wernersson, R., Rapacki, K., Stærfeldt, H-H., Sackett, P.W., Mølgaard, A. (2006) FeatureMap3D- a tool to map protein features and sequence conservation onto homologous structures in the PDB. *Nucl. Acids Res.* Vol. 34, Web Server issue.
232. Wilkens, K. and Rüger, W. (1994) Transcription from early promoters. In *Bacteriophage T4* (Mathews, C.K., Kutter, E.M., Mosig, G., and Berget, P.B. eds.) Washington, D.C: American Society for Microbiology, pp. 132-141.
233. Wilkens, K. and Rüger, W. (1996) Characterization of bacteriophage T4 early promoters *in vivo* with a new promoter probe vector. *Plasmid* 35:108-120.
234. Williams, K.P., Kassavetis, G.A., Herendeen, D.R. and Geiduschek, E.P. (1994) Regulation of late-gene expression. In *Bacteriophage T4* (Mathews, C.K., Kutter, E.M., Mosig, G., and Berget, P.B. eds.) Washington, D.C: American Society for Microbiology, pp.161-176.
235. Wilson, G.W., Edgell, D.R. (2009) Phage T4 mobE promoters trans homing of the defunct homing endonuclease I-TevIII. *Nucl. Acids Res.* 21:7110-7123.

236. Wong, K., Kassavetis, G.A., Leonetti, J.P., Geiduschek, E.P. (2003) Mutational and functional analysis of a segment of the sigma family bacteriophage T4 late promoter recognition protein gp55. *J. Biol. Chem.* 278:7073-7080.
237. Wood, W.B., Eiserling, F.A., Crowther, R.A. (1994) Long tail fibers: genes, proteins, structure and assembly. In *Molecular Biology of Bacteriophage T4* (Karam, J.D., editor-in-chief). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp.406-418.
238. Wu, L.T., Chang, S.Y., Yen, M.R., Yang, T.C., Tseng, Y.H. (2007) Characterization of extended-host-range pseudo-T-even bacteriophage Kpp95 isolated on *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:2532-2540.
239. Xi, J., Zhang, Z., Zhuang, Z., Yang, J., Spiering, M.M, Hammes, G.G., Benkovic, S.J. (2005) Interaction between the T4 helicase loading protein (gp59) and the DNA polymerase (gp43): unlocking of the gp59-gp43-DNA complex to initiate assembly of a fully functional replisome. *Biochemistry*, 44:7747-7756.
240. Yeh, L.-S., Hsu, T., Karam, J.D. (1998) Divergence of a DNA replication gene cluster in the T4-related bacteriophage RB69. *J. Bacteriol.* 8:2005-2013.
241. Yuan, A.H., Nickels, B.E., Hochschild, A. (2009) The bacteriophage T4 AsiA protein contacts the  $\beta$ -flap domain of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:6597-6602.
242. Zajančkauskaitė, A., Malys, N., Nivinskas, R. (1997) A rare type of overlapping genes in bacteriophage T4: gene 30.3' is completely embedded within gene 30.3 by one position downstream. *Gene*, 194:157-162.
243. Zajančkauskaitė, A., Raudonikiene, A. and Nivinskas, R. (1994) Cloning and expression of genes from the genomic region between genes *cd* and *30* of bacteriophage T4. *Gene*, 147:71-76.
244. Zajančkauskaitė, A., Truncaite, L., Strazdaite-Želiene, Ž., Nivinskas, R. (2008) Involvement of the *Escherichia coli* endoribonucleases G and E in the secondary processing of RegB-cleaved transcripts of bacteriophage T4. *Virology*, 375:342-353.
245. Zenkin, N., Kulbachinskiy, A., Yuzenkova, Y., Mustaev, A., Bass, I., Severinov, K., Brodolin, K. (2007) Region 1.2. of the RNA polymerase sigma subunit controls recognition of the -10 promoter element. *EMBO J.* 26:955-964.
246. Zhao, K., Liu, M., Burgess, R. (2010) Promoter and regulon analysis of nitrogen assimilation factor  $\sigma^{54}$ , reveal alternative strategy for *E. coli* MG1655 flagellar biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* 38:1273-1283.
247. Zuber, S., Ngom-Bru, C., Barretto, C., Bruttin, A., Brüßow, H., Denou, E. (2007) Genome analysis of phage JS98 defines a fourth major subgroup of T4-like phages in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189:8206-8214.
248. Zuckerkandl E & Pauling L (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins, pp. 97-166 in *Evolving Genes and Proteins*, edited by V. Bryson and H.J. Vogel. Academic Press, New York.
249. Zuo, Y. and Deutscher M. P. (2001) Exoribonucleases superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.* 29:1017-1026.

L

## PRIEDAS NR 1

Bakteriofago VR7 genų bei promotorių sąrašas. Nurodyti genų pavadinimai, numanoma baltymo funkcija, artimiausi homologai bei paplitimas keturių T4 giminingų fagų genomuose: T-lyginio T4, pseudo T-lyginio RB49, šizo T-lyginio AehI ir egzo T-lyginio S-PM2.

PAVADINIMAS	FUNKCIJA	HOMOLOGAS (IDENTIŠKŲ A.R. %)	T4	RB49	AehI	S-PM2
<i>rIIA</i> P <sub>M</sub>	Su ląstelės šeimininkės ATF-aze sąveikaujantis baltymas	JS98 (54.0%) T4 (59.3%) RB69 (49.4%)	+	+	+	-
<i>rIIA.1</i>	Hipotetinis baltymas	JS98 (77.3%) T4 (75.8%) RB69 (69.7%)	+	+	+	-
_____	_____	_____	<b>60</b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>60.1</b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>mobA</b> P <sub>E</sub>	_____	_____	_____
<b>ORF003c</b>	Hipotetinis baltymas	<i>Agrobacterium vitis</i> Avi 1970 (32%)	-	-	-	-
<b>ORF004c</b> P <sub>M</sub>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<b>60plus39</b> P <sub>M</sub>	Didysis topoizomerazės subvienetas	JS98 (83.3%) RB69 (78.4%) T4 (73.7%)	<b>du atskiri genai g39 ir g60</b> P <sub>M39</sub>	<b>60+39</b>	<b>60+39</b>	-
<b>ORF006c</b>	Hipotetinė endonukleazė	T7 tipo <i>Enterobacteria</i> fagas EcoDS1 (35.1%)	-	-	-	-
<b>39.1</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (86.0%) T4 (67.7%)	+	-	-	-

<b>39.2</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (98.2%) RB69 (84.2%) T4 (93.2%)	+	+	-	-
<b><i>gof</i></b>	iRNR metabolizme dalyvaujantis baltymas	RB14 (37.3%) T4 (36.4%) JS98 (46.0%)	+	+	-	-
<b><i>cef</i></b>	Cef baltymas	RB69 (49.3%) JS98 (42.6%) T4 (35.3%)	+	-	-	-
<b><i>motB</i> <b>P<sub>E</sub></b></b>	Transkripcijos baltymas	T4 (60.0%) JS98 (72.1%) RB69 (49.4%)	+	-	-	-
<b><i>motB.1</i> <b>P<sub>M</sub></b></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (41.8%) T4 (36.2%)	+	-	-	-
_____	_____	_____	<b><i>motB.2</i> <b>P<sub>E</sub></b></b>	_____	_____	_____
<b><i>ORF013</i> <b>P<sub>E</sub></b></b>	Hipotetinis baltymas.	-	-	-	-	-
<b><i>dexA</i></b>	DexA egzonukleazė	T4 (63.9%) RB69 (66.5%) JS98 (61.1%)	+	+	+	+
_____	_____	_____	<b><i>dexA.1</i></b>	_____	_____	_____
<b><i>dexA.2</i></b>	Hipotetinis baltymas	RB14 (34.2%) T4 (33.8%)	+	-	-	-
<b><i>ORF016w</i></b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<b><i>dda</i></b>	DNR helikazė	JS98 (76.8%) T4 (62.2%) RB69 (59.4%)	+	+	+	-
<b><i>dda.1</i></b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-

<b><i>dda.1</i></b> <b>P<sub>M</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (75.5%) T4 (32.0%) RB69 (30.3%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	-	-	-
<b><i>srd</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	Ląstelės šeimininkės Sigma baltymo inhibitorius	RB69 (73.3%) T4 (68.5%) JS98 (52.0%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	+	+	-
<b><i>modA</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	ADF–ribizoltransferazė	JS98 (63.7%) RB69 (54.0%) T4 (36.7%)	<b>+</b>	-	-	-
<b><i>modB</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	ADF–ribizoltransferazė	RB69 (32.3%) JS98 (32.5%) T4 (29.2%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	+	-	-
<b><i>ORF023</i></b>	RNR polimerazės $\sigma^{32}$ veiksnys	<i>Orientia tsusugamushi</i> OTBS_1247 (rpoH) (34.2%)	-	-	-	-
<b><i>modA.2</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (64.5%) RB69 (75.5%) T4 (44.3%)	<b>+</b>	-	-	-
<b><i>modA.3</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (80.4%) T4 (31.2%) RB32 (27.7%)	<b>+</b>	-	-	-
<b><i>modA.4</i></b>	Hipotetinis baltymas	RB32 (81.2%) T4 (79.2%) JS98 (83%)	<b>+</b>	-	-	-
<b><i>srh</i></b>	Ląstelės šeimininkės $\sigma^{32}$ represuojantis baltymas	JS98 (57.6%) T4 (49.254%)	<b>+</b>	-	-	-
			<b><i>mrh</i></b>			
<b><i>mrh.1</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (74.6%) T4 (37.3%)	<b>+</b>	-	-	-
<b><i>mrh.2</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (69.6%) T4 (63.2%) RB69 (59.6%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	-	-	-



<b><i>soc</i> P<sub>L</sub></b>	Išorinis kapsidės baltymas	JS98(90.9%) RB69 (81.6%) T4 (48.7%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub> (w1);</b> <b>P<sub>L</sub> (w2); P<sub>L</sub></b>	-	-	-
<b><i>segF</i></b>	Endonukleazė	T4 (65.2%)	<b>+</b>	-	-	-
<b>56 P<sub>M</sub></b>	dNTP–azė	T4 (75.9%) RB69 (70.1%) JS98 (70.1%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	<b>+</b>	<b>S(dut)</b>	-
—————	—————	—————	<b>dam/ P<sub>M</sub></b>	<b>+</b>	—————	—————
<b><i>ORF033w</i> P<sub>L</sub></b>	Hipotetinis baltymas	RB32ORF030w (50.8%) RB69ORF029w (46.2%)	-	-	-	-
<b>58=61</b>	Praimazė	JS98 (67.9%) T4 (59.767%) RB69 (61.1%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-
<b>61.1 P<sub>L</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (82.4%) T4 (75.0%) RB32 (73.1%)	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-
<b><i>ORF036</i></b>	Hipotetinis baltymas	RB69ORF033c (66.1%)	-	-	-	-
<b>61.4 (duplikacija)</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (95.9%) T4 (39.394%) RB69 (36.4%)	-	-	-	-
<b>61.2</b>	Hipotetinis baltymas	RB32 (45.0%) T2 (44.7%)	<b>+</b>	-	-	-
<b><i>ORF039</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF030c (68.8%)	-	-	-	-
<b><i>sp</i> P<sub>E</sub></b>	Baltymas “spackle precursor “	JS98 (84.5%) RB69 (73.2%) T4 (69.1%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	-	-	-
<b>61.4</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (50.0%) T4 (41.7%)	<b>+*</b>	-	-	-
<b><i>ORF042</i></b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-

<i>dmd</i>	iRNR diskriminuojantis baltymas	JS98 (72.7%) RB69 (60.3%) T4 (58.3%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	+	-	-
<b>ORF044</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF034c (87.4%) RB69ORF040c (89.5%)	-	-	-	-
<b>ORF045</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<b>41</b>	DNR praimazė–helikazė	JS98 (80.2%) RB69 (66.7%) T4 (65.1%)	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>40</b>	Galvutės formavimo baltymas	T4 (46.3%) RB69 (40.4%) JS98 (77.6%)	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-
<i>uvsX</i> <b>P<sub>M</sub></b>	Rekombinacijos ir reparacijos baltymas	T4 (79.0%) RB69 (72.4%) JS98 (71.9%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-
_____	_____	_____	<i>segA/ P<sub>M</sub></i>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<i>β-gt</i>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>42/ P<sub>M</sub></b>	_____	_____	_____
<b>ORF049</b>	Hipotetinis baltymas.	JS98ORF043c (47.3%)	-	-	-	-
<i>g42.1</i>	Hipotetinis baltymas	RB69 (60.4%) T4 (50.0%) JS98 (52.9%)	<b>+</b>	-	-	-
<i>imm</i> <b>P<sub>E</sub></b>	Imuniteto baltymas	JS98 (73.1%) T4 (51.9%) RB69 (50.0%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	-	-	-
_____	_____	_____	<i>imm.1</i>	_____	_____	_____
<b>43</b> <b>P<sub>M</sub></b>	DNR polimerazė	JS98 (77.9%) RB69 (75.2%) T4 (60.1%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

<b>ORF053</b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF047c (83.1%) RB51ORF043c (54.0%) RB32ORF047c (46.0%)	-	-	-	-
<b>regA</b>	Transliacijos represorius	RB69 (86.9%) JS98 (86.1%) T4 (78.7%)	+	+	+	+
<b>62</b>	Žiedo užkėlėjo baltymų komplekso mažesnysis subvienetas	JS98 (68.2%) T4 (55.3%) RB69 (51.6%)	+	+	+	+
<b>44</b> <b>P<sub>M</sub></b>	Žiedo užkėlėjo baltymų komplekso didesnysis subvienetas	JS98 (80.1%) T4 (72.0%) RB69 (65.5%)	+	+	+	+
<b>45</b> <b>P<sub>M</sub></b>	Polimerazės procesyvumo veiksny (žiedas)	JS98 (71.7%) RB69 (62.0%) T4 (60.3%)	+	+	+	+
<b>rpbA</b>	Su RNRP sąveikaujantis baltymas	JS98 (78.4%) RB69 (66.1%) T4 (49.1%)	+	+	+	-
<b>45.2</b> <b>P<sub>M</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (76.2%) T4 (57.4%) RB69 (55.7%)	+	+	+	-
<b>46</b>	Rekombinacijos endonukleazė	JS98 (71.2%) T4 (70.7%) RB69 (65.8%)	+	+	+	+
—————	—————	—————	<b>46.1</b>	—————	—————	—————
<b>46.2</b> <b>P<sub>M</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (69.8%) RB69 (56.3%) T4 (43.9%)	+	-	-	-
<b>47</b> <b>P<sub>M</sub></b>	Egzonukleazės subvienetas	JS98 (72.2%) RB69 (71.2%) T4 (68.2%)	+	+	+	+
—————	—————	—————	<b>47.1</b>	—————	—————	—————

			<i>a-gt</i>			
			<i>mobB/ P<sub>M</sub></i>			
<i>a-gt.2</i>	Hipotetinis baltymas	JS98 (87.7%) T4 (64.2%) RB69 (57.7%)	+	-	-	-
<i>a-gt.3</i>	Hipotetinis baltymas	JS98 (90.9%) RB69 (47.1%) T4 (41.5%)	+	-	-	-
<i>a-gt.4</i>	Hipotetinis baltymas	JS98 (78.6%) T4 (42.4%) RB69 (45.9%)	+ <b>P<sub>M</sub></b>	+	+	-
<i>a-gt.5</i>	Hipotetinis baltymas	T4 (38.9%) JS98 (35.1%) RB69 (35.3%)	+	+	-	-
<b>55</b> <b>P<sub>M</sub></b>	RNR polimerazės sigma veiksnys	JS98 (90.2%) T4 (80.2%) RB69 (81.3%)	+ <b>P<sub>M</sub></b>	+	+	+
<b>ORF068</b>	Hipotetinis baltymas	RB69ORF072c (50.6%) JS98ORF064c (36.1%)	-	-	-	-
<b>55.1</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (81.7%) RB69 (56.3%) T4 (56.3%)	+	-	-	-
<b>ORF070</b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<b>55.2</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (54.1%) T4 (49.5%) RB69 (47.7%)	+	+	+	-
<b>55.3</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (87.7%) T4 (74.6%) RB69 (57.1%)	+	+	-	-

<b>55.4</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	T4 (95.3%) JS98 (93.0%) RB69 (92.7%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	-	-	-
<b>55.5</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (92.8%) RB69 (79.4%) T4 (74.2%)	<b>+</b>	-	-	-
<b>ORF075</b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF070c (92.9%) RB69ORF079c (39.5%)	-	-	-	-
<b>55.6</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	RB69 (56.7%) JS98 (50.8%) T4 (51.7%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	-	-	-
<b>nrdH</b>	Anaerobinės NDP reduktazės subvienetas	T4 (67.6%) JS98 (66.7%) RB69 (71.8%)	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-
<b>ORF078</b> <b>P<sub>M</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF073c (84.8%) RB69ORF082c (50.6%)	-	-	-	-
<b>55.8</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS10 (77.5%) T4 (40.3%) RB69 (40.0%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub> (1)/(2)</b>	-	-	-
_____	_____	_____	<b>nrdG/ P<sub>M</sub></b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-
_____	_____	_____	<b>mobC/ P<sub>M</sub></b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>nrdD/ P<sub>M</sub></b> <b>I-TevII (P<sub>L</sub>)</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-
<b>ORF080</b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<b>49</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Rekombinacijos endonukleazė VI	JS98 (84.7%) T4 (82.8%) RB69 (80.9%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>ORF082</b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF076c (91.2%) RB69ORF087c (55.2%)	-	-	-	-
<b>ORF083</b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-

<b>ORF084</b> <b>P<sub>E</sub></b> <b>P<sub>M</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF077c (87.7%) T4 PinA (46/161 (39.1%))	+/- <b>P<sub>E</sub></b>	-	-	-
<b>49.1</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (84.1%) T4 (63.6%)	+	-	-	-
—————	—————	—————	<b>49.2</b>	—————	—————	—————
<b>MobE</b>	Mobili endonukleazė	RB43 (36.3%)	+* (šioje pozicijoje nėra)	-	-	-
<b>49.3</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (85.1%) T4 (72.6%)	+	-	-	-
<b>ORF088</b>	Hipotetinis baltymas	-				
<b>nrdC</b> <b>P<sub>M</sub>(1)</b> <b>P<sub>M</sub>(2)</b>	Aerobinės NDP reduktazės subvienetas	JS98 (89.7%) RB69 (85.1%) T4 (83.9%)	+	+	+	-
<b>nrdC.1</b>	Hipotetinis baltymas	T4 (80.0%) JS98(76.9%)	+	-	-	-
<b>nrdC.2</b>	Hipotetinis baltymas	RB32 (62.0%) T4 (61.0%) JS98 (80.0%)	+	-	-	-
—————	—————	—————	<b>nrdC.3</b>	—————	—————	—————
<b>nrdC.4</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	T4 (49.1%) JS98 (83.3%) RB32 (48.4%)	+	-	-	-
<b>nrdC.5</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (51%) T4 (27.0%)	+	-	-	-
<b>ORF094</b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-

<b><i>nrdC.6</i></b> <b>P<sub>M</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (72.4%) T4 (43.0%) RB69 (29.6%)	+	-	-	-
_____	_____	_____	<b><i>nrdC.7</i></b> <b>P<sub>M</sub></b>	_____	_____	_____
<b><i>nrdC.8</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (77.0%) T4 (66.3%) RB69 (64.6%)	+	-	-	-
<b><i>nrdC.9</i></b>	Hipotetinis baltymas	RB69 (37.9%) T4 (34.8%) JS98 (28.2%)	+	-	-	-
_____	_____	_____	<b><i>nrdC.10</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	_____	_____	_____
<b><i>ORF098</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	RB69ORF102c (79.4%) JS98ORF121c (66.7%)	-	-	-	-
<b><i>ORF99</i></b>	Hipotetinis baltymas	_____	-	-	-	-
<b><i>ORF100</i></b>	Hipotetinis baltymas	_____	-	-	-	-
<b><i>nrdC.11</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (96.7%) T4 (96.7%) RB69 (69.0%)	+	+	+	-
<b><i>ORF102</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF092c (77.3%) RB69ORF104c(35.2%)	-	-	-	-
_____	_____	_____	<b><i>mobD</i></b> <b>P<sub>M</sub></b>	_____	_____	_____
<b><i>mobD.1</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (79.5%) T4 (33.2%) RB69 (30.6%)	+	-	-	-
_____	_____	_____	<b><i>mobD.2</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b><i>mobD.2a</i></b>	_____	_____	_____

<b>ORF104</b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF094c (54.8%) RB69ORF106c (46.5%)	-	-	-	-
<b>ORF105</b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<b>ORF106</b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF095c(90.6%) PHG31ORF130c (36.5%)	-	-	-	-
<b>mobD.3</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (90.0%) T4 (66.1%)	+ <b>P<sub>M</sub></b>	-	-	-
<b>mobD.4</b>	Hipotetinis baltymas	RB32 (61.5%) T4 (58.7%)	+	-	-	-
<b>ORF109</b>	Hipotetinis baltymas	<i>Chitinophaga pinensis</i> Cpin 4278 (38%)	-	-	-	-
<b>mobD.5</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	RB32 (49.2%) T4 (49.2%)	+ <b>P<sub>E</sub></b>	-	-	-
<b>mobD.7</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (82.7%) T4 (56.2%) RB49 (35.6%)	+	+	+	-
<b>rI</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Lizės inhibicijos reguliatorius	JS98 (40.6%) T4 (34.6%) RB69 (30.8%)	+	-	-	-
—————	—————	—————	<b>rI.1/ P<sub>L</sub></b>	—————	+	—————
<b>ORF113</b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF099 (51.7%)	-	-	-	-
<b>tk</b>	Timidinkinazė	JS98 (78.4%) T4 (71.6%) RB69 (70.0%)	+	+	+	-
—————	—————	—————	<b>tk.1</b>	—————	—————	—————
<b>tk.2</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (65.6%) RB69 (55.0%) T4 (55.7%)	+	-	-	-



<i>tk.3</i>	Hipotetinis baltymas	JS98 (88.6%) T4 (71.4%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	-	-	-
<i>tk.4</i>	Hipotetinis baltymas	JS98 (88.7%) RB69 (60.5%) T4 (58.7%)	+	+	+	-
<i>vs</i>	Valil-tRNR syntetazę modifikuojantis baltymas	JS98 (61.3%) RB69 (45.7%) T4 (45.5%)	+	+	-	-
<i>vs.1</i>	Hipotetinis baltymas	JS98 (77.7%) T4 (65.8%) RB69 (64.6%)	+	+	+	-
<b>regB</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Endoribonukleazė	JS98 (67.1%) RB69 (62.7%) T4 (59.7%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	+	-	-
<i>vs.3</i>	Hipotetinis baltymas	RB14 (73.3%) T4 (71.3%) RB32 (69.3%)	+	-	-	-
<i>vs.4</i>	Hipotetinis baltymas	Tu1a (100.0%) RB69 (100.0%) T4 (65.9%)	+	-	-	-
<i>vs.5</i>	Hipotetinis baltymas	JS98 (77.8%) RB32 (54.1%) RB69 (49.3%)	+	-	-	-
—————	—————	—————	<b>vs.6</b>	+	+	-
<i>vs7</i>	Hipotetinis baltymas	JS98 (74%) T4 (46.1%) RB69 (41.2%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	-	-	-
<i>vs.8</i>	Hipotetinis baltymas	JS98 (39.5%) T4 (38.0%) RB69 (36.5%)	+	-	-	-

<b><i>ip7</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF112c (94.9%) T2 Ip7 (47.0%) RB32 Ip7 (47.0%)	—*	—*	—*	—*
<b><i>ORF127</i></b>	Hipotetinis baltymas	RB69ORF125c (71.6%)	—	—	—	—
<b><i>ip10</i></b> <b>P<sub>M</sub></b>	Hipotetinis baltymas	Pol Ip10 (71.7%) RB69ORF124c (68.6%)	—*	—*	—*	—*
<b><i>denV</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	Endonukleazė	T4 (76.8%) JS98 (76.7%) RB69 (76.6%)	+	—	—	—
_____	_____	_____	<b><i>ipII</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b><i>ipIII</i></b> <b>P<sub>E</sub></b> <b>P<sub>M</sub></b>	_____	_____	_____
<b><i>e</i></b> <b>P<sub>L</sub></b>	Lizocimas	JS98(77.8%) T2 (69.8%) T4 (69.1%)	+	—	+	—
<b><i>nudE</i></b>	Nudix hidrolazė	RB69 (83.6%) JS98 (77.5%) T4 (63.0%)	+	—	—	—
<b><i>ORF132</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF118c (79.5%) RB69ORF130c(67.9%)	—	—	—	—
<b><i>e.2</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (80.5%) RB69 (26.6%) T4 (34.3%)	+	—	—	—
<b><i>ORF134</i></b>	Hipotetinis baltymas	RB69ORF132c(85.5%) JS98ORF120c (83.3%)	—	—	—	—
<b><i>ORF135</i></b>	Hipotetinis baltymas	<i>Pseudomonas</i> fagas D3 ORF78 (36%)	—	—	—	—

<b>ORF136</b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF122c (91.9%) RB69ORF134c (72.1%)	-	-	-	-
<b>ORF137</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	<i>Salmonella</i> fagas 5 ORF trn 2.19.-1 (40.4%)	-	-	-	-
<b>ORF138</b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF126c (90.5%) 44RR2.8tORF063c (42.6%)	-	-	-	-
<b>ORF139</b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<b>ORF140</b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF127c (98.5%) RB69ORF136c (55.2%)	-	-	-	-
<b>ORF141</b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF128c (86%) RB69ORF137c (55.7%)	-	-	-	-
<b>ORF142</b> <b>P<sub>M</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF129c (88.5%) RB69ORF139c (54.3%)	-	-	-	-
<b>e.3</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (82.1%) RB69 (30.1%) T4 (23.8%)	+	-	-	-
<b>e.4</b>	Hipotetinis baltymas	T4 (28.6%) RB69 (31.5%)	+	-	-	-
_____	_____	_____	<b>e.5</b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>e.6</b> <b>P<sub>E</sub></b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>e.7</b> <b>P<sub>E</sub></b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>e.8</b> <b>P<sub>E</sub></b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>segB</b>	_____	_____	_____
<b>ORF145</b>	Hipotetinis baltymas	_____	-	-	-	-
<b>ORF146</b>	Hipotetinis baltymas	_____	-	-	-	-

<b>ORF147</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> RPC 1770 (28%)	-	-	-	-
<b>ORF148</b>	Hipotetinis baltymas	BF23ORF172c (33.3%) T5ORF067c (28.2%) 44RRORF121c (27.2%)	-	-	-	-
<b>ORF149</b> <b>P<sub>M</sub></b>	Hipotetinis baltymas	_____	-	-	-	-
_____	_____	_____	<b>tRNA.2</b> <b>P<sub>M</sub> (i)</b>	_____	_____	_____
<b>tRNA.3</b> <b>P<sub>M</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (53.8%) T4 (50.0%) RB69 (39.4%)	+	-	-	-
<b>tRNA.4</b> <b>P<sub>E</sub></b> <b>P<sub>L</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (90.2%) T4 (65.6%) RB69 (65.6%)	+	-	-	-
_____	_____	_____	<b>ipI</b> <b>P<sub>E</sub></b>	_____	_____	_____
<b>ip6</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	T6 (76.6%)	-	-	-	-
<b>ORF153</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<b>ORF154</b>	Hipotetinis baltymas	RB69ORF125c (39.3%)	-	-	-	-
<b>ip9</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Hipotetinis baltymas	RB32 (78.9%) RB15 (77.8%) K3 (76.7%)	-	-	-	-
<b>ORF156</b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<b>57B</b>	Viriono surinkimo šaperonas	T4 (83.4%) JS98 (80.8%) RB69 (77.5%)	+	+	+	-

<b>57A</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Viriono surinkimo šaperonas	T4 (57.5%) JS98 (56.6%) RB69 (51.9%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub>/P<sub>L</sub></b>	+	+	-
<b>1</b> <b>P<sub>M</sub></b>	dNMP kinazė	T4 (47.7%) JS98 (47.0%) 44RR2.8t (36.4%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	+	+	-
<b>3</b>	Viriono struktūrinis baltymas	JS98 (79.7%) T4 (50.9%) RB69 (47.2%)	<b>+</b>	+	+	+
<b>mob(B/E)</b>	Hipotetinė mobili endonukleazė	RB32ORF146c (59.4%) T4 MobB (49.1%)	<b>+*</b>	-	-	-
<b>2</b>	DNR galus saugantis baltymas	JS98 (77.5%) T4 (70.8%) RB69 (70.0%)	<b>+</b>	+	+	+
<b>4</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Viriono galvutės formavimo baltymas	JS98 (83.9%) T4 (63.8%) RB69 (59.7%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	+
<b>53</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Bazinės plokštelės baltymas	JS98 (80.0%) RB69 (66.3%) T4 (64.3%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b> <b>P<sub>L</sub>(w)</b>	+	+	+
<b>5</b>	Lizocimas	JS98 (89.0%) RB69 (66.0%) T4 (64.5%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	+
<b>5.1</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (85.4%) RB69 (70.2%) T4 (71.3%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	-
_____	_____	_____	<b>segC</b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>5.3</b>	_____	_____	_____

<b>5.4</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (93.8%) T4 (90.7%) RB69 (86.6%)	+	+	+	-
<b>6</b>	Bazinės plokštelės baltymas	JS98 (87.4%) T4 (68.4%) RB69 (68.4%)	+	+	+	+
<b>7</b>	Bazinės plokštelės baltymas	JS98 (79.6%) T4 (63.7%) RB69 (63.1%)	+	+	+	-
<b>8</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Bazinės plokštelės baltymas	JS98 (83.2%) RB69 (72.2%) T4 (70.1%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	+
<b>9</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Bazinės plokštelės baltymas	JS98 (53.3%) T4 (48.3%) RB69 (46.7%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	-
<b>10</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Bazinės plokštelės baltymas	JS98 (63.5%) T4 (54.5%) RB69 (53.8%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	-
<b>11</b>	Bazinės plokštelės baltymas	JS98 (69.1%) RB69 (36.1%) T4 (33.8%)	+	+	+	-
<b>12</b>	Trumpųjų uodegėlės ataugėlių baltymas	JS98 (65.4%) RB69 (45.7%) T4 (45.4%)	+	+	+	+
<b>wac</b>	“Whisker antigen control” / galvutės pamato baltymas	JS98 (55.6%) T4 (36.5%) RB69 (37.3%)	+	+	+	-
<b>13</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Kakliuko baltymas	JS98 (88.2%) RB69 (64.5%) T4 (63.8%)	+	+	+	+

<b>14</b>	Kakliuko baltymas	JS98 (74.3%) T4 (66.8%) RB69 (64.2%)	+	+	+	+
<b>15</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Uodegėlės prijungėjas	JS98 (81.2%) RB49 (56.9%) T4 (56.3%)	+	+	+	+
<b>16</b>	DNR pakavimo baltymas	JS98 (90.1%) RB69 (79.6%) T4 (76.5%)	+	+	+	+
<b>17</b>	DNR pakavimo baltymas	JS98 (86.3%) RB69 (8.5%) T4 (81.0%)	+	+	+	+
<b>18</b> <b>P<sub>L</sub>(1)</b> <b>P<sub>L</sub>(2)</b>	Uodegėlės baltymas	JS98 (90.1%) RB69 (71.1%) T4 (71.3%)	+	+	+	+
<b>19.1</b>	Hipotetinis baltymas	T6 (59.5%)	-	-	-	-
<b>19</b> <b>P<sub>L</sub>(1)</b> <b>P<sub>L</sub>(2)</b>	Uodegėlės baltymas	JS98 (91.4%) KPP95 (82.8%) T4 (69.9%)	+	+	+	+
<b>20</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Galvutės struktūrinis baltymas	JS98 (87.4%) T4 (75.0%) RB49 (57.7%)	+	+	+	+
<b>67</b>	“Prehead core” baltymas	JS98 (68.5%) T4 (56.3%) RB69 (57.7%)	+	+	-	-
<b>68</b>	“Prehead core” baltymas	JS98 (74.6%) T4 (67.4%) RB69 (63.1%)	+	+	+	-

<b>21</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Proteazē	JS98 (88.9%) T4 (88.9%) RB69 (86.7%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	+
<b>22</b> <b>P<sub>L</sub></b>	“Major prohead scaffolding core” baltymas	JS98 (86.8%) T4 (74.1%) RB69 (70.8%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	+
<b>23</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Didysis kapsidēs baltymas	JS98 (97.3%) T4 (84.9%) RB69 (83.8%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub>/ P<sub>L</sub>(w)</b>	+	+	+
—————	—————	—————	<b>segD</b>	—————	—————	—————
<b>ORF190</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF173c (64.4%)	—	—	—	—
<b>24(1)</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Kapsidēs baltymas	JS98 (89.2%) Gp24(1) T4 (70.4%) RB69 (70.4%)	<b>+*</b> <b>P<sub>L</sub></b>	<b>+*</b>	<b>+*</b>	—
<b>24(2)</b>	Kapsidēs baltymas	JS98 (81.1%) Gp24(2) T4 (63.8%) RB69 (60.4%)	<b>vienas g24</b>	<b>vienas g24</b>	<b>vienas g24</b>	<b>vienas g24</b>
<b>rnIB</b> <b>P<sub>M</sub></b>	RNR ligazē	T4 (82.9%) RB69 (75.4%) JS98 (71.9%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	—	<b>+</b> <b>(2 ASR)</b>	—
<b>24.2</b>	Hipotetinis baltymas	T4 (32.6%) RB69 (26.4%)	<b>+</b>	—	—	—
<b>24.3</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (79.4%) RB69 (54.1%) RB49 (46.3%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	+	—	—
<b>ORF196</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Hipotetinis baltymas	<i>Bacillus cereus</i> BCE_G9241_4821 (38%)	—	—	—	—
<b>hoc(W)</b>	Hipotetinis baltymas	RB69 (29.5%) T4 (29.0%) JS98 (26.5%)	<b>-*</b>	<b>-*</b>	—	—



<i>hoc</i>	Išorinis kapsidės baltymas	JS98 (48.9%) RB69 (39.8%) T4 (45.0%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	+	-	-
<i>inh</i> <b>P<sub>L</sub></b>	Proteazės <i>inh</i> ibitorius	JS98 (63.9%) T4 (60.0%) RB69 (59.6%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	-
—————	—————	—————	<i>segE/ P<sub>L</sub></i>	—————	—————	—————
<i>uvsW</i> <b>P<sub>L</sub></b>	Helikazė, ATP–azė	JS98 (84.2%) RB69 (72.1%) T4 (71.4%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	+
<i>uvsW.1</i>	Hipotetinis baltymas	JS98 (84.0%) RB69 (68.1%) 44RR2.8t (63.5%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	-
<i>uvsY.-2</i> <b>P<sub>L</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (85.5%) RB69 (81.8%) T4 (80.0%)	<b>+</b>	+	-	-
—————	—————	—————	<i>uvsY.-1</i>	—————	—————	—————
<i>uvsY</i> <b>P<sub>M</sub></b>	Rekombinacijos baltymas	JS98 (84.0%) RB69 (63.9%) T4 (60.6%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	+	+	+
<b>25</b>	Bazinės plokštelės baltymas	JS98 (86.8%) T4 (63.8%) RB69 (63.0%)	<b>+</b>	+	+	+
<b>26</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Bazinės plokštelės baltymas	JS98 (61.0%) T4 (49.8%) RB69 (46.8%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	+
<b>51</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Bazinės plokštelės baltymas	JS98 (69.6%) RB69 (59.4%) T4 (52.2%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	-	-
<b>27</b>	Bazinės plokštelės baltymas	JS98 (87.9%) T4 (62.8%) RB69 (62.7%)	<b>+</b>	+	-	-

<b>28</b>	Bazinės plokštelės baltymas	JS98 (71.5%) T4 (52.8%) RB69 (49.4%)	+	+	-	-
<b>29</b>	Uodegėlės surinkimo baltymas	JS98 (71.4%) RB69 (34.6%) T4 (34.9%)	+	+	-	-
<b>48</b>	Uodegėlės surinkimo baltymas	JS98 (78.6%) T4 (59.7%) RB69 (60.9%)	+	+	+	-
<b>54</b>	Uodegėlės surinkimo baltymas	JS98 (85.0%) RB69 (65.6%) T4 (65.5%)	+	+	+	-
<b>alt.-3 P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (87.5%) T4 (59.4%) RB69 (49.5%)	+	-	-	-
_____	_____	_____	<b>alt.-2</b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>alt.-1</b>	_____	_____	_____
<b>alt P<sub>L</sub></b>	Kapsidės baltymas /ADF-riboziltransferazė	T4 (35.4%) JS98 (38.5%) RB69 (34.6%)	+	+	+	-
_____	_____	_____	<b>alt.1</b>	_____	_____	_____
<b>30 P<sub>M</sub></b>	DNR ligazė	T4 (68.6%) RB69 (65.8%) JS98 (64.5%)	+	+	+	-
<b>30.1</b>	Hipotetinis baltymas	RB69 (48.3%) T4 (45.1%) JS98 (44.4%)	+	-	-	-
<b>30.2 P<sub>M</sub></b>	Hipotetinis baltymas	T4 (67.6%) RB69 (66.8%) JS98 (73.8%)	+	-	+	-

<b>30.3'</b>	Hipotetinis baltymas	RB3 (64.9%) T4 (58.1%)	+	+	-	-
<b>30.3</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (88.2%) RB32 (85.5%) T4 (84.9%)	+	+	+	-
<b>30.4</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (81.7%) T4 (46.3%)	+	-	-	-
<b>30.5</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (92.2%) T4 (72.6%)	+	-	-	-
<b>30.6</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (85,3%) T4 (82.1%)	+	-	-	-
<b>30.7</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	RB69 (93,4%) T4 (90.9%) JS98 (90.9%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	-	-	-
<b>30.8</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	RB69 (55.5%) T4 (40.0%) JS98 (39.5%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	-	-	-
<b>30.9</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (94.3%) RB69 (70.0%) T4 (65.4%)	+	-	-	-
<b>rIII</b>	Lizės inhibicijoje dalyvaujantis baltymas	JS98 (80,3%) T4 (61.39%)	+	-	+	-
<b>31</b> <b>P<sub>M</sub></b> <b>P<sub>L</sub>(i)</b>	Kapsidės surinkimo baltymas	JS98 (91.2%) RB69 (77.2%) T4 (76.9%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b> <b>P<sub>L</sub>(i)</b>	+	+	-
<b>31.1</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (89.9%) RB69 (54.5%) T4 (45.4%)	+	+	+	-

<b>31.2</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (63.6%) T4 (56.4%)	+	-	-	-
<b>cd P<sub>M</sub></b>	Deoksicitidilataminazė	T4 (86.0%) RB69 (74.5%) JS98 (65.8%)	+	+	+	-
<b>cd.1</b>	Hipotetinis baltymas	T4 (54.5%) RB32 (50.5%)	+	-	-	-
<b>cd.2</b>	Hipotetinis baltymas	RB69 (77%) JS98 (70.1%) T4 (56.5%)	+	-	-	-
<b>ORF232 P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF212c (46.8%) RB32ORF214c (26.2%)	-	-	-	-
<b>cd.3</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (83.7%) RB69 (46.7%) T4 (43.5%)	+	-	-	-
<b>ORF234</b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF214c (63.4%) RB69ORF227c (69.0%)	-	-	-	-
<b>cd.4 P<sub>L</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (80.0%) T4 (56.1%) RB69 (42.9%)	+	-	-	-
			<b>cd.5</b>			
<b>mobE(w) P<sub>L</sub></b>	Hipotetinis baltymas	RB32ORF054w (37.2%) LZ7 MobE (33.8%) T4 MobE (37.4%)	+	-	-	-
<b>pseT</b>	Polinukleotid 5'-hidroksil kinazė	JS98 (91.4%) T4 (87.0%) RB69 (72.8%)	+	+	+	-

			<i>pseT.1</i> <b>P<sub>E</sub></b>			
<b>ORF238</b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF217c (78.3%) RB32ORF217c (53.8%) RB69ORF231c (53.8%)	-	-	-	-
<b>ORF239</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<i>pseT.2</i>	Hipotetinis baltymas	RB69 (64.9%) JS98 (67.7%) T4 (62.2%)	+	+	+	-
<i>pseT.3</i>	Hipotetinis baltymas	T4 (47.0%) RB69 (44.3%) JS98 (34.2%)	+	+	+	-
<i>alc</i> <b>P<sub>E</sub></b>	Su ląstelės šeimininkės RNRP ir DNR sąveikaujantis baltymas	T4 (57.2%) JS98 (47.9%) RB69( 49.1%)	+	-	-	-
<b>ORF243</b>	Hipotetinis baltymas	T4 alc (49.1%) RB69 alc (40.6%) JS98 alc (39.1%)	+* <b>(viena geno alc kopija)</b>	-	-	-
<i>rnIA</i>	RNR ligazė	JS98 (44.6%) RB69 (44.1%) T4 (35.7%)	+	+	+	-
<i>denA</i>	DenA endonukleazė	JS98(77.4%) T4 (73.5%)	+	+	+	-
<i>nrdB</i> <b>P<sub>M</sub></b>	Aerobinės NDP reduktazės subvienetas	JS98 (89.7%) RB69 (88.0%) T4 (86.6%)	+	+	+	+
			<b>P<sub>M</sub>; P<sub>M</sub> (i); P<sub>L</sub>(i) I-TevIII</b>			
*	*	*	<b>mobE</b>		+	

<b><i>nrdA</i></b> <b>P<sub>M</sub></b> <b>P<sub>L</sub></b>	Aerobinės NDP reduktazės subvienetas	JS98 (92.5%) T4 (97.2%) RB69 (84.0%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	+	<b>+</b> <b>(du ASR)</b>	+
_____	_____	_____	<b><i>nrdA.1</i></b>	_____	+	_____
_____	_____	_____	<b><i>nrdA.2</i></b>	_____	_____	_____
<b><i>td</i></b> <b>P<sub>M</sub></b>	Timidilat sintetazė	RB69 (67.5%) JS98 (68.5%) T4 (64.8%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b> <b><i>I-TevI/P<sub>L</sub></i></b>	+	+	-
<b><i>frd</i></b>	Dihydrofoliat reduktazė	T4 (65.8%) JS98 (65.5%) RB69 (57.9%)	<b>+</b>	+	+	-
<b><i>ORF250</i></b>	Hipotetinis baltymas	RB32ORF231c (38.2%)	-	-	-	-
<b><i>ORF251</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF228c (93.8%)	-	-	-	-
<b><i>frd.1</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (93.7%) T4 (72.2%) RB69 (71.8%)	<b>+</b>	-	-	-
<b><i>frd.3</i></b> <i>(translokacija)</i> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (93.3%) T4 (72.0%) RB69 (52.0%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	-	-	-
<b><i>ORF254</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF232c (92.9%)	-	-	-	-
<b><i>frd.2</i></b> <i>(translokacija)</i> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (68.0%) RB69 (36.4%) T4 (36.7%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	-	-
<b>32</b> <b>P<sub>M</sub>(1)</b> <b>P<sub>M</sub>(2)</b>	Viengrandinę DNR surišantis baltymas	JS98 (70.9%) RB69 (64.4%) T4 (61.0%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	+

<b>32.1 (SegG)</b> <b>P<sub>M</sub></b> <b>P<sub>M</sub>(i)</b> <b>P<sub>L</sub></b>	DNR endonukleazė	T4 (53.9%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	-	-	-
<b>59</b>	DNR helikazę užkeliantis baltymas	JS98 (86.2%) RB69 (75.6%) T4 (74.7%)	+	+	+	-
<b>33</b>	Su RNRP sąveikaujantis baltymas	JS98 (70.0%) RB69 (61.5%) T4 (64.1%)	+	+	+	+
<b>dsbA</b> <b>P<sub>M</sub>(1)</b> <b>P<sub>M</sub>(2)</b>	Su dsDNR asocijuojantis baltymas	JS98 (78.3%) T4 (58.8%) RB69 (56.0%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub>(1)</b> <b>P<sub>M</sub>(2)</b>	+	+	-
<b>rnh</b>	RNazėH	JS98 (78.9%) T4 (55.6%) RB69 (53.7%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	+	+	+
<b>34</b> <b>P<sub>M</sub>(i)</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Didysis uodegos ataugėlių altymas	T4 (59.5%) JS98 (65.0%) RB69 (53.7%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub>(i)</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	?
<b>35</b>	Uodegos ataugėlių baltymas	JS98 (66.0%) RB69 (44.1%) T4 (44.5%)	+	+	+	?
<b>36</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Ilgųjų uodegos ataugėlių baltymas	JS98 (72.1%) T4 (43.0%) RB69 (40.7%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	?
<b>37</b> <b>P<sub>L</sub></b>	Ilgųjų uodegos ataugėlių baltymas	T4 (69.8%) RB69 (32.7%) JS98 (32.8%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	+	?
<b>38</b>	Uodegos ataugėlių surinkimo baltymas	T4 (88.3%)	+	+*	-	-

<b><i>t</i></b> <b>P<sub>L</sub></b>	Lizės baltymas	JS98 (97.7%) RB69 (58.8%) T4 (52.8%)	<b>+</b> <b>P<sub>L</sub></b>	+	-	-
<b><i>asiA</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	Anti-sigma veiksnys	JS98 (98.9%) T4 (51.1%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	-	+	-
_____	_____	_____	<b><i>asiA.1</i></b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b><i>arn</i></b>	_____	_____	_____
<b><i>ORF269</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF247c (90.7%) RB69ORF258c (33.3%)	-	-	-	-
<b><i>ORF270</i></b>	Hipotetinis baltymas	RB32ORF249c (86.8%) JS98ORF248c (82.1%) RB43ORF288c (71.4%)	-	-	-	-
<b><i>arn.1</i></b>	Hipotetinis baltymas	RB69 (58.5%) T4 (70.3%)	+	-	-	-
<b><i>arn.2</i></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (83.1%) RB69 (62.0%) T4 (42.2%)	+	-	-	-
<b><i>arn.3</i></b>	Hipotetinis baltymas	RB69 (79.1%) JS98 (78.4%) T4 (69.9%)	+	-	-	-
<b><i>ORF274</i></b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<b><i>arn.4</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (84.5%) T4 (75.5%) RB69 (74.5%)	+	-	-	-
<b><i>motA</i></b>	Vidurinę transkripciją aktyvinantis baltymas	JS98 (40.3%) RB69 (40.8%) T4 (33.8%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	-	-	-
_____	_____	_____	<b><i>motA.1</i></b>	_____	_____	_____
<b><i>ORF277</i></b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	_____	-	-	-	-
<b><i>ORF278</i></b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-



<b>52</b> <b>P<sub>M</sub></b>	DNR topoizomerazė	T4 (69.4%) RB69 (68.0%) JS98 (68.3%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	+	+	-
<b>52.1</b>	Hipotetinis baltymas	T4 (87.0%) JS98 (82.6%) RB69 (73.9%)	+	-	-	-
_____	_____	_____	<b>ac</b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>stp</b>	_____	_____	_____
<b>ORF281c</b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<b>ndd</b> <b>P<sub>E</sub></b>	<u>N</u> uclear <u>d</u> isruption baltymas	JS98 (74.5%) RB69 (59.7%) T4 (61.7%)	+	-	+	-
<b>ORF283c</b>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<b>ndd.1</b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (92.6%) RB69 (51.5%) T4 (51.4%)	+	-	-	-
_____	_____	_____	<b>ndd.2</b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>ndd.2a</b>	_____	_____	_____
<b>ndd.3</b>	Hipotetinis baltymas	RB32 (38.9%) T4 (47.6%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub></b>	-	-	-
<b>ndd.4</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98 (86.1%) T4 (61.1%) RB32 (61.1%)	<b>+</b> <b>P<sub>E</sub></b>	-	-	-
_____	_____	_____	<b>ndd.5</b>	_____	_____	_____
_____	_____	_____	<b>ndd.6</b> <b>P<sub>E</sub></b>	_____	_____	_____
<b>ORF287c</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	JS98ORF262c (73.9%) RB69ORF270c (29.1%)	-	-	-	-
<b>ORF288c</b> <b>P<sub>E</sub></b>	Hipotetinis baltymas	<i>Staphylococcus fagas</i> G1 (36%)	-	-	-	-

<i>denB</i>	Endonukleazė IV	T4 (44.1%) JS98 (46.8%) RB69 (46.8%)	+	+	+	-
<i>ORF290</i>	Hipotetinis baltymas	RB69ORF272c (65.2%) JS98ORF264c (36.5%)	-	-	-	-
<i>denB.1</i>	Hipotetinis baltymas	JS98 (89.2%) T4 (50.8%)	+	-	-	-
<i>ORF292c</i>	Hipotetinis baltymas	-	-	-	-	-
<i>rIIB</i> <b>P<sub>M</sub>(1)</b> <b>P<sub>M</sub>(2)</b>	Su ląstelės šeimininkės ATF-aze sąveikaujantis baltymas	JS98 (77.7%) T4 (64.2%) RB69 (60.6%)	<b>+</b> <b>P<sub>M</sub>(1)</b> <b>P<sub>M</sub>(2)</b>	+	+	-

**Paaiškinimai:**

(+) – fago genome homologas koduojamas;

(-) – fago genome artimą baltymą koduojančio geno nėra;

(?) – genas koduoja ne artimą, o analogišką baltymą;

(+\*) – žymi geno pozicijos arba kiekybinį neatitikimą;

Du ASR – baltymą koduoja du atskiri genai;

Pilkas fonas – esminiai bakteriofago T4 genai;

Visų nurodytų baltymų (išskyrus rezultatų apžvalgos 1 ir 2 lentelėse minimų kai kurių baltymų) panašumo VR7 baltymams koeficiento E vertė  $<10^{-4}$ .

## PRIEDAS NR 2

Bakteriofagų VR7, T4 bei JS98 genominės DNR palyginimas, atliktas Artemis programa (Carver ir kiti, 2008; [www.webact.org](http://www.webact.org)). Raudona spalva žymi homologines sritis, mėlyna – invertuotas homologines sritis.

