

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Mikrobiologijos studijų programos magistrantas

Eugenijus ŠIMOLIŪNAS

Magistrinis darbas

**Naujų *Salmonella* ir *Klebsiella* bakteriofagų
charakterizavimas**

Darbo vadovė:
Dr. Lidija Truncaitė

Vilnius 2011

Naujų *Salmonella* ir *Klebsiella* bakteriofagų charakterizavimas

Darbas atliktas
Biochemijos instituto Genų inžinerijos skyriuje

Eugenijus ŠIMOLIŪNAS

Darbo vadovė:

Dr. L. TRUNCAITĖ

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1 Bakteriofagai.....	7
1.1.1 Morfologija, fiziologija, paplitimas.....	7
1.1.2 Praktinė taikomoji reikšmė	9
1.1.3 Identifikavimas, charakterizavimas ir klasifikacija.....	11
1.2 Taksonominės grupės	13
1.2.1 Uodeguotieji fagai	14
1.2.2 <i>Myoviridae</i> šeimos bakteriofagai	16
1.2.3. T4-tipo bakteriofagai	17
1.3 Genų sekos tarptautinėse duomenų bazėse.....	19
1.3.1 Bakteriofagų genomai.....	19
1.3.2 T4-tipo bakteriofagų genomai.....	20
1.3.3 <i>Salmonella</i> ir <i>Klebsiella</i> bakteriofagų genomai	21
1.4 Bakteriofagai VinS9 ir RaK2.....	22
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	24
2.1 Tyrimo objektai, darbe naudoti prietaisai, medžiagos ir reagentai	24
2.1.1. Tyrimo objektai	24
2.1.2. Prietaisai.....	24
2.1.3 Reagentai, fermentai, molekulinės biologijos rinkiniai, oligonukleotidai	24
2.1.4 Mitybinės terpės, tirpalai ir jų paruošimas.....	25
2.2 Metodai.....	25
2.2.1 Lastelių auginimas.....	25
2.2.2 Bakteriofagų dauginimas	25
2.2.3 Fagų genominės DNR išskyrimas ir gryninimas.....	26
2.2.4 DNR fragmentų padauginimas PGR metodu.....	26
2.2.5 DNR elektroforezė agarozės gelyje.....	27
2.2.6 DNR fragmentų valymas ir klonavimas	27
2.2.7 Plazmidinės DNR skyrimas	28
2.2.8 Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje.....	28
2.2.9 DNR sekų nustatymas.....	28
2.2.10 DNR sekų analizė	29
2.2.11 Genominės DNR demetilinimas.....	29
2.2.12 Plazmidžių konstravimas	29
2.2.13 Funkcijos komplementacijos tyrimai.....	29
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	30
3.1 VinS9 genomo fragmentų sekų analizė	30
3.2 RaK2 genomo sekų analizė.....	33
3.3 Genominės DNR metilinimo tyrimai	37
3.4 Virionų struktūrinių baltymų analizė	39
3.5 Esminių replikacinių genų palyginamieji tyrimai, komplementacijos eksperimentai ...	42
IŠVADOS.....	46
SANTRAUKA.....	47
SUMMARY	48
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	49

SANTRUMPOS

a.r. - aminorūgštis

ASR - atviro skaitymo rėmeliai

bp - bazių pora

CFP - kubinių, filamentinių ar pleomorfinių fagų grupė

EBI - Europos Bioinformatikos institutas

EDTA - etilendiaminotetraacto rūgštis

EMBL - Europos Molekulinės biologijos laboratorija

HMC - hidroksimetilcitozinas

ICTV - Tarptautinis Virusų taksonomijos komitetas

kb - kilobazė

LB - Luria-Bertani terpė

MRSA - meticilinui atsparus *Staphylococcus aureus*

NCBI - Nacionalinis Biotechnologijos informacinis centras

ORF - atviro skaitymo rėmelis

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PNK - polinukleotidkinazė

REzė - restrikcijos endonukleazė

SDS PAGE - natriododecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė

TAE - tris/acetato/EDTA buferis

TBE - tris/borato/EDTA buferis

tmRNR - transportinė informacinė RNR

TRIS - tris(hidroksimetil)aminometanas

VRE - vankomicinui atsparūs enterokokai

IVADAS

Bakteriofagai (fagai) – virusai, infekuojantys bakterijas. Pastaraisiais metais jaučiamas nemažas susidomėjimas šia gyvybės forma. Ieškoma fagų, kaip galimų vienu iš kovos priemonių prieš patogenines, didelius nuostolius veterinarijos, maisto, žuvininkystės pramonėje bei medicinoje atnešančias bakterijas, panaudojimo galimybių. Taip pat tiriamas ir jų pritaikymas šiuolaikinių biotechnologijų srityje. Dėl unikalių savo genetinių, morfologinių ir fiziologinių ypatybių fagais domimasi kaip: baltymiais nešikliais vakcinoms ir diagnostikai, naujais galimais genų raiškos vektoriais, naujų fermentų bei gerai organizuotų makromolekulių šaltiniais nanobiotechnologijoms ir daugelyje kitų sričių.

Anksčiau minėtose srityse, ypač medicinoje, neretai keliami aukšti saugumo reikalavimai naudojamiems objektams. Norint pasirinkti saugius, geriausiai konkrečiam tikslui tinkamus variantus bei numatyti jų tikslias pritaikymo galimybes, būtini išsamūs pasirinktųjų bakteriofagų morfologiniai, fiziologiniai ir ypač genetiniai tyrimai, nes nežinant kokie genų produktai ir jų raiškos reguliavimo mechanizmai yra koduojami genome, tolimesnis praktinis tokių virusų taikymas minėtose srityse iš esmės yra neįmanomas.

Deja, šiuo metu žinoma tik nedidelė dalis visų gamtoje egzistuojančių bakteriofagų, iš kurių visavertiškai identifikuoti (su pilnai nustatytais genomo sekomis) yra tik ~ 10 %, todėl akivaizdu, kad esama situacija realiai neatspindi tikrosios bakterijų virusų genetinės įvairovės ir jų pritaikymo galimybių. Juolab, kad šiuo metu NCBI duomenų bazėje esančių bakteriofagų, infekuojančių skirtingas ląsteles-šeimininkes, kiekybinė sudėtis pasiskirsčiusi nevienodai. Pavyzdžiui, pateikiami 77 enterobakterijų, 72 mikobakterijų, 55 stafilokokų virusų genomai su pilnai nustatytais sekomis, tuo tarpu atitinkamų *Salmonella* fagų genomų tėra 15, *Klebsiella* bakterijas infekuojančių virusų – 5.

Šio darbo metu buvo atliekami tyrimai su dviem naujais, Lietuvoje išskirtais, virulentiniais bakteriofagais - VinS9 ir RaK2. VinS9 fagas infekuoja *Salmonella enterica* ser. Typhimurium bakterijas, jo genomo dydis ~150 kb. RaK2 ląstelės-šeimininkės - *Klebsiella pneumonia* K3 kamieno bakterijos, fago genomo dydis ~ 350 kb.

Magistrinio darbo tikslas ir uždaviniai

Tikslas:

Bakteriofagų VinS9 ir RaK2 charakterizavimas genetiniais ir biocheminiais metodais.

Uždaviniai:

- Nustatyti VinS9 ir RaK2 genominės DNR ar jos fragmentų nukleotidų sekas;
- Palyginti gautas sekas su tarptautinėse duomenų bazėse esančiomis genų bei baltymų sekomis ir, atlikus genomų sekų bioinformacinę analizę, nustatyti:
 - a) galimas genų koduojamų baltymų funkcijas;
 - b) genetinį panašumą su kitais bakteriofagais;
- Nustatyti, ar bakteriofagų VinS9 ir RaK2 genominė DNR yra metilinta;
- Atlikti fagų virionų pagrindinių struktūrinių baltymų palyginamuosius tyrimus;
- Atlikti esminių funkcinių genų palyginamuosius bei jų funkcijos komplementacijos tyrimus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Bakteriofagai

1.1.1 Morfologija, fiziologija, paplitimas

Bakteriofagai (fagai) – virusai, infekuojantys bakterijas. Fagai, kaip ir eukariotų (augalų, gyvūnų ir grybų) virusai, pasižymi didele funkicine ir struktūrine įvairove. Tipinę bakteriofagų struktūrą sudaro: nukleino rūgštys ir jas gaubiantis išorinis baltyminis sluoksnis - kapsidė. Ši baltyminė struktūra apsaugo viruso genetinę medžiagą nuo neigiamų aplinkos faktorių ir užtikrina efektyvų jos patekimą į infekuojamų bakterijų vidų.

Daug bakteriofagų be nukleino rūgščių ir baltymų dar turi ir fosfolipidų bisluoksnį. Paprastai šis sluoksnis dengia baltyminę kapsidę iš išorės ir yra reikalingas virionui pasišalinant iš ląstelės-šeimininkės organelių į citoplazmą ar iš ląstelės į išorinę aplinką. Kai kurių virusų lipidinis bisluoksnis yra kapsidės vidinėje dalyje, pvz., *Tectiviridae* šeimos faguose (Bamford, 2005 (a)).

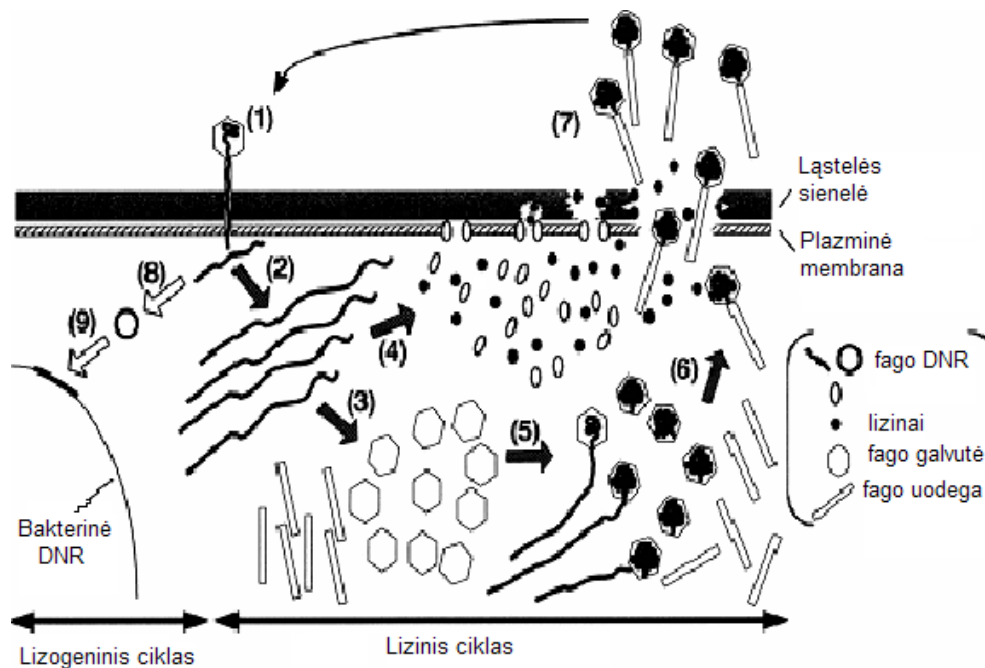
Bakteriofagų genetinė medžiaga yra DNR (daugumos) arba RNR: viengrandininė arba dvigrandininė forma, žiedinė arba linijinė, su arba be grandinės galuose prisitvirtinusiems baltymais (Ackerman, 2005). Dauguma fagų yra žymiai atsparesni fiziniams ir cheminiams faktoriams nei žmonių virusai. Bakteriofagai inaktyvuojasi esant aukštai (60-70°C), bet yra atsparūs ilgalaikėms žemoms temperatūroms. Šie virusai taip pat jautrūs rūgštinei aplinkai (Meipariani, 2009).

Fagai yra labai plačiai paplitę ir randami visose šeimininkų užimamose nišose: dirvožemyje, vandenyje, gyvūnų virškinamajame trakte ir kitose bakterijų ekologinėse nišose. Bendras jų skaičius biosferoje gali svyruoti nuo 10^{30} iki 10^{32} vnt. (Kutter ir Sulakvelidze, 2004). Vienas iš gausiausių natūralių bakteriofagų ir kitų virusų šaltinių yra jūros vanduo, kurio paviršiuje fagų koncentracija gali siekti iki 6×10^6 vnt/ml (Wommack ir Colwel, 2000), o infekuotų bakterijų skaičius sudaryti iki 70% (Prescott, 1993).

Bakteriofagai, pagal jų dauginimosi ciklus, yra skirstomi į lizinius ir lizogeninius. Liziniams fagams būdingas pasikartojantis ciklas su sinchroniniu pasidauginimu, kurio metu sunaikinama bakterija (lizinis ciklas, būdingas, pavyzdžiui, T-tipo fagams). Tuo tarpu lizogeninių fagų dauginimosi ciklo metu viruso genomas integruojasi į bakterijos genomą, replikuojasi kartu su juo ir nepadarо didesnės žalos šeimininko ląstelei (lizogeninis ciklas, būdingas tokiems fagams kaip ϕ MR11 ir λ). Pastarieji fagai yra vadinami nuosaikiais, o bakterijų padermės, kuriose ilgą laiką gali būti integruotas virusų genomas – lizogenais.

Tokios bakterijos yra atsparios nuosaikiesiems giminingiems fagams (Matsuzaki ir kt., 2005). Nuosaikieji fagai neveiklūs išlieka sveikose, nesutrikusios medžiagų apykaitos

ląstelėse. Metabolizmo sutrikimo atvejais, „įjungiamas“ fago DNR replikacijos mechanizmas. Vienas iš signalų, aktyvuojančių iki tol neveiklių fagų, kurie dar vadinami profagais, yra maisto medžiagų išsekimas ląstelėje (Matsuzaki ir kt., 2005). Abiejų tipų bakteriofagų dauginimosi ciklai pavaizduoti žemiau esančiame 1.1 paveiksle.



1.1 pav. Faginės infekcijos schematinė iliustracija (Matsuzaki ir kt., 2005) (1) Prisitvirtinimas ir DNR išvirkštymas; (2) DNR replikacija; (3) Galvutės ir uodegėlės produkcija; (4) Holino ir lizino sintezė; (5) DNR pakavimas; (6) Fago dalelių surinkimas; (7) Ląstelės sienelės suardymas ir naujų fagų pašalinimas; (8) Fago DNR pavertimas žiedine (9) Fago DNR įsiterpimas į bakterijos genomą.

Bakteriofagų dauginimosi ciklą sudaro šie etapai: prisitvirtinimas ir adsorbcija prie ląstelės – šeiminkės, įsiskverbimas ir išsipakavimas, viruso baltymų ir nukleino rūgščių sintezė, naujų virionų surinkimas ir brendimas, galiausiai – pašalinimas iš ląstelės.

Prisitvirtinimui ir adsorbcijai yra reikalingos specifinės ląstelių-šeiminkės bei bakteriofagų paviršiuje esančios baltyminės struktūros, kurios apsprendžia fagų atrankų specifškumą tam tikrai bakterijų padermei. Įsiskverbimo ir išsipakavimo metu virusai įveda savo genomą į ląstelės-šeiminkės vidų. Genetinės medžiagos pernešimo mechanizmai ir struktūros yra labai įvairūs ir priklauso nuo konkretaus fago. Virusinių baltymų ir nukleino rūgščių sintezė žymi viruso replikacijos pradžią. Susintetinti virusiniai baltymai ir fermentai padeda mobilizuoti ląstelės-šeiminkės resursus ir sudaro sąlygas efektyviai viruso geno ekspresijai. Virusų struktūrinių baltymų ir nukleino rūgščių sintezė paprastai vyksta vienu metu, o susintetintos struktūros kaupiasi ląstelės viduje. Esant pakankamam jų kiekiui, prasideda naujų virionų surinkimas ir brendimas, kurio mechanizmai skiriasi priklausomai nuo fagų tipo (Matsuzaki ir kt., 2005).

1.1.2 Praktinė taikomoji reikšmė

Bakteriofagų praktinio pritaikymo galimybėmis imta domėtis tuoj po jų atradimo dar XX a. pirmojoje pusėje. Eksperimentų, o vėliau ir klinikinių darbų metu jie buvo naudojami kaip viena iš priemonių kovojant su patogeninėmis, įvairias ligas sukeliančiomis bakterijomis, tačiau dėl prieštaringų gydymo rezultatų ir antibiotikų, kaip galimai perspektyvesnių vaistų, atradimo Vakarų šalyse susidomėjimas fagų terapija sumenko, o vėliau ir visiškai išnyko (Carlton, 1999; Kropinski, 2006).

Iš kitos pusės, bakterijas infekuojantys virusai nuo pat 1940-ųjų ilgą laiką buvo vieni svarbiausių įrankių plėtojant moderniąją genetiką ir molekulinę biologiją. Pasitelkiant fagus T2 ir T4 buvo įrodyta: DNR, kaip pagrindinės genetinės medžiagos egzistavimas, genetinio kodo tripleteškumas, nuo šviesos priklausantys ir nepriklausantys DNR atstatymo mechanizmai, DNR restrikcija ir modifikacija, rekombinacijos svarba DNR replikacijoje, įvesta geno sąvoka, atrasta iRNR, savaime išsikerpantys prokariotų intronai, atlikta daugelis kitų darbų (Miller ir kt., 2003).

Vis dėlto, pastaruoju metu vis didėjantis bakterijų atsparumas daugeliui antibiotikų verčia ieškoti naujų, efektyvių šios problemos sprendimo būdų. Vienas iš jų galbūt galėtų būti natūraliai esančių gamtoje arba genomų modeliavimo ir inžinerijos metodais sukurtų „geresnių“ fagų praktinis pritaikymas. Juolab, kad ir sukauptos žinios bei šiuolaikiniai pasiekimai mokslo ir technologijų srityje leidžia į šią problemą pažvelgti kitu aspektu, atveria naujas bakteriofagų panaudojimo galimybes (1.1 lentelė), (Thiel, 2004).

Daugelio žmonių ligų šiuolaikinio galimo gydymo bakteriofagais modeliai dėl griežtų saugumo reikalavimų yra dar tik eksperimentinėse stadijose. Vis dėlto 2005 metais Tijuanoje, Meksikoje, atidarytas šiuolaikinis Vakarų šalių kompanijų įkurtas *Fagų terapijos centras*. Pastarajame centre gydoma: įsisenėjusios infekcijos, pavyzdžiui, lėtinės ir ūminės šlapimo takų infekcijos, lėtinis sinusitas, akių infekcijos ir kt.; prastos kraujotakos vietose esančios infekcijos, pavyzdžiui, pūliuojančios žaizdos, osteomielitas, pragulos; infekcijos, sukeltos antibiotikams atsparių bakterijų, pavyzdžiui, meticilinui atsparių *S. aureus* – MRSA, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.* ir kt. (int. š. 1., Meipariani, 2009).

Svarbus vaidmuo tenka ir anksčiau neidentifikuotų fagų paieškai: naujas T4-tipo fagas KEP10 pasižymi žymiai platesniu lizogeniniu veikimo spektru (67%), lyginant su bakteriofagu T4 (14%) (Nishikawa ir kt., 2008). Tokie fagai terapijoje gerokai sumažintų dėl siauro fagų veikimo spektro ir bakterijų atsparumo (Labrie ir kt., 2010) šiuo metu naudojamų fagų kokteilium sudarančiųjų virusų rūšinę įvairovę. Tai viena esminių problemų šioje srityje, kadangi norint atitikti visus aukščiausius saugumo reikalavimus, būtinas išsamus kiekvieno iš preparatų sudėties įeinančio konkretaus bakteriofago ištyrimas (Thiel, 2004).

1.1 lentelė Kompanijų, užsiimančių praktiniu fagų taikymu, sąrašas ir esminės charakteristikos (Thiel, 2004)

Kompanija (vietovė)	Veikla	Internetinis adresas	Įkurta
Biophage Pharma (Monrealis, Kanada)	Vėžio, infekcijų/komplikacijų ir imuniteto moduliavimas kartu su <i>E. coli</i> ir <i>S. Typhimurium</i> naminiuose galvijuose ir jų skerdienoje	www.biophage.com	1995
Enzobiotics/New horizons Diagnostics (Kolumbija, JAV)	Iš bakteriofagų išskirtų fermentų lizinių taikymas diagnostikoje ir terapijoje	www.nhdiag.com	2003
Exponential Biotherapies (Port Vašingtonas, JAV)	1 stadijos klinikiniai bandymai su VRE ir MRSA bakterijomis, biogynyba.	www.expobio.com	1994
GangaGen (Bangaloras, India/ San Franciskas, JAV/ Otava, Kanada)	Nenuosaikiųjų, nelizinių fagų taikymas žmonių terapijoje, žemės ūkyje, aplinkosaugoje.	www.gangagen.com	2000
Hexal Gentech (Holskirchenas, Vokietija)	Fagų, kaip transporto priemonių, panaudojimas pernešant ląstelėms-šeimininkėms mirtinas plazmides.	www.hexal-gentech.com	1998
Intralytix (Baltimorė, JAV)	Fagai aplinkos, maisto apdorojimui, mediciniam taikymui.	www.intralytix.com	1998
Microstealth Technologies (Kembridžas, JAV)	Fagų, kaip antimikrobinių fermentų pernašos priemonių, taikymas.	Nėra	2002
Phage Biotech (Tel Avivas, Izraelis)	Lizinių bakteriofagų technologijų pritaikymas medicinoje, veterinarijoje, žemės ūkyje, pramonėje.	www.phage-biotech.com	2001
PhageGen (Las Vegasas, JAV; ankstesnė Regma Bio Technologies, Londonas)	Terapinių fagų ir bakterijoms gyvybiškai pavojingų fermentų paieška.	www.phagegen.com	2000
PhageTech (Monrealis, Kanada)	Fagų genominiai tyrimai ieškant naujų taikinių mažos molekulinės masės antibiotikams	www.phagetech.com	1997
Phage-Therapy (Tbilisis, Gruzija)	Fagų terapijos taikymas pacientams Gruzijoje	www.phage-therapy.com	2002
Phico Therapeutics (Kembridžas Didžioji Britanija)	Fagų naudojimas bakterijoms gyvybiškai pavojingų fermentų paieškai.	www.phicitherapeutic s.co.uk	2000

Bakteriofagais domimasi ir kaip galimu vienu iš kovos būdų prieš patogenines bakterijas maisto bei veterinarijos pramonėje (Mahoni ir kt., 2011). Šioje srityje atliekamų eksperimentų rezultatai teikia daug vilčių, pvz., trijų *Myoviridae* šeimos fagų kokteilis (ECP-

100) sunaikina *Escherichia coli* O157:H7 ant įvairių paviršių (stiklo, gipso, vaisių, šviežios mėsos) nuo 94 iki 100 % (Abuladze ir kt., 2008).

Fagai taip pat naudojami kaip viena iš priemonių patogeninių ligų sukėlėjų identifikavimui. Ypač tai aktualu dirbanti su lėtai augančiomis kultūromis, pvz., *Mycobacterium tuberculosis*. Šių tuberkuliozės sukėlėjų identifikavimas, naudojant fagų kiekybinę analizę, yra greitas, patikimas (93-98%) ir pigus, palyginti su tradiciniais tyrimo metodais (Barman ir Gadre, 2006). Fagai, kaip markeriai, gali būti naudojami ir patogenų nustatymui organizme. CdSe/ZnS žymėti modifikuoti lambda fagai infekuoja *E. coli* bakterijas, o jų sąveika vertinama pasitelkiant metodų rinkinį: tėkmės ir vaizdo citometriją, (prie ląstelių paviršiaus prisitvirtinusių bakteriofagų stebėjimas) transmisinę elektroninę mikroskopiją ir vaizdinę citometriją (į fago kapsidės sudėtį įtrauktų CdSe/ZnS kiekybinė analizė) (Yim ir kt., 2009). Fagų baltymų pagrindu sukurti zondai taip pat gali būti naudojami ypač greitam MRSA nustatymui tiriamuosiuose mėginiuose (Guntupalli ir kt., 2008).

Bakteriofagų sąveika su jų ląstelėmis-šeimininkėmis kai kuriais atvejais turi ir neigiamų pasekmių. Esant nepalankioms aplinkos sąlygoms (aukštesnei, nei įprasta temperatūrai ir infekuojant fagai PPV) padidėja virulentinių *Serratia* genties bakterijų kiekybinė sudėtis (Friman, 2011). Fagai gali įtakoti bakterijų fiziologines savybes ir tiesiogiai, pvz., pernešdami genus, lemiančius atsparumą antibiotikams (Colomer-Lluch, 2011) ar aktyvindami ląstelių-šeimininkių patogeniškumą lemiančius genomo fragmentus, tokius kaip patogeninės salelės (Tormo-Mas, 2010). Kadangi už šią veiklą dažniausiai yra atsakingi lizogeniniai bakteriofagai, norint to išvengti, fagų terapijoje ir kitose srityse pastarieji fagai nėra naudojami, vietoje jų pasitelkiami tik liziniai fagai (Meipariani, 2009).

1.1.3 Identifikavimas, charakterizavimas ir klasifikacija

Bakteriofagų klasifikacijos sistema kuriama remiantis tinkamu naujų virusų identifikavimu ir eksperimentinių rezultatų interpretavimu. Norint įgyvendinti šias sąlygas, pagrindinė už virusų įvardijimą ir klasifikaciją atsakinga institucija - Tarptautinis virusų taksonomijos komitetas - ICTV (*angl.* International Committee on Taxonomy of Viruses) yra nustatęs tam tikrus kriterijus, kuriais remiantis atliekamas naujų bakteriofagų identifikavimas ir charakterizavimas. Šių procedūrų metu gali būti atsižvelgta net į 70 virusų savybių (1.2 lentelė), (Ackerman, 2008).

Nukleorūgščių prigimtis ir bendra morfologija šiuo atveju yra patys svarbiausi kriterijai, kurie pagrinde nulemia, kokiai šeimai ar kitam taksonominiam rangui bus priskiriami konkretūs bakteriofagai. Sekantys pagal svarbą yra: inaktyvacijos testai,

restrikcijos endonukleazių skėlimo taikiniai ir ląstelių-šeimininkų ratas. Šie kriterijai padeda identifikuoti gentis ir rūšis (Ackerman, 2008).

Vis dėlto, net ir tie patys kriterijai gali turėti skirtingą reikšmę tam tikrų taksonominių vienetų nustatymui. Pvz., dvigrandinė DNR yra būdinga visiems žinomiems „uodeguotiesiems“ fagams, todėl klasifikuojant šios grupės fagus šeimų lygmenyje šis kriterijus yra visiškai nereikšmingas. Tuo tarpu klasifikuojant kitų formų fagų - CFP (*angl.* cubic, filamentous or pleomorphic) šeimas, DNR tipas yra vienas iš esminių kriterijų (Manderville ir Kropinski, 2009).

1.2 lentelė. Bakteriofagų charakterizavimo kriterijai (Ackerman, 2008).

Parametras	Požymis
Nukleino rūgštys	
Prigimtis	DNR, RNR, viengrandinė, dvigrandinė
Anatomija	Linijinė, žiedinė, superspiralizuota, segmentų kiekis, terminaliniai pasikartojimai, lipnūs galai, viengrandžiai tarpai, terminaliniai baltymai
Fizikinės savybės	Molekulinė masė, ilgis
Cheminės savybės	Medžiagos procentinė dalis, G+C, bazės ATGC, AUGC, bazi, bazių modifikacijos, su DNR-susiję baltymai, su DNR-susiję angliavandeniai
Virionas	
Morfologija	Forma, kapsido simetrija, kapsomerų skaičius, apvalkalo buvimas, smulkios struktūros, dydis, vidiniai baltymai
Fizikinės savybės	Masė, tankis
Cheminės savybės	Baltymų %, lipidų %, baltymų skaičius, baltymų molekulinė masė, aminorūgščių sudėtis, aminorūgščių seka, lipidų sudėtis
Aerologija	Neutralizacija
Inaktyvacijos testai	
Fizikiniai	Karštis, UV šviesa
Cheminiai	Chloroformas, kitos cheminės medžiagos
Replikacija, susirinkimas	Susirinkimo vieta, susirinkimo kelias, konkatemerai, DNR susivyniojimas, DNR translokacija, integracija, nukleorūgščių susipakavimas, baltymų sintezė, rekombinacija, transpozicija
Fiziologija	Prisitvirtinimo vieta, prisitvirtinimo greitis, protrūkio dydis, komplementacija, konversija, helperių funkcija, ląstelių-šeimininkų ratas, latentinis periodas, virulentiniai ar nuosaikieji, bendras pasišalinimas, plazmidinė stadija, atsipalaidavimas, transdukcija

Kadangi charakterizavimo tyrimai reikalauja laiko sąnaudų, identifikuojant fagus svarbu pasirinkti reikiamą kriterijų kiekį. (Ackerman ir DuBow 1987). Pastarasis neretai priklauso nuo to, kokiems tikslams ateityje numatomi naudoti tiriamieji bakteriofagai. Vienas iš lengviausių, greičiausių ir pigiausių identifikavimo būdų - elektroninė mikroskopija (Ackerman, 2006). Naudojantis ja, įmanoma: priskirti fagus atitinkamoms šeimoms, numatyti, ar yra lipidų, priskirti naujus fagus žinomoms grupėms, iš kapsidės diametro nustatyti DNR dydį, numatyti tolimesnių tyrimų eigą (Ackerman, 2008).

Kitas svarbus bakteriofagų identifikavimo metodas - DNR sekos nustatymas. Deja, jis atveria ne tik didžiules galimybes, bet ir iškelia klausimus, kuriuos reikia stengtis kiek

įmanoma greičiau išspręsti. Pagrindiniai jų yra nepakankamas duomenų bazėse esančių fagų genomų identifikavimas ir sunkumai, susiję su genomų mozaikiškumu, genomų palyginimu ir duomenų pateikimu (Ackerman, 2008):

- Duomenų bazėse talpinama daug neidentifikuotų, nepublikuotų ar menkai ištirtų virusų genomų. Tai ypač susiję su profagų genomais;
- Dažnai yra nežinomos genų funkcijos;
- Daugumos (o galbūt ir visų) fagų genomai yra mozaikiniai, kuriuose pasitaiko fragmentų iš bakterijų, eukariotų virusų ar pačių eukariotų;
- Genomų žemėlapiai yra vaizduojami gana skirtingais aspektais, todėl sudėtingas jų palyginimas.

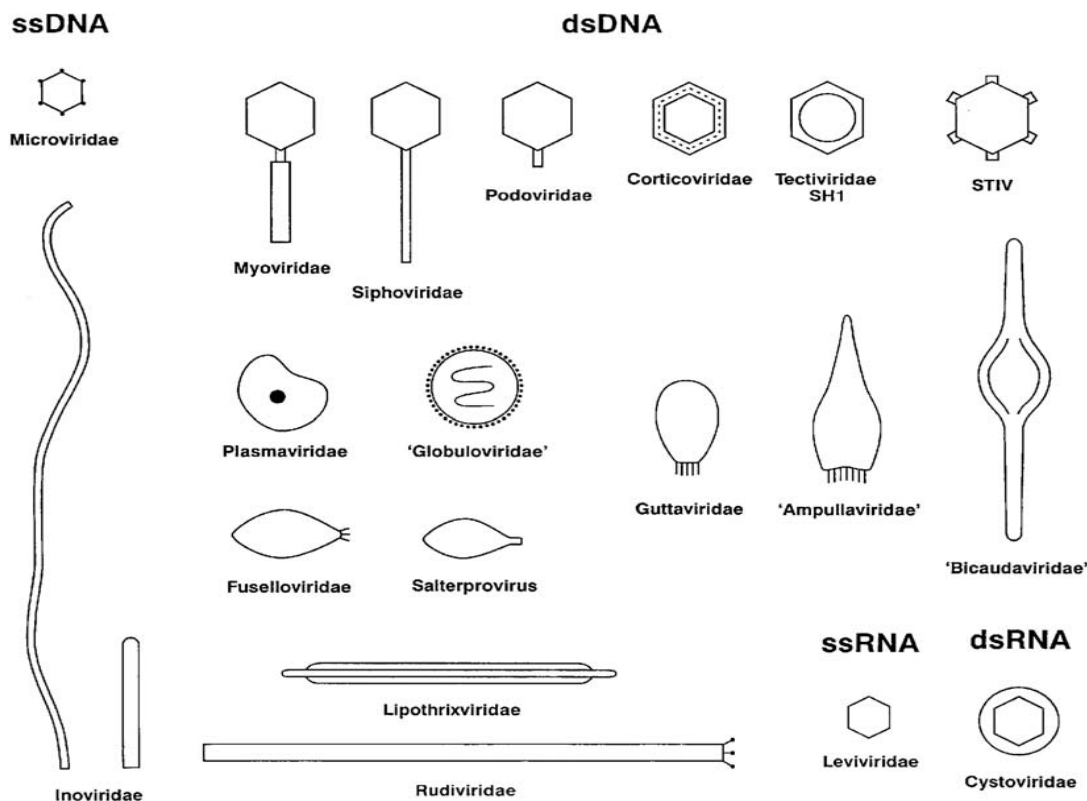
Išsprendus šias problemas, ateityje bakteriofagų (kaip ir daugelio kitų organizmų) identifikavimas, remiantis genomo sekų nustatymo metodais, turėtų įgyti dar didesnę taikomąją reikšmę.

Tuo tarpu kai kurie autoriai pastebi, kad šiuo metu tarptautinėse duomenų bazėse esančios bakteriofagų genų sekos gali neatskleisti tikrosios bioįvairovės dėl šiuo metu naudojamų naujų izoliatų gavimo metodikų (Hendrix, 2008). Pvz., atliekant jūros mėginių ėmimą ir analizę (Suttle, 2005) egzistuoja pakankamai didelis šališkumas tiriamųjų objektų atžvilgiu. „Uodeguotųjų“ fagų skaičius gali būti ženkliai padidinamas dėl jų dažno sugebėjimo formuoti ryškesnius, intensyvesnius infekcinius centrus, kas iš esmės ir lemia naujų izoliatų pasirinkimą (Hendrix, 2008). Didelį genomą turinčio *Bacillus* fago G virionas yra toks didelis, kad negali difuzijos būdu lengvai sklisti per agarą (infekciniai centrai yra per maži, kad būtų pastebimi, kol nepradedamas naudoti neįprastai mažos koncentracijos viršutinio agaro sluoksnis) (Server ir kt., 2007).

Šališkumas identifikuojant bakteriofagus įmanomas ir dėl jų virionų formos. Aplinkos mėginių elektroninėse mikrogramose pastebėti savitos formos uodeguotuosius fagus yra vienareikšmiškai lengviau. Dar daugiau, atliekant naujų izoliatų paiešką ir identifikavimą netgi tarp pačių „uodeguotųjų“ fagų, gali būti iš esmės iškreipiamas bendras vaizdas, kadangi tiriant paimtuosius mėginius, fagai yra dauginami naudojant palyginti nedidelį skaičių laboratorijose kultivuojamų bakterijų kamienų (Hendrix, 2008).

1.2 Taksonominės grupės

Šiuo metu žinomos bakteriofagų šeimos ir joms būdingi morfologiniai požymiai bei genetinės informacijos tipai pateikiami žemiau esančiame 1.2 paveiksle.



1.2 pav. Prokariotų virusų morfotipai (Ackerman, 2008).

2011 metais ICTV pateikta 9-oji ataskaita šiuo metu oficialioje spaudoje nėra prieinama. Tuo tarpu 8-oje ataskaitoje įvardijama daugiau nei 5500 bakteriofagų, kurie, remiantis anksčiau išvardintais kriterijais (1.1.3 skyrelis) oficialiai suskirstyti į 14 šeimų, kurioms priklauso 37 gentys. Svarstomas dar 5 šeimų statuso patvirtinimas (Fauquet ir kt., 2005). Remiantis šia ataskaita, net 96% visų identifikuotų fagų priklauso vadinamųjų uodeguotųjų fagų grupei - *Caudovirales*. (Ackerman, 2008).

1.2.1 Uodeguotieji fagai

Uodeguotieji fagai infekuoja eubakterijas ir archėjas ir, manoma, yra vieni seniausių šiuo metu žinomų virusų. Šių fagų genetinė medžiaga - dvigrandinė DNR, o galvutė - arba ištįsusio arba taisyklingo ikosaedro formos. Prie šių struktūrų tvirtinasi filamentinė uodegėlė, kuri yra spiralinės simetrijos ir iš esmės aprūpinta fiksuojančiomis struktūromis: bazinėmis plokštelėmis, spygliais, ataugėlėmis. Šie fagai neturi lipidinio apvalkalo. Virusinės dalelės prisitvirtina prie ląstelių-šeimininkų paviršinių baltymų ir infekuoja jas būdamos išorinėje aplinkoje. Nauji fagai susirenka per kompleksą etapų, faginei DNR patenkant į jau iš anksto susiformavusias kapsides (Ackerman, 2008).

Uodeguotieji fagai yra skaitlingiausia ir plačiausiai paplitusi virusų grupė, pasižyminti didele virionų dydžio ir struktūros, DNR ilgio ir sudėties, genomo struktūros, baltymų, antigeninių ir biologinių savybių įvairove. Fagai gali būti virulentiniai arba nuosaikieji.

Pagal uodegėlių tipus, šiuo metu yra išskiriamos 3 uodeguotųjų fagų šeimos: *Myoviridae* (uodegėlės ilgos ir susitraukiančios), *Siphoviridae* (uodegėlės ilgos ir nesusitraukiančios) ir *Podoviridae* (trumpos uodegėlės) (Ackerman, 2008). Bendros uodeguotųjų fagų charakteristikos pateikiamos žemiau esančioje 1.3 lentelėje.

1.3 lentelė. Uodeguotųjų fagų charakteristikos (Ackerman, 2008).

Šeima	Genčių sk.	Uodegėlių tipai	Tipinis atstovas	Fagų skaičius
<i>Myoviridae</i>	6	Ilgos, susitraukiančios	T4	1320
<i>Siphoviridae</i>	7	Ilgos, nesusitraukiančios	λ	3229
<i>Podoviridae</i>	4	Trumpos, nesusitraukiančios	T7	771

Myoviridae. Uodegėlė susideda iš kaklelio, susitraukiančio apdangalo ir centrinio vamzdelio. Miovirusai paprastai yra didesni už *Siphoviridae* ir *Podoviridae* šeimų atstovus, įskaitant didžiausius ir labiausiai evoliucionavusius virusus. Žinoma apie 1300 *Myoviridae* šeimos bakteriofagų (25% uodeguotųjų fagų).

Siphoviridae. Uodegėlė paprasta, nesusitraukianti, lankstus arba standus vamzdelis. Sifovirusai yra skaitlingiausia žinomų uodeguotųjų fagų grupė - virš 3200 atstovų (61% uodeguotųjų fagų).

Podoviridae. Uodegėlė trumpa ir nesusitraukianti. Manoma, kad podovirusai yra labiau susiję su sifovirusais negu su miovirusais. *Podoviridae* šeimos fagai (771) sudaro apie 14,5 % visų žinomų uodeguotųjų fagų (Ackerman, 2008).

Kaip ir daugeliui kitų bakterijų virusų, uodeguotiesiems fagams būdingas efektyvus genetinės medžiagos panaudojimas. Įprastai net 90-95% jų DNR sekų koduoja baltymus. *Caudovirales* eilei priklausantiems bakterijų virusams būdingi ir vieni iš didžiausių fagų baltymų, pavyzdžiui, iš 7312 a.r. sudarytas numatomas cianofago PSSM4 uodegėlės fibrilės baltymas (Sullivan, 2005), bet įprastai daugumos fagų genų dydis yra apie 200 a. r.- apie 2/3 vidutinio jų ląstelių-šeimininkų genų dydžio (Hatfull, 2006).

Kai kurie fagai koduoja keletą tRNR, kitiems būdingos tmRNR koduojančios nukleotidų sekos. Daugumoje nekoduojančių genomo sekų dalių yra reguliaciniai elementai: promotoriai, transkripcijos terminatoriai, operatoriai ir kiti (Hendrix, 2008).

„Uodeguotųjų“ fagų genai neretai būna sujungti į kartu transkribuojamas grupes, kuriose neretai yra supakuoti labai tankiai, daugeliu atvejų su skirtingų genų iniciacijos ir

terminacijos kodonų persidengimu. Kai kuriais atvejais viso genomo genų transkripcija vyksta viena kryptimi, kitais - formuojami atskiri transkripciniai vienetai, genų transkripcija tampa dvikrypte. Uodeguotųjų fagų genomų dydžiai yra nuo ~19 kb iki ~500 kb . (Hendrix, 2008).

Atlikus uodeguotųjų fagų struktūrinių baltymų analizę, netikėtai nustatytas jų filogenetinis panašumas su eukariotus infekuojančiais herpesvirusais (Bamford, 2005), o genomo sekų analizė atskleidžia tapatumą ir su uodeguotaisiais archėjų virusais. Gauti duomenys leidžia manyti, kad visi šie virusai galbūt galėjo turėti vieną bendrą protėvį (Krupovič ir kt., 2010). Įdomu ir tai, kad uodeguotųjų fagų uodegėlės molekulinės struktūros organizacija labai panaši į patogeninių bakterijų naudojamą VI tipo sekrecijos sistemą (Kanamaru, 2009).

1.2.2 *Myoviridae* šeimos bakteriofagai

Myoviridae šeimos bakteriofagų genomas nesegmentuotas, dažniausiai 100 - 170 kb dydžio, tačiau šiai virusų grupei priklauso ir palyginti nedidelius genomus turintys fagai, pvz., *Enterobacteria* fagas Mu (36 717 bp) ir kol kas didžiausią genomą bakteriofagų tarpe turintis *Bacillus* fagas G (497 513 bp). Myovirusų galvutė turi ikosaedrinę simetriją. Kapsidės, formuojama galvutė, sudaryta iš 152 kapsomerų. Šios grupės bakteriofagų uodegėlė - spiralinės simetrijos, jos ilgis gali siekti net 233 nm, pvz., *Enterobacteria* fago P1 (Lavigne ir kt., 2009). Uodegėlės struktūra panaši į *Tectiviridae* šeimos bakteriofagų, tačiau skiriasi tuo, kad yra ne laikina, o nuolatinė.

Dauguma miovirusų infekuoja bakterijas, tačiau kai kurių atstovų, pavyzdžiui, PhiH-tipui priklausančių fagų, ląstelės-šeimininkės yra archėjos (Lavigne ir kt., 2009). Dauguma *Myoviridae* šeimos fagų yra virulentiniai, todėl ląstelės-šeimininkės po infekcijos paprastai yra sunaikinamos.

1.4 lentelė. *Myoviridae* šeimą sudarančios gentys, tipiniai jų atstovai (ICTV, 2009)

Gentis	Tipiniai atstovai
I3-tipo virusai	<i>Mycobacterium</i> fagas I3
Mu-tipo virusai	<i>Enterobacteria</i> fagas Mu
P1-tipo virusai	<i>Enterobacteria</i> fagas P1
P2-tipo virusai	<i>Enterobacteria</i> fagas P2
PhiH-tipo virusai	<i>Halobacterium</i> fagas phiH
PhiKZ-tipo virusai	<i>Pseudomonas</i> fagas phiKZ
SPO1-tipo virusai	<i>Bacillus</i> fagas SPO1
T4-tipo virusai	<i>Enterobacteria</i> fagas T4

Dėl nuolat identifikuojamų naujų bakteriofagų ir skirtingų kriterijų, kuriais remiantis, atliekama klasifikacija, *Myoviridae* šeimos, kaip ir daugelio kitų filogenetinių grupių,

bakteriofagų klasifikacija yra gana kebli ir kintanti. Šiuo metu, remiantis Tarptautinio virusų taksonomijos komiteto (*angl.* International Committee on Taxonomy of Viruses- ICTV) duomenimis, oficialiai yra patvirtintos 8 *Myoviridae* gentys, įvardinti visi tipiniai šių genčių atstovai (1.4 lentelė, int. šalt. 2).

Lavigne ir kt. (2009), sujungdami klasikinę ir molekulinės genetikos pagrindais paremtą bakteriofagų klasifikaciją, naudodamiesi CoreGenes/CoreExtractor (Zafar ir kt., 2002) informacinėmis programomis, atliko 102 *Myoviridae* šeimos bakteriofagų taksonominę analizę. Remiantis gautais rezultatais, pasiūlyta šią virusų šeimą skirstyti į 3 pošeimius (*Peduovirinae*, *Teequatrovirinae*, *Spounavirinae*) ir 8 naujas nepriklausomas gentis (Bcep781, BcepMu, FelixO1, HAP1, Bzx1, PB1, phiCD119, ir phiKZ-tipo virusai). Remiantis šia klasifikacijos sistema, *Peduovirinae* pošeimį, kildinamą iš P2-tipo virusų, sudaro dviejų skirtingų genčių, P2-tipo ir HP1-tipo virusų, atstovai. Žymiai kompleksiškesniam *Teequatrovirinae* pošeimiui priskiriami T4-tipo ir KVP40-tipo virusų gentims prilausantys fagai. Paskutiniajam pošeimiui (*Spounavirinae*), siūloma priskirti Spo1-tipo ir Twort-tipo fagus (Lavigne ir kt., 2009).

1.2.3. T4-tipo bakteriofagai

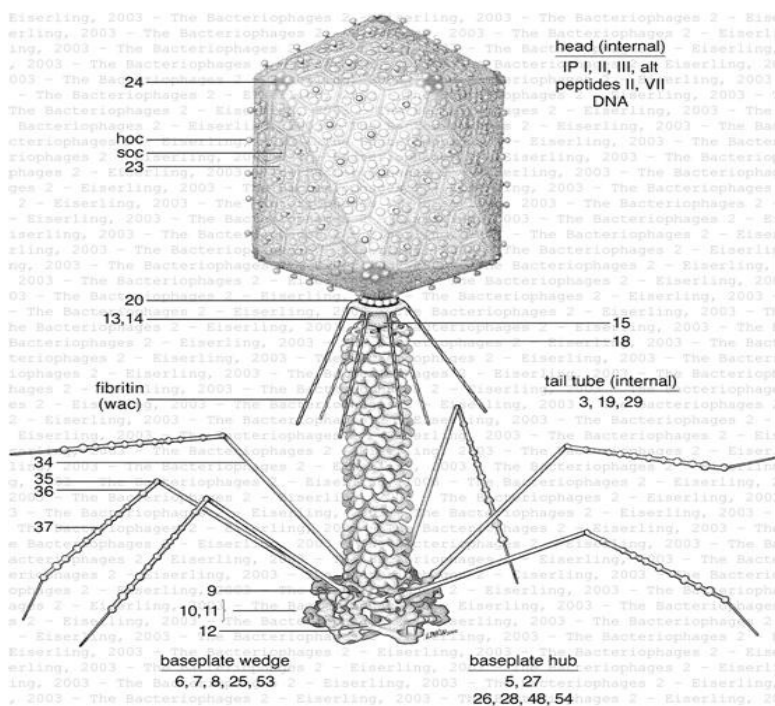
T4-tipo bakteriofagai morfologiškai lengvai atskiriami nuo kitų grupių virusų. Jų galvutė yra gana ištįsusi, apie 110 nm ilgio. Uodegėlė siekia 114 nm, jos apatinė dalis išplatėjusi ir vadinama bazine plokštele. Prie pastarosios jungiasi 6 ilgos, lanksčios ataugėlės. Kitos 6 trumpos, nelanksčios ataugėlės tvirtinasi prie uodegėlės susijungimo su galvute vietos (Ackerman ir Krisch, 1997). T4-tipo virusų genties tipinis atstovas- *Escherichia* fagas T4 pavaizduotas 1.3 paveiksle.

Apie 90% identifikuotų T4-tipo fagų infekuoja *Escherichia coli* ar kitas enterobakterijas, likę 10%- filogenetiškai tolimesnes rūšis - *Aeromonas*, *Vibrio*, *Synechococcus* ir pan. (Comeau ir kt., 2007). T4-tipo fagams dažnai būdinga DNR nukleotidų bazių modifikacijos: citozino vertimas į 5-hidroksimetilcitoziną (HMC), taip pat glikozilinimas (Miller ir kt., 2003).

Tarp daugiau nei 160 fagų, kurie priskirti T4-tipui remiantis daugiausia morfologiniais kriterijais, net 130 yra sunkiai atskiriami nuo bakteriofago T4. Toks didelis fagų virionų konservatyvumas leidžia manyti, kad genai, koduojantys struktūrinius baltymus, evoliucijos eigoje kito palyginti mažai (Ackerman ir Krisch, 1997).

T4-tipo bakteriofagų klasifikacija vis dar nėra iki galo apibrėžta. Ilgą laiką ši fagų grupė, remiantis trijų pagrindinių viriono struktūrinių baltymų (gp18; gp19 ir gp23) sekų

palyginimu, buvo skirstoma į 4 pogrupius: T-lyginius, pseudo-T-lyginius, šizo T-lyginius ir egzo T-lyginius fagus (Desplats ir Krisch, 2003).



1.3 pav. Bakteriofago T4 viriono struktūra (Arisaka, 2005).

Tuo tarpu Comeau ir Krisch (2008) pasiūlė T4-tipo bakteriofagus skirstyti į tris grupes: „artima T4“ grupė, kuriai priskiriami T-lyginiai, T-pseudolygininiai ir šizo T-lyginiai fagai, „tolima T4“ grupė, kuriai priskiriamas egzo T-lyginis fagus RM378 ir „ciano T4“ grupė (Comeau ir Krisch, 2008).

Dar vieną T4-tipo virusų klasifikaciją pasiūlė Lavigne ir kt. (2009). Remiantis pilnai nustatytomis šios fagų grupės genomų sekomis ir naudojantis specialiomis baltymų analizei skirtomis programomis, T4-tipo bakteriofagai buvo suskirstyti į 4 subtipus: T4-tipo, 44RR2.8t-tipo, RB43-tipo ir RB49-tipo virusus. Išsamesnis skirstymas pateiktas žemiau esančioje lentelėje.

1.5 lentelė. T4- tipo virusų klasifikacija (Lavigne ir kt., 2009).

Subtipas	T4-tipo fagai	44RR2.8-tipo fagai	RB43- tipo fagai	RB49- tipo fagai
Atstovai	<i>Escherichia</i> fagas T4 <i>Escherichia</i> fagas S10 <i>Escherichia</i> fagas JS98 <i>Escherichia</i> fagas RB14 <i>Escherichia</i> fagas RB32 <i>Escherichia</i> fagas RB51 <i>Escherichia</i> fagas RB69	<i>Aeromonas</i> fagas 44RR2.8t <i>Escherichia</i> fagas 31 <i>Aeromonas</i> fagas 25	<i>Escherichia</i> fagas RB43 <i>Escherichia</i> fagas RB16	<i>Escherichia</i> fagas RB49 <i>Escherichia</i> fagas JSE <i>Escherichia</i> fagas Φ1

Pastarosios klasifikacijos šalininkai siūlo šiuo metu T4-tipui priskiriamus cianofagus, dėl jų filogenetinio nutolimo, išskirti į atskirą grupę. Šių ir kitų bakteriofagų klasifikacija vis

dar nėra griežtai apibrėžta ir kurių autorių siūlymai bus priimti ateityje, kol kas sunku pasakyti.

1.3 Genų sekos tarptautinėse duomenų bazėse

Dėl nuolat tobulėjančių ir pingančių genomo sekų nustatymo technologijų, organizmų (tarp jų ir bakteriofagų) genomų sekų skaičius per pastaruosius 20 metų Genų banke (GenBank) padidėjo nuo 1 (1982) iki 42 mln. (2002). ICTV skelbiamų taksonų ir virusų skaičius išaugo nuo 369 (1985) iki 7881 (2004) (Fauquet ir kt., 2005). Duomenų kiekio didėjimas eksponentine progresija, virusų nomenklatūros ir taksonomijos sudėtingumas bei kiti veiksniai lemia atitinkamų institucijų skirtingus pateikiamų duomenų skaičius. Pvz., Genų banke 2005 metais buvo skelbiama apie 3142 “naujus fagus”, lyginant su ICTV atitinkamu metu pateikta ataskaita (Fauquet ir Fargette, 2005)

1.3.1 Bakteriofagų genomai

Šiuo metu NCBI (*angl.* National Center for Biotechnology Information) duomenų bazėje pateikiami 623 bakteriofagų genomai su pilnai nustatytais nukleotidų sekomis (int. šalt. 3). Kadangi šis skaičius tesudaro tik apie 10% identifikuotų bakterijų virusų, o ir pastarieji, kaip manoma, tėra tik nedidelė visų gamtoje egzistuojančių fagų dalis, akivaizdu, kad dabartinė situacija menkai teatspindi realų bakteriofagų genofondą.

Vis dėlto, pastaruoju metu nuolat tobulėjančios sekvenavimo technologijos (laiko ir ypač finansiniais aspektais) leidžia manyti, kad ateityje situacija turėtų pagerėti iš esmės. Tą patvirtina ir pastaraisiais metais nuolat didėjantis bakteriofagų su pilnai nustatytais genomų sekomis, skaičius. Net apie 1/3 visų šiuo metu NCBI duomenų bazėje pateikiamų fagų genomų buvo paskelbti per pastaruosius 3 metus (Int. šalt. 3).

Bakteriofagų genomų sekų nustatymą, palengvina ir tai, jog šių gyvybės formų genomai yra palyginti nedideli. Net 484 (81,2%) šiuo metu pilnai nustatytų fagų genomų yra nuo 10 iki 100 kb., 51 bakteriofago (8,9%)- mažesni už 10 kb, likusių 88 (14,1%)- didesni nei 100 kb. Mažiausias šiuo metu pilnai nustatytas genomus yra *Leuconostoc* fago L5 (2 435 bp), didžiausias – *Pseudomonas* fago 201phi2-1 (316 674 bp) (Int. šalt. 3). Vis dėlto, ateityje šie skaičiai gali gerokai kisti, kadangi kai kurių fagų, remiantis pirminiais duomenimis, genomai yra žymiai didesni, pavyzdžiui, *Bacillus* fago G jis gali siekti net 497 513 bp (Lavigne ir kt., 2009).

Bakteriofagų ląstelės-šeimininkės dažniausiai būna vienos rūšies, kartais vienos

padermės bakterijos. Įdomu tai, kad net ir tas pačias bakterijas infekuojančių fagų genomų dydžiai gali labai skirtis. Pvz., *Pseudomonas* genties bakterijas infekuoja ir didžiausią šiuo metu pilnai nusekvenuotą genomą turintis *Pseudomonas* fagas 201phi2-1 (316 674 bp), ir *Pseudomonas* fagas PRR1, kurio genomą tesudaro 3 573 bp (Int. šalt. 3).

NCBI duomenų bazėje esančių bakteriofagų, infekuojančių skirtingas ląsteles-šeimininkes, kiekybinė sudėtis pasiskirsčiusi nevienodai. Pavyzdžiui, yra nustatyti 77 enterobakterijų, 72 mikobakterijų, 55 stafilokokų virusų genomai, tuo tarpu *Rhizobium*, *Silicibacter* ar *Azospirillum* genties bakterijas infekuojančių fagų su pilnai nustatytomis genomų sekomis tėra tik po vieną atstovą (Int. šalt. 3). Tokia situacija galbūt yra susijusi su pačių fagų išskyrimo, identifikavimo ir charakterizavimo metodikų trūkumais (Hendrix, 2008) arba tiesiog atspindi nevienodas tyrimų intensyvumo pasiskirstymas.

1.3.2 T4-tipo bakteriofagų genomai

Šiuo metu NCBI duomenų bazėje yra paskelbti 121 T4-tipo bakteriofagai. Iš jų pilnai nustatytos tik 34 bakteriofagų genomų sekos (28% visų identifikuotų T4-tipo virusų) (Duomenys pateikiami 1.6 lentelėje, sudarytoje remiantis int. šalt. 4 esančia informacija).

T4-tipo fagai, kurių genomai šiuo metu yra pilnai nusekvenuoti, infekuoja 7 genčių bakterijas. Didžioji dalis fagų yra enterobakterijų virusai (42%), tačiau kai kurių iš jų vienintelė ląstelės-šeimininkė yra filogenetiniu požiūriu nuo *E. coli* nutolusios bakterijos, pavyzdžiui, cianobakterijos (*Prochlorococcus* sp., *Synechococcus* sp.). Ši T4-tipo fagams būdinga savybė pastebima ir anksčiau publikuotuoje literatūroje (Comeau ir kt., 2007).

Didžioji dalis (74%) pilnai nusekvenuotų T4-tipo bakteriofagų genomų yra nuo 160 iki 180 kb dydžio. Tik *Aeromonas*, *Vibrio* ir *Prochlorococcus* genties bakterijas infekuojančių fagų genomai didesni nei 200 kb. Didžiausią šiuo metu pilnai nusekvenuotą genomą turintis T4-tipo virusas- *Prochlorococcus* fagas P-SSM2. Pastarojo genomą sudaro 252 451 bazių poros.

1.6 lentelė. T4-tipo bakteriofagai su pilnai nustatytomis genomų sekomis (int. šalt. 4)

Bakteriofago pavadinimas	Genomo dydis (bp)	Pilnos genomo sekos nustatymo data
<i>Acinetobacter</i> fagas Ac42	167 716	2010/11/12
<i>Acinetobacter</i> fagas Acj61	163 093	2010/11/12
<i>Acinetobacter</i> fagas Acj9	169 947	2010/11/12
<i>Acinetobacter</i> fagas 133	159 801	2011/03/21
<i>Aeromonas</i> fagas 25	161 475	2006/06/20
<i>Aeromonas</i> fagas 31	172 963	2005/05/21
<i>Aeromonas</i> fagas 44RR2.8t	173 591	2003/10/11
<i>Aeromonas</i> fagas 65	235 229	2011/03/21

<i>Aeromonas</i> fagas Aeh1	233 234	2003/12/03
<i>Aeromonas</i> fagas phiAS4	163 875	2010/10/28
<i>Aeromonas</i> fagas phiAS5	225 268	2010/10/28
<i>Enterobacteria</i> fagas CC31	165 540	2010/11/12
<i>Enterobacteria</i> fagas IME08	172 253	2010/06/28
<i>Enterobacteria</i> fagas JS98	170 523	2007/12/04
<i>Enterobacteria</i> fagas JS10	171 451	2009/06/01
<i>Enterobacteria</i> fagas JSE	166 418	2009/06/01
<i>Enterobacteria</i> fagas phi1	164 270	2007/09/18
<i>Enterobacteria</i> fagas RB14	165 429	2009/04/30
<i>Enterobacteria</i> fagas RB16	176 788	2010/08/23
<i>Enterobacteria</i> fagas RB 32	165 890	2006/10/21
<i>Enterobacteria</i> fagas RB 43	180 500	2005/05/21
<i>Enterobacteria</i> fagas RB 49	164 018	2003/08/13
<i>Enterobacteria</i> fagas RB 51	168 394	2009/04/30
<i>Enterobacteria</i> fagas RB 69	167 560	2003/07/07
<i>Enterobacteria</i> fagas T4	168 903	1999/07/05
<i>Enterobacteria</i> fagas vB_EcoM-VR7	169 285	2010/12/10
<i>Klebsiella</i> fagas KP15	174 436	2010/04/13
<i>Prochlorococcus</i> fagas P-SSM2	252 451	2005/03/25
<i>Prochlorococcus</i> fagas P-SSM4	178 249	2005/03/25
<i>Shigella</i> fagas SP18	170 605	2010/10/15
<i>Synechococcus</i> fagas S-PM2	196 280	2005/01/29
<i>Synechococcus</i> fagas S-RSM4	194 454	2009/08/10
<i>Synechococcus</i> fagas syn9	177 300	2006/08/25
<i>Vibrio</i> fagas KVP40	244 834	2003/09/03

Verta atkreipti dėmesį į tai, kad daugiau nei pusės (53%) T4-tipo fagų genomų sekos pilnai nustatytos per pastaruosius du metus (1.6 lentelė, int. šalt. 4). Tai rodo šiuo metu esantį nemažą susidomėjimą šia sritimi, tuo pačiu ir šio darbo aktualumą.

1.3.3 *Salmonella* ir *Klebsiella* bakteriofagų genomai

Šiuo metu, remiantis NCBI duomenų bazėje pateiktais duomenimis, yra pilnai nustatyti 15 *Salmonella* genties bakterijas infekuojančių virusų genomai.

1.7 lentelė. *Salmonella* bakteriofagai su pilnai nustatytais genomų sekomis (Int. šalt. 4).

Bakteriofago pavadinimas	Šeima	Genomo dydis (bp)	Pilnos genomo sekos nustatymo data
<i>Salmonella</i> fagas Fels-1	nenustatyta	42 723	2008/03/03
<i>Salmonella</i> fagas HK620	<i>Podoviridae</i>	38 297	2001/04/03
<i>Salmonella</i> fagas SE1	<i>Podoviridae</i>	41 941	2009/01/06
<i>Salmonella</i> fagas SETP3	<i>Siphoviridae</i>	42 527	2007/03/30
<i>Salmonella</i> fagas SS3e	<i>Siphoviridae</i>	40 794	2005/04/07
<i>Salmonella</i> fagas ST160	<i>Podoviridae</i>	40 986	2011/01/13
<i>Salmonella</i> fagas ST64B	Caudovirales eil.	40 149	2002/09/30
<i>Salmonella</i> fagas ST64T	<i>Podoviridae</i>	40 679	2002/10/22
<i>Salmonella</i> fagas VIII-E1	<i>Siphoviridae</i>	45 051	2008/03/19

<i>Salmonella</i> fagas Vi01	<i>Myoviridae</i>	157 061	2010/07/29
<i>Salmonella</i> fagas Vi06	<i>Podoviridae</i>	38 368	2010/07/23
<i>Salmonella</i> fagas g341c	<i>Podoviridae</i>	40 975	2009/08/04
<i>Salmonella</i> fagas epsilon15	<i>Podoviridae</i>	39 761	2003/05/06
<i>Salmonella</i> fagas epsilon34	<i>Podoviridae</i>	43 016	2009/01/26
<i>Salmonella</i> fagas phiSG-JL2	<i>Podoviridae</i>	38 815	2008/06/05

Visi šie fagai (*Salmonella* fagų Fels-1 ir ST64B sisteminės padėtys šeimų lygmenyje vis dar nėra tiksliai nustatytos) priklauso uodeguotųjų fagų grupei, iš kurių didžioji dalis - *Podoviridae* (60%) arba *Siphoviridae* (20%) šeimoms. Tik *Salmonella* fagas Vi01 yra *Myoviridae* šeimos atstovas. Pastarasis bakteriofagas išsiskiria iš kitų *Salmonella* bakterijas infekuojančių fagų ir didesniu genomą sudarančių nukleotidų skaičiumi - 157 061 b.p. Likusių fagų genomų dydžiai svyruoja nuo 38 iki 45 kb (1.7 lentelė, sudaryta remiantis int. šalt. 4 pateikiama informacija).

NCBI duomenų bazėje šiuo metu paskelbti 5 pilnai nustatyti *Klebsiella* genties bakterijas infekuojančių virusų genomi. Visi šie fagai taip pat priklauso uodeguotųjų fagų grupei.

1.8 lentelė. *Klebsiella* bakteriofagai su pilnai nusekvenuotais genomais (Int. šalt. 4).

Bakteriofago pavadinimas	Šeima	Genomo dydis (bp)	Pilnos genomo sekos nustatymo data
<i>Klebsiella</i> fagas K11	<i>Podoviridae</i>	41 181	2008/07/11
<i>Klebsiella</i> fagas KP15	<i>Myoviridae</i>	174 436	2010/04/13
<i>Klebsiella</i> fagas KP32	<i>Podoviridae</i>	41 119	2009/12/18
<i>Klebsiella</i> fagas KP34	<i>Podoviridae</i>	43 809	2009/12/30
<i>Klebsiella</i> fagas phiKO2	<i>Siphoviridae</i>	51 601	2004/04/17

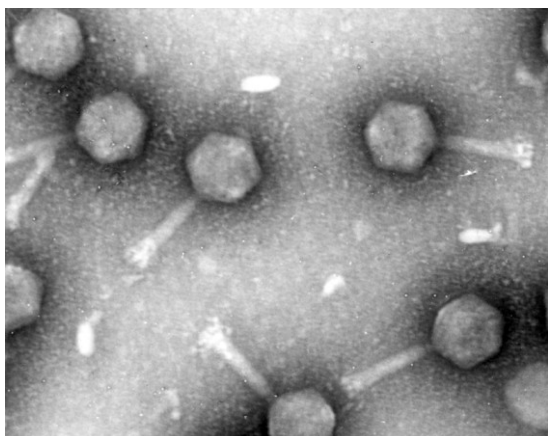
Keturių duomenų bazėse skelbiamų fagų genomų dydžiai yra nuo ~ 41 iki 51 kb. Tik neseniai pasirodžiusio *Klebsiella* fago KP15 genomas yra 174 436 b.p. (1.8 lentelė, sudaryta remiantis int. šalt. 4 pateikiama informacija)

1.4 Bakteriofagai VinS9 ir RaK2

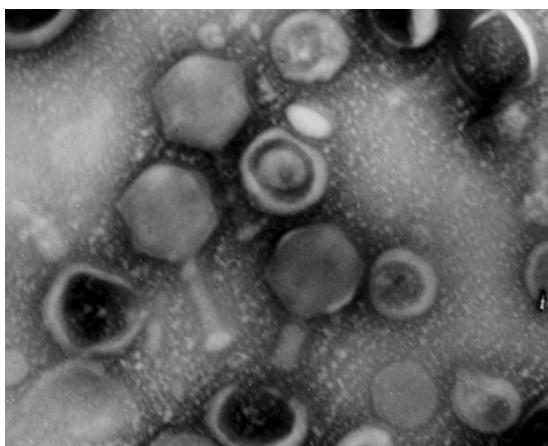
Šiame darbe tirtas bakteriofagas VinS9, sprendžiant pagal viriono morfologiją, priklauso *Myoviridae* fagų šeimai. Jo ląstelės-šeimininkės – *Salmonella enterica* ser. Typhimurium bakterijos. Daugumos šiuo metu duomenų bazėse pateikiamų pilnai nustatytų *Salmonella* bakteriofagų genomi (1.7 lentelė) yra nuo ~38 iki 45 kb. Tuo tarpu VinS9 genomo dydis yra ~150 kb. Ateityje pilnai nustatytas šio viruso genomo seka, tai būtų vienas iš nedaugelio tokio dydžio genomą turinčių *Salmonella* genties bakterijas infekuojančių bakteriofagų su pilnai nustatyta DNR seka.

Kito šio darbo metu tirta bakteriofago - RaK2 ląstelės-šeimininkės yra *Klebsiella* K3 kamieno bakterijos. Šis fagas, manoma, taip pat priklauso *Myoviridae* fagų šeimai, jo genomo dydis gali būti ~350 kb. Ateityje pilnai nustatius šio viruso genomo seką, tai būtų pirmasis tokio dydžio genomą turintis ne tik *Klebsiella*, bet apskritai bakterijas infekuojantis fagas su pilnai nustatyta DNR seka (1.8 lentelė).

Išgrynintų bakteriofagų VinS9 ir RaK2 virionų elektroninės mikroskopijos nuotraukos, darytos Botanikos instituto Fitovirusų laboratorijoje ankstesnių darbų metu, pateikiamos žemiau esančiuose 1.4 ir 1.5 paveiksluose.



1.4 pav. VinS9 virionai, matomi transmisiniu elektroniniu mikroskopu (nuotrauka, daryta Botanikos instituto Fitovirusų laboratorijoje).



1.5 pav. RaK2 virionių vaizdas, matomas transmisiniu elektroniniu mikroskopu (nuotrauka, daryta Botanikos instituto Fitovirusų laboratorijoje).

Šių virusų, ir ypač jų genetinės medžiagos charakterizavimas yra svarbus siekiant priskirti juos tam tikrai filogenetinei grupei, o jų genomų sekų nustatymas padėtų esminius pagrindus jų tolimesniam tyrimui ir pritaikymui.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Tyrimo objektai, darbe naudoti prietaisai, medžiagos ir reagentai

2.1.1. Tyrimo objektai

Šio darbo metu buvo tiriami du nauji (ankstesnių darbų metu iš Lietuvoje esančių ekosistemų išskirti) bakteriofagai: *Salmonella* fagas VinS9 ir *Klebsiella* fagas RaK2. Komplementacijos eksperimentuose naudoti Genų inžinerijos skyriuje sukonstruoti fago T4 esminių replikacijos genų deleciniai mutantai: T4Δg41, T4Δg61, T4Δg44-62. Fagų dauginimui naudotos *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ir *Klebsiella pneumonia* K3 kamieno bakterijos. Klonavimo ir komplementacijos eksperimentams naudoti *Escherichia coli* kamienai: DH10B, B^E, GM2163.

2.1.2. Prietaisai

Darbe naudoti šie prietaisai: laminariniai boksai, mikrobiologiniai inkubatoriai BD115 ir KB115 (Binder), termostatuojami kratytuvai OLS 200 (Grant) ir kratytuvai Innova 44 (New Brunswick Scientific), termocikleris „Mastercycler gradient” (Eppendorf), centrifugos (Eppendorf), DNR sekvenatoriai Macrophor (Amersham Pharmacia Biotech), biofotometras (Eppendorf), DNR ir baltymų elektroforezės aparatai bei srovės šaltiniai, UV šviesos transiluminatorius (Herolab), universalus fotovaizdintojas Phosphorimager FLA-5100 (Fujifilm), Amersham Pharmacia Biotech gelių skeneris ImageScanner, UV spektrofotometras Lambda25 (Perkin Elmer).

2.1.3 Reagentai, fermentai, molekulinės biologijos rinkiniai, oligonukleotidai

Naudoti Amresco, Fermentas, Fluka, Merk, Sigma, Serva, Roth firmų reagentai, 2 mM dNTP mišinys („Fermentas”).

Naudoti UAB „Fermentas” produktai: deoksiribonukleazė DNase I, ribonukleazė RNaseA, Taq DNR polimerazė, didelio tikslumo PGR fermentų mišinys High fidelity PCR enzyme mix, bei jų buferiai, rinkiniai: CloneJET Cloning Kit, CycleReaderTM DNA Sequencing Kit, GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit, Gene JetTM Gel Extraction Kit, DNA Extraction Kit bei DNR mėginių dažai elektroforezei.

Darbe buvo naudoti pJet1.2 ir pBAD24 sekvenavimo rinkinių pradmenys (Fermentas). Taip pat iš „Metabion” užsakyti originalūs oligonukleotidai, sukurti pagal „NCBI/GenBank” ir EMBL bazėse esančius genomų sekų duomenis bei gautas originalias sekas. Pradmenys

buvo naudojami genų paieškai PGR būdu, taip pat gautų fragmentų bei genominės DNR sekų nustatymui.

2.1.4 Mitybinės terpės, tirpalai ir jų paruošimas

Eksperimentų metu naudoti tirpalai, mitybinės terpės ir jų sudėtys nurodyti 2.1 lentelėje. Terpės ir fagų praskiedimo buferiai autoklavuojami 0,5 val. 1 atm. slėgyje.

2.1 lentelė. Eksperimentų metu naudotos mitybinės terpės ir tirpalai.

Terpių ir tirpalų pavadinimas	Reagentai	Konc.
LB terpė	Triptonas Mielių ekstraktas NaCl Agaras (agarizuotai LB terpei) H ₂ O	10,0 g/L 5,0 g/L 10,0 g/L 6,0-15,0 g/L Iki 1L
Bakteriofagų praskiedimo buferis	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NaCl MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,0 g/L 3,0 g/L 4 g/L 0,2 g/L
DB buferis	Tris-HCl, pH 7,2 NaCl MgCl ₂	10 mM 0,5M 1mM
TAE buferis	Tris Ledinė acto rūgštis 0,5M EDTA(pH8,0)	24,4 g/L 5,71 ml/L 10,0 ml/L
TBE buferis	Tris Boro rūgštis 0,5M EDTA(pH 8,0)	10,8 g/L 5,5 ml/L 4,0 ml/L

2.2 Metodai

2.2.1 Lastelių auginimas

Į 10 ml sterilios LB terpės mikrobiologine kilpele užsėjama viena bakterijų kolonija ir auginama purtyklėje per naktį. *E. coli* ir *S. enterica* ląstelės auginamos +37°C temperatūroje, o *Klebsiella* - 30°C temperatūroje. Užaugusi naktinė kultūra skiedžiama LB terpe 1:50 ir toliau auginama purtyklėje atitinkamose temperatūrose iki reikiamo optinio tankio.

2.2.2 Bakteriofagų dauginimas

Bakterijų kultūros auginamos LB terpėje iki A₆₀₀ 0,5-0,8 ir infekuojamos vienos lizės zonos turiniu. Inkubuojama atitinkamoje temperatūroje kol lizuoja augančių bakterijų suspensija (išskaidrėja terpė). Kultūra surenkama į mėgintuvėlius ir centrifuguojama +12°C temperatūroje 15 min., 9500 aps./min. Supernatantas pašalinamas, nuosėdos suspenduojamos

į 1 ml PBS (su MgSO₄), pridedama 1/10 tūrio chloroformo bei 2 μl DNazės. Mišinys laikomas 1 val. vandeninėje kratyklėje +37°C temperatūroje. Mišinys surenkamas į mėgintuvėlius ir centrifuguojamas 5 min. 5000 aps./min. Viršutinis sluoksnis surenkamas. Padaugintų fagų suspensijų titras būna apie $1 \times 10^{11-12}$ PFU/ml. Titro nustatymui į 2,5 ml išlydyto minkšto agarą (+51°C) dedama 0,5 ml *E. coli* bakterijų kultūros, priaugintos iki OD₆₀₀=0,6-0,8. Tada įnešama 0,1 ml reikiamo skiedimo fagų suspensija ir gerai išmaišoma. Mišinys tolygiai paskleidžiamas ant agarizuotos LB terpės paviršiaus Petri lėkštelėje. Lėkštelės inkubuojamos 12-14 val. +37°C temperatūroje. Po to skaičiuojamos susidariusios negatyvios virusinės kolonijos. Išdauginti fagai laikomi fosfatiniame praskiedimo buferyje +4°C temperatūroje. Genominės DNR skyrimui fagai suspenduojami į DB buferį.

2.2.3 Fagų genominės DNR išskyrimas ir gryninimas

Išskirtų ir padaugintų fagų genominė DNR skiriama ekstrahuojant fenolu, fenolo/chloroformo mišiniu ir chloroformu pagal virusų genominės DNR skyrimo metodiką (Kricker ir Carlson, 1994). Po ekstrakcijos DNR išsukama sterilia stikline lazdele arba išsodinama 1/10 tūrio dalimi 5 M NaCl ir 2 tūriais 96% etanolio ir laikoma 2 val. -20°C temperatūroje. Po inkubacijos DNR surenkama centrifuguojant +12°C 15 min., 12 000-14 000 aps/min, nuosėdos praplaunamos 70% etanoliu ir ištirpinamos vandenyje be nukleazių. Išskirta DNR naudojama restrikcijos reakcijoms, gautų restrikcijos fragmentų klonavimui bei genų fragmentų amplifikavimui PGR būdu. Atliekant nukleotidų sekų nustatymą su specifiniais pradmenimis, tiesiogiai nuo genominės DNR, ši buvo papildomai valoma Quick gDNA™ MiniPrep (Zymo Research) kolonėle, pagal gamintojų pateiktus protokolus.

2.2.4 DNR fragmentų padauginimas PGR metodu

DNR fragmentai gaunami atliekant polimerazės grandininę reakciją (PGR). Šiame darbe PGR buvo atliekama DNR matrica naudojant išskirtą fagų genominę DNR arba gautų bakterijų klonų suspensiją.

Reakcijos vykdytos, naudojant specifinius oligonukleotidus bei UAB „Fermentas“ produktus: Taq polimerazę, jos buferį ir 2 mM dNTP mišinį. Reakcijos mišinys 2 min. laikomas +95°C temperatūroje, po to 30 – 40 PGR ciklų atliekami pagal tokią schemą: 1 min. – +95°C temperatūra, 1 min. – pradmens hibridizacijos arba žemesnė temperatūra, 0,5 - 40 min – +68-72°C temperatūra (priklausomai nuo fragmento ilgio). Reakcijos pabaigoje 5 min. palaikoma +70°C temperatūra.

PGR produktai analizuojami elektroforezės agaroziniame gelyje būdu. Reakcijos metu gauti fragmentai, kurie vėliau yra naudojami sekų nustatymui, iš agarozinio gelio išskiriami naudojant Gene Jet™ Gel Extraction Kit rinkinį (pagal gamintojų rekomenduojamą protokolą) arba ekstrahuojami fenolio/chloroformo (1:1) mišiniu, DNR išsodinama 0,1 tūrio 5 M NaCl ir dvigubu tūriu 96% etanolio tirpalo 2 val. arba per naktį laikant –20°C temperatūroje. Nuosėdos surenkamos centrifuguojant mikrocentrifugoje kambario temperatūroje 15 min. 12 000 – 14 000 aps/min, praplaunamos 70% etanoliumi ir ištirpinamos TE buferyje arba vandenyje be nukleazių.

2.2.5 DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė vykdoma 0,8–1,0% agarozės gelyje su etidžio bromidu (0,05%) 1×TAE buferyje, esant 10 V/cm elektrinio lauko stiprumui. DNR pavyzdžiai prieš įvedant į gelį sumaišomi su DNR įnešimo dažu. Fragmentų ilgio standartu naudojami DNR žymenys (GeneRuler™ DNA Ladder Mix ir kiti). DNR frakcionuojama 15-30 min, o pasibaigus elektroforeziniam DNR frakcionavimui, geliai analizuojami transiliuminatoriaus ultravioletinėje šviesoje.

2.2.6 DNR fragmentų valymas ir klonavimas

DNR fragmentų valymui iš agarozinių gelių buvo naudojami DNA Extraction Kit (Fermentas) ir Gene Jet™ Gel Extraction Kit rinkiniai, vadovaujantis gamintojų rekomendacijomis. Išvalyti DNR fragmentai buvo naudojami tiesioginiam sekvenavimui arba klonuojami į plazmidinius vektorius ir nustatomos juose esančių intarpų sekos.

DNR fragmentai buvo klonuojami panaudojant “CloneJET Cloning Kit” klonavimo rinkinį, vadovaujantis gamintojų rekomendacijomis. *E. coli* kompetentinės ląstelės ligavimo mišinio transformacijai paruošiamos naudojant CaCl₂ tirpalą, vadovaujantis paplitusia metodika (Sambrook ir kt., 1989), ligavimo mišinys sumaišomas su 100 μl kompetentinių ląstelių ir 30 min laikomas 0°C temperatūroje, po to 2 min –inkubuojamas +42°C temperatūroje ir išsėjamas Petri lėkštelėse ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu (40 μg/ml). Lėkštelės inkubuojamos 37°C temperatūroje per naktį. Siekiant patikrinti intarpo dydį gautose plazmidėse, išaugusios bakterijų kolonijos suspenduojamos 10 μl LB terpės ir po 1 μl suspensijos naudojama kaip matrica PGR reakcijoms.

2.2.7 Plazmidinės DNR skyrimas

Plazmidinė DNR iš gautų rekombinantinių klonų buvo skiriama panaudojant GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) rinkinį. Išskirtos plazmidinės DNR toliau naudojamos intarpų DNR sekos nustatymui bei klonavimui.

2.2.8 Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Padaugintų fagų dalelės surenkamos centrifuguojant 1 val., +12⁰C, 11 000 aps/min. Nuosėdos suspenduojamos baltyminių mėginių įvedimo buferyje (0,6 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 10% glicerolis, 1% 2-merkaptoetanolis, 0,01% bromfenolio mėlynasis). Baltymų mėginių įnešama po 30-50 μl. Pavirinus suspensija įvedama į 13% denatūruojantį poliakrilamidinį gelį ir vykdoma elektroforezė (Laemmli, 1970) buferių sistemoje 20 mA elektros srovėje, naudojant LKB elektroforezės sistemą ir srovės šaltinį. Po elektroforezės gelis dedamas į dažą (0,1% Coomassie Brilliant Blue G²⁵⁰, 30% metanolis ir 30% acto rūgštis). Gelis atplaunamas 5% metanolio ir 7% acto rūgšties mišinyje. Geliai analizuojami Amersham Pharmacia Biotech gelių skeneriu ImageScanner.

2.2.9 DNR sekų nustatymas

Iš gelio išskirtų PGR fragmentų bei plazmidiniuose vektoriuose klonuotų DNR fragmentų nukleotidų sekos buvo nustatomos Biotechnologijos instituto Sekoskaitos centre, fago RaK2 genomus sekvenuotas MacroGen firmoje (Pietų Korėja).

Trumpesnių (apie 500 bp) DNR fragmentų sekos buvo nustatomos dideksiterminacijos metodu naudojant radioaktyviuoju fosforu (P³²) žymėtus oligonukleotidus. Oligonukleotidai buvo žymimi panaudojant [γ -³²P]ATP ir T4 PNK. Sekvenavimo reakcijoms naudotas rinkinys CycleReader™ DNA Sequencing Kit (Fermentas). Reakcijų mišiniai frakcionuojami 7% poliakrilamidiniame gelyje TBE buferyje denatūruojančiomis sąlygomis, naudojant sekvenatorius MacroPhor (Amersham Pharmacia Biotech) esant 2200 V įtampai. Analizuojama naudojant universalų fotovaizdintoją Phosphorimager FLA-5100 (Fujifilm).

2.2.10 DNR sekų analizė

Nustatytos DNR sekos analizuojamos pasitelkus internetinėje EMBL-EBI duomenų bazėje (<http://www.ebi.ac.uk>) esančias bioinformacinės analizės programas Fasta, ClustalW, Transeq ir kitas.

2.2.11 Genominės DNR demetilimas

Fagų genominės DNR demetilimas buvo atliekamas EZ DNA Methylation-Gold™ Kit rinkiniu (Zymo Research). Pastarojo veikimo principas pagrįstas tuo, kad 5' pozicijoje metilintas citozinas paveikus bisulfitu išlieka nepakitęs, tuo tarpu nemetilintas citozinas verčiamas į uracilą, kuris po PGR reakcijos aptinkamas kaip timinas. Darbai atliekami pagal gamintojų rekomenduojamą protokolą, prieš tai atlikus fagų genominės DNR restrikciją retai kerpančiomis restriktazėmis. Gauti demetilinti DNR fragmentai padauginami PGR metu su iš anksto užsakytais specifiniais pradmenimis. Po to atliekamas DNR fragmentų valymas iš gelio (2.2.6 skyrius), sekų nustatymas (2.2.9 skyrius) bei analizė (2.2.10 skyrius).

2.2.12 Plazmidžių konstravimas

Plazmidžių DNR karpymas restrikcijos endonukleazių pagalba, viengrandžių DNR galų užbukinimas, fosforilinimas, DNR fragmentų ligavimas T4 DNR ligaze, plazmidžių įvedimas į *E. coli* ląsteles bei transformantų atranka buvo atliekama pagal plačiai paplitusias metodikas (Sambrook ir kt., 1989), taip pat vadovaujantis fermentų gamintojų pateiktomis rekomendacijomis.

2.2.13 Funkcijos komplementacijos tyrimai

E. coli GM2163 kamieno ląstelės, transformuotos atitinkamomis komplementacinėmis plazmidėmis, auginamos LB terpėje su ampicilinu (40 µg/ml) +30°C temperatūroje. aeruojant iki OD₆₀₀=0,8 ir įnešama arabinozės (0,2%) plazmidėje klonuoto geno ekspresijos indukcijai. Vėliau po 500 µl bakterijų kultūros išsėjama Petri lėkštelėse dvisluoksnio agaru metodu. Tolesnėje eksperimento eigoje ant gautos agarizuotos bakterijų suspensijos buvo lašinama po 2 µl žinomos koncentracijos T4 laukinio fenotipo ir T4 delecinio mutanto bakteriofagų tirpalu. Petri lėkštelės inkubuojamos per nakt +37°C temperatūroje. Sekančią dieną atliekama vizuali ant gautos agarizuotos bakterijų suspensijos susiformavusių fagų lizės zonų analizė.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo atliekami genominiai ir proteominiai *Salmonella* fago VinS9 ir *Klebsiella* genties bakterijas infekuojančio fago RaK2 tyrimai, kurių tikslas - minėtųjų bakteriofagų charakterizavimas genetiniais ir biocheminiais metodais. Bakteriofagai VinS9 ir RaK2 tyrimams pasirinkti dėl neįprasto jų dydžio bei negausaus ląstelių-šeimininkių spektro.

Eksperimentų metu siekta: nustatyti virusų genomines DNR ir/ar jos esminių struktūrinių ir funkcinių genų sekas, palyginti jas su jau esančiomis tarptautinėse duomenų bazėse ir, atlikus jų bioinformacinę analizę, nustatyti galimas genų koduojamų baltymų funkcijas bei genetinį panašumą su kitais bakteriofagais. Darbo metu taip pat buvo siekiama: išsiaiškinti, ar bakteriofagų VinS9 ir RaK2 genomine DNR gali būti metilinta, atlikti virionų pagrindinių struktūrinių baltymų palyginamuosius, esminių funkcinių genų palyginamuosius bei jų funkcijos komplementacijos tyrimus.

3.1 VinS9 genomo fragmentų sekų analizė

Atliekant VinS9 genomo fragmentų sekų nustatymą, buvo naudojama šio fago genomine DNR, gauta taikant genomines DNR skyrimo ir gryninimo metodikas (2.2.3 skyrelis). Ieškant esminių struktūrinių ir funkcinių genų, buvo sekvenuojami keliais būdais gauti DNR fragmentai.

Visų pirma buvo atliekamas atsitiktinis virusinės genomines DNR karpymas įvairiomis restriktazėmis (pastarųjų sąrašas pateikiamas 3.1 lentelėje). Darbo metu VinS9 genomines DNR fragmentai buvo gaunami naudojant HincII, AluI, DraI, RsaI, BsuRI ir SspI restriktazes. Klonavimams dažniausiai pasirinkti nedideli (0,5- 2,5 kb dydžio) virusinės DNR fragmentai.

Po restrikcijos buvo leidžiama karpytos genomines DNR elektroforezė agaroziniame gelyje (2.2.5 skyrelis). Pasirinkti atitinkamo dydžio DNR fragmentai iš agarozinio gelio buvo išskiriami naudojant DNA Extraction Kit (Fermentas) ir Gene Jet™ Gel Extraction Kit rinkinius pagal gamintojo rekomenduojamus protokolus. Vėliau paruošti DNR fragmentai buvo klonuojami į pJet1.2 plazmidinį vektorių ir DNR intarpų sekos nustatomos jau nuo išskirtų rekombinantinių plazmidžių (2.2.6 skyrelis).

Gautos DNR plazmidės buvo siunčiamos sekų nustatymui į Biotechnologijos instituto Sekoskaitos centrą. Nustatytos sekos buvo analizuojamos naudojant kompiuterines programas Vector NTI ir EMBL-EBI bioinformacines programas ir duomenų bazes. Pirmųjų gautų sekų bioinformacinė analizė parodė, kad fago VinS9 sekos yra pakankamai unikalios – jų homologija duomenų bazėse esančioms sekoms tesiekė iki ~30% aminorūgščių lygyje. Tačiau

per pastaruosius metus genų banke pasirodė net trijų bakteriofagų genomai, kurių sekų homologija su VinS9 DNR nepalyginamai didesnė. Atsitiktinių VinS9 DNR sekų analizės duomenys pateikiami žemiau esančioje 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. VinS9 genominės DNR fragmentuose, gautuose paveikus fago genomine DNR įvairiomis restriktazėmis, aptikti atviro skaitymo rėmeliai (ASR).

Restrikt azė	ASR (ar jo dalies) koduojamas baltymas	Homologija				
		Organizmas	Baltymo a.r. sk.	Persideng. a.r. sk.	Identifikum. (%)	Panašumas. (%)
HincII, AluI	Hipotetinis fago baltymas	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	99	99	98	99
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	101	97	80.4	89.7
HincII, AluI	Bazinės plokštelės subvienetas gp6	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	593	289	98.3	99.7
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	593	289	78.2	93.4
HincII, AluI	Konservatyvus hipotetinis fago baltymas	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	1612	319	97.2	100
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	1612	319	80.9	95.0
HincII, AluI	Hipotetinis fago baltymas	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	82	82	98	100
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	82	81	65.4	88.9
HincII, AluI	Hipotetinis fago baltymas	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	396	284	89.1	97.2
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	403	294	60.5	83.7
DraI	Uodegos fibrilės baltymas	<i>Salmonella</i> fagas Det 7	708	320	65.3	84.1
		<i>Salmonella</i> fagas SETP13	684	285	42.1	68.8
		<i>Salmonella</i> fagas Vi01	846	213	56.8	73.7
DraI	RegA transliacijos represorinis balt.	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	154	105	99.0	100
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG	154	105	87.6	98.1
RsaI	DNR helikazė	<i>Escherichia</i> fagas PhaxI	474	167	100	100
		<i>Salmonella</i> fagas Vi01	476	207	96.4	100
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	475	167	90.4	97.6
RsaI	Topoizomerazės II didysis subvienetas	<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	637	162	97.5	98.8
		<i>Salmonella</i> fagas Vi01	636	162	95.1	98.8
RsaI	Konservatyvus necharakterizuotas baltymas	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	263	246	98.0	99.6
		<i>Halorubrum</i> fagas HF2	291	234	25.2	54.7
RsaI	Hipotetinis fago baltymas	<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	189	112	66.1	79.5
		<i>Salmonella</i> fagas Vi01	190	112	55.4	77.7
RsaI	Numatomas necharakterizuotas baltymas	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	172	116	98.3	100
		<i>Enterobacteria</i> fagas RB43	119	101	38.6	70.3
RsaI	RIIB baltymas	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	527	208	99.5	100
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	520	208	83.7	96.6
RsaI	Numanoma dUTP difosfatazė	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	181	78	82.1	93.2
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	184	78	73.1	88.5
RsaI	DNR praimazės subvienetas	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	354	262	96.9	100
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	352	262	76.3	89.7
RsaI	Hipotetinis fago baltymas	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	799	175	97.7	99.4
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	163	163	81.6	96.3
BsuRI	Numatoma serino/treonino fosfatazė	<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	186	128	93.8	98.4
		<i>Salmonella</i> fagas Vi01	186	128	93.0	97.7
BsuRI	RegA transliacijos represorius	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	154	137	99.3	100
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	154	137	89.8	98.5
BsuRI	Numatoma dUTP difosfatazė	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	181	72	75.0	87.5
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	184	115	47.8	79.1
BsuRI	DNR polimerazė	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	998	47	100	100
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	999	47	89.4	97.9
BsuRI	Gp21 galvutės šerdies pastolių baltymas ir proteazė	<i>Salmonella</i> fagas Vi01	222	27	96.3	100
		<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	222	27	96.3	100

Kaip matome iš 3.1 lentelės, po restrikcijos gautuose VinS9 genomines DNR fragmentuose buvo nustatytos tiek struktūrinių (gp6, gp21), tiek funkcinių (RegA translacijos represorinio baltymo, DNR helikazės, topoizomerazės II didžiojo subvieneto, numanomos serino/treonino baltymų fosfatazės, numanomos dUTP difosfatazės, DNR polimerazės, DNR praimazės) fagų kilmės genų koduojamų baltymų aminorūgščių sekos. Minėtųjų genų sekų palyginamoji analizė yra svarbi identifikuojant ir charakterizuojant naujus bakteriofagus.

Vienos sekoskaitos reakcijos metu yra nuskaitoma iki ~1000 nukleotidų. Aptikus svarbių genų fragmentus ir norint nustatyti pilnas jų sekas, buvo atliekamos papildomos sekvenavimo procedūros. DNR fragmentai buvo gaunami pagal jau nustatytas fago genomo sekas užsisakant specifinius DNR oligonukleotidų pradmenis ir atliekant amplifikaciją PGR būdu (2.2.4 skyrelis). Taip pat buvo atliekamas VinS9 nukleotidų sekų nustatymas (su specifiniais DNR oligonukleotidų pradmenimis) tiesiogiai nuo per Quick gDNA™ MiniPrep kolonėlę išgrynintos genomines DNR (2.2.3 skyrelis). Šių darbų metu aptiktų esminių struktūrinių ir funkcinių VinS9 genų su pilnai nustatytais nukleotidų sekomis sąrašas pateikiamas 3.2 lentelėje.

3.2 lentelė. Esminiai VinS9 genai su pilnai nustatytais nukleotidų sekomis.

Genas	Geno koduojamas baltymas	Baltymo a.r. sk	Homologija su kitų fagų atitinkamais genų produktais		
			Bakteriofagas	Ident. (%)	Panaš. (%)
21	Gp21 (Šerдинis galvutės baltymas)	194	<i>Salmonella</i> fagas Vi01 <i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3 <i>Serratia</i> fagas KSP90	98.5 90.7 74.2	99.5 97.4 91.8
22	Gp22 (Šerдинis galvutės baltymas)	280	<i>Salmonella</i> fagas Vi01 <i>Escherichia</i> fagas PhaxI <i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	93.9 93.9 63.0	96.7 96.3 80.8
23	Gp23 (Pagrindinis galvutės baltymas)	440	<i>Salmonella</i> fagas Vi01 <i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3 <i>Serratia</i> fagas KSP90	98.9 93.8 83.6	100 99.2 96.0
41	Gp41 (DNR helikazė)	475	<i>Escherichia</i> fagas PhaxI <i>Salmonella</i> fagas Vi01 <i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	99.6 97.9 88.4	100 100 96.8
43	Gp43 (DNR polimerazė)	998	<i>Salmonella</i> fagas Vi01 <i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3 <i>Prochlorococcus</i> fagas Syn33	98.3 86.2 32.2	99.6 96.1 56.6
61	Gp61 (Pramazė)	354	<i>Salmonella</i> fagas Vi01 <i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3 <i>Deftia</i> fagas phiW-14	97.2 77.4 35.7	100 91.8 66.5
44	Gp44 (Žiedo užkėlėjo subvienetas)	330	<i>Salmonella</i> fagas Vi01 <i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG <i>Deftia</i> fagas phiW-14	98.8 86.6 43.1	100 95.7 74.4
62	Gp62 (Žiedo užkėlėjo subvienetas)	141	<i>Salmonella</i> fagas Vi01 <i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3 <i>Deftia</i> fagas phiW-14	98.6 77.1 33.3	100 94.3 65.9

VinS9 genomo fragmentų sekų bioinformacinė analizė leidžia teigti, kad mūsų tiriamo fago genomo sekų homologija daugeliu atvejų didžiausia su neseniai duomenų bazėse pasirodžiusio pilnai nusekvenuoto *Salmonella* bakteriofago Vi01 (int. šalt. 3) genomo sekomis. Pastarojo fago genomą sudaro 157 061 b.p. (t.y., panašiai tiek, kiek, kaip manoma, ir šiame darbe tirto fago VinS9). Analizuotų genų koduojamų baltymų homologija daugeliu atveju siekia net 97-99 % (3.1 ir 3.2 lentelės)

Kaip matome iš lentelėse pateiktų duomenų, VinS9 taip pat artimai giminingas *Shigella* fagui phiSboM-AG3. Šių fagų atitinkamų DNR fragmentų sekų homologija daugeliu atveju viršija 80%, o kai kada (pavyzdžiui, topoizomerazės II didžiojo subvieneto geno fragmento) yra didžiausia iš visų genų banke esančių organizmų (3.1 lentelė). *Shigella* fagas phiSboM-AG3, kaip ir Vi01, priskiriamas *Myoviridae* virusų šeimai, tačiau iki galo vis dar nėra klasifikuotas (int. šalt. 3).

Kai kurių VinS9 genų (gp22, gp41) sekų homologija didesnė nei 90% lyginant su *Escherichia* fago PhaxI atitinkamomis sekomis. Pastarojo enterobakterijų viruso pilna genomo seka šiuo metu vis dar nėra skelbiama tarptautinėse duomenų bazėse, tačiau tikėtina, kad ir kitų genų sekų homologija tarp šių dviejų bakteriofagų yra ne ką mažesnė.

Svarbu paminėti, kad duomenys apie visus tris minėtuosius bakteriofagus (*Salmonella* fagą Vi01, *Shigella* fagą phiSboM-AG3 ir *Escherichia* fagą PhaxI) tarptautinėse duomenų bazėse paskelbti per pastaruosius pusantrų metų, t.y. jau pradėjus išsamesnius iki tol palyginti mažą genomo sekų homologiją su kitais bakterijų virusais turėjusio VinS9 tyrimus. Ir šiuo metu VinS9 genomo sekų panašumas su daugumos kitų duomenų bazėse skelbiamų bakterijų virusų genomo sekomis tesiekia 30-40 % (duomenys nepateikti).

Daugeliu atvejų didžiausią homologiją su šiame darbe tirtuoju fagu turintys bakteriofagai priklauso *Myoviridae* fagų šeimai (int. šalt. 3). Daugelis jų vis dar nėra visiškai klasifikuoti, bet visi turi tolimus fago T4 esminių genų homologus. Gali būti, kad ilgainiui visi bus priskirti atskirai T4-tipo fagų grupei, kuriai galbūt galėtų priklausyti ir fagas VinS9. Šią prielaidą patvirtina ne tik genomo sekų analizė, bet ir elektroninės mikroskopijos nuotraukos (1.4 pav.), bei toliau šiame darbe pateikiami baltymų elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje rezultatai (3.2 pav.).

3.2 RaK2 genomo sekų analizė

Darbo pradžioje, siekiant nustatyti bakteriofago RaK2 genominės DNR nukleotidų sekas, buvo atliekami eksperimentai, analogiški aprašytiems 3.1 skyrelyje, t.y. virusinės genominės DNR karpymas įvairiomis restriktazėmis, gautųjų fragmentų gryninimas ir

klonavimas į pJet1.2 vektorių. DNR fragmentai dar buvo gaunami ir pagal jau nustatytas fago genomo sekas užsisakant specifinius DNR oligonukleotidų pradmenis ir atliekant amplifikaciją PGR būdu. RaK2 genomines DNR nukleotidų sekas buvo nustatomos ir tiesiogiai nuo genomines DNR, išskirtos panaudojant Quick gDNA™ MiniPrep kolonėlę.

Darbo metu, norint gauti fragmentus, RaK2 genomine DNR buvo karpoma DraI, SspI, Eco 32I ir HincII restriktazėmis. Darbo eigoje nustatytos tokių svarbių funkcinių genų kaip DNR polimerazės ir NudE hidrolazės, taip pat struktūrinį kaklelio baltymą Gp13 koduojančio geno homologiškos nukleotidų sekos. RaK2 genomo fragmentų nustatytų sekų analizės duomenys pateikti žemiau esančioje 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. RaK2 genomines DNR fragmentuose, gautuose paveikus fago genomine DNR įvairiomis restriktazėmis, aptikti ASR.

Restriktazė	ASR (ar jo dalies) koduojamas baltymas	Homologija				
		Organizmas (šeima, tipas)	Balt. a.r.sk	Persid.. a.r.sk	Ident. (%)	Panaš. (%)
DraI	Necharakterizuotas baltymas	<i>Erwinia pyrilifoliae</i> (Enterobacteriaceae)	135	53	41.5	64.2
DraI	Konservatyvus hipotetinis fago baltymas	<i>Shigella fagas phiSboM-AG3</i> (<i>Myoviridae</i>)	65	45	60.0	75.6
DraI	Numatomas necharakterizuotas baltymas	<i>Vibrio fagas KVP40</i> (<i>Myoviridae</i> , T4-tipas)	106	70	40.0	67.1
DraI	DNR polimerazė (Gp43)	<i>Aeromonas fagas Aeh1</i> (<i>Myoviridae</i> , T4-tipas)	919	223	25.6	55.6
DraI	NudE nudix hidrolizė	Enterobacteria fagas RB43 (<i>Myoviridae</i> , T4-tipas)	137	126	42.9	70.6
SspI	Didysis terminazės subvienetas (Gp17)	<i>Klebsiella fagas K11</i> (<i>Podoviridae</i> , T7-tipas)	875	280	26.4	53.2
SspI	PhoH šeimos baltymas	<i>Pseudomonas mendocina</i> (<i>Pseudomonadaceae</i>)	463	274	39.1	73.4
Eco32I	Ribonukleazė H	<i>Esherichia fagas T4</i> (<i>Myoviridae</i> , T4-tipas)	305	294	24.1	50.7
HincII	Struktūrinis kaklelio baltymas (Gp13)	<i>Stenotrophomonas fagas Smp14</i>	253	199	23.1	53.3
HincII	Celiuliuozės sintezės operono C domeno baltymas	<i>Pectobacterium wasabiae</i> (enterobacteriaceae)	1159	175	25.1	53.7

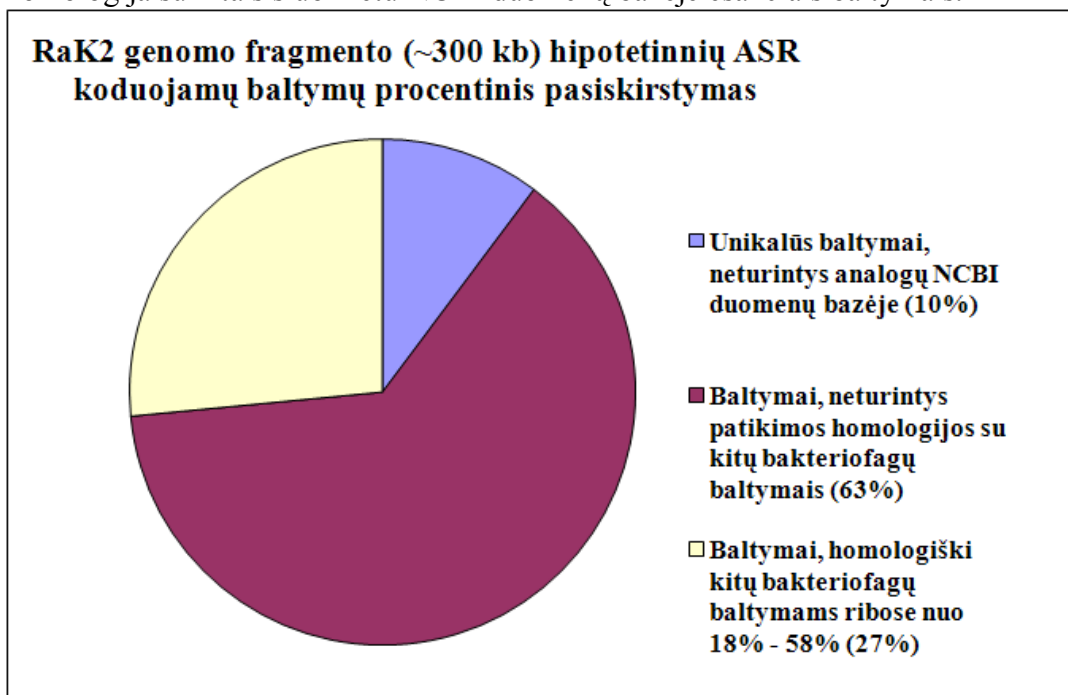
Tolimesnių darbų metu, atsiradus galimybėms, nuspręsta išsiųsti naujos kartos sekvenavimui visą bakteriofago RaK2 genomą. Šiuo metu, atlikus pirminę didžiojo RaK2 genomo fragmento (~300 kb iš ~ 350 kb) bioinformacinę analizę, nustatyti 362 ASR. Iš jų 96 (27%) fago RaK2 hipotetinių ASR koduoja baltymus, homologiškus kitų bakteriofagų baltymams ribose nuo 18% iki 58%.

Tuo tarpu ASR, neturinčių analogų bakteriofagų genomuose, bet aptinkamų kituose organizmuose (daugiausia bakterijose) aptikta net 229 (63%). Šis reiškinys gali būti aiškinamas evoliucija, kurios metu šios skirtingos gyvybės formos nuolat sąveikauja

tarpusavyje ir, tikėtina, yra įgijusios nemažai tapačių genų sekų (Comeau ir Krisch, 2008). Analizuojant RaK2 genomą, taip pat aptikti 37 (10%) ASR, koduojantys baltymus, kuriems analogų NCBI duomenų bazėje nepavyko rasti. Daugiausia tai nedideli, vidutiniškai iš 100-120 a.r. sudaryti baltymai, ir tik nedaugelio šis skaičius siekia 250-300 a.r. (išsamūs duomenys nepateikti).

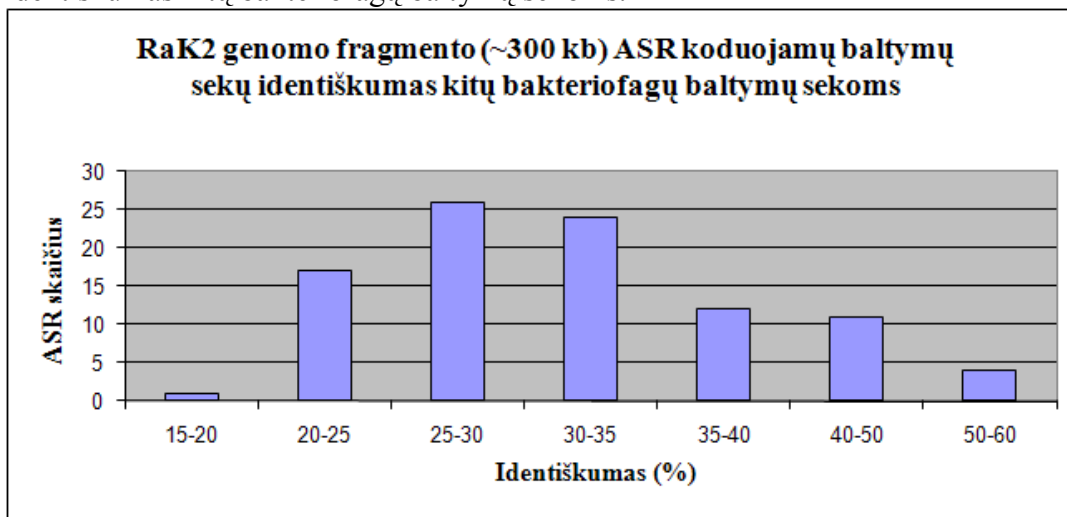
Procentinis ASR koduojamų baltymų pasiskirstymas pateiktas žemiau esančioje 3.1 diagramoje.

3.1 diagrama. RaK2 geno fragmento (~300 kb) hipotetinių ASR koduojamų baltymų homologija su kitais šiuo metu NCBI duomenų bazėje esančiais baltymais.



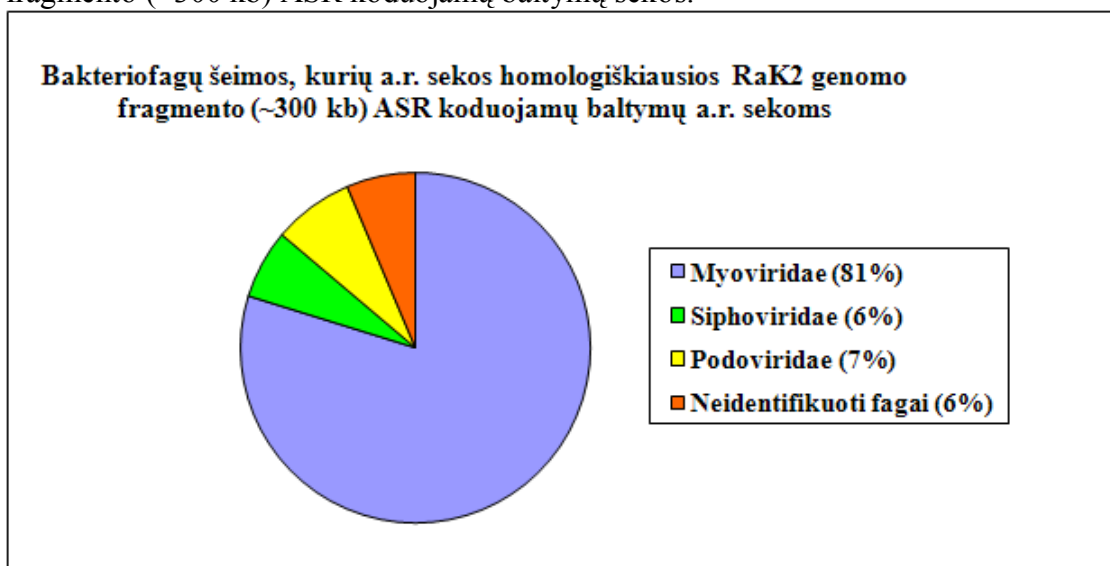
Priešingai nei VinS9, šio darbo metu nustatytos bakteriofago RaK2 genų sekos neturi didelės homologijos su šiuo metu NCBI duomenų bazėje esančiomis kitų organizmų genų sekomis. Atlikus 300 kb fragmente aptiktų ASR koduojamų baltymų aminorūgščių bioinformacinę analizę, nustatyta, kad daugeliu atvejų šio *Klebsiella* genties bakterijas infekuojančio fago baltymų sekų homologija su kitų virusų atitinkamomis sekomis tesiekia 20-35 % (3.3 lentelė, 3.2 diagrama). Panaši situacija ir su ASR koduojamais baltymais, kurių aminorūgščių sekos artimiausios bakterijų ar kitų organizmų baltymų aminorūgščių sekoms. Jų homologija su RaK2 baltymais aminorūgščių lygyje daugeliu atveju taip pat ne didesnė nei 40% (3.3 lentelė, išsamesni duomenys nepateikti).

3.2 diagrama. RaK2 geno fragmento (~300 kb) ASR koduojamų baltymų sekų identiškumas kitų bakteriofagų baltymų sekoms.



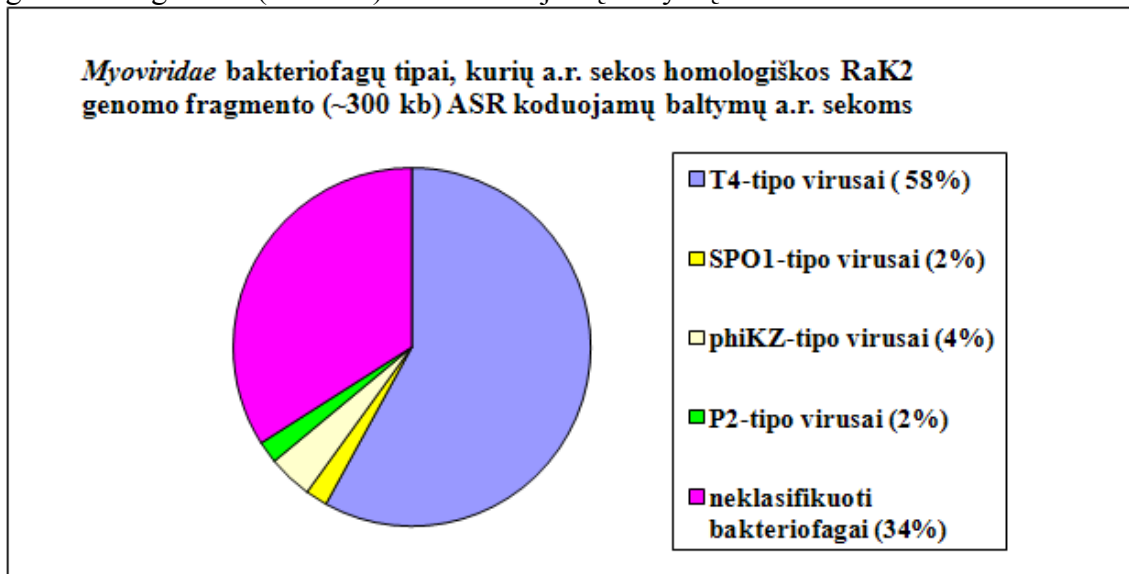
Siekiant nustatyti, kuriai bakteriofagų taksonominei grupei galėtų priklausyti tiriamasis fagas RaK2, atlikta jo hipotetinių ASR koduojamų baltymų sekų, turinčių homologiją su kitų bakteriofagų baltymais, palyginamoji bioinformacinė analizė. Jos duomenys pateikti žemiau esančioje 3.3 diagramoje.

3.3 diagrama. Bakteriofagų šeimos, kurių baltymams homologiškiausios RaK2 geno fragmento (~300 kb) ASR koduojamų baltymų sekos.



Kaip matome iš pateiktų duomenų, RaK2 geno fragmento hipotetinių ASR koduojamų baltymų a.r. sekos panašiausios į virusų, kurių didžioji dauguma priklauso *Myoviridae* šeimai, a.r. sekas (81%). Savo ruožtu, didžioji šių *Myoviridae* šeimos fagų, kurių genų sekos homologiškos RaK2 sekoms, priklauso T4-tipo virusams (57% bendro ir net 85% identifikuotų *Myoviridae* bakteriofagų skaičiaus). Šie duomenys pateikti 3.4 diagramoje.

3.4 diagrama. *Myoviridae* bakteriofagų tipai, kurių baltymų sekos homologiškos RaK2 geno fragmento (~300 kb) ASR koduojamų baltymų sekoms.



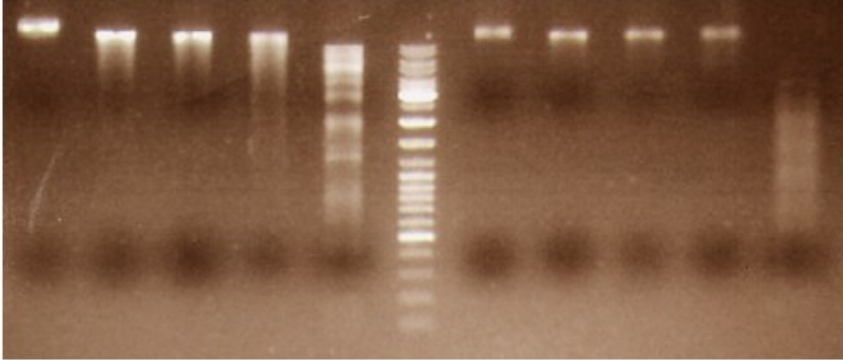
Darbo metu taip pat atlikta RaK2 geno didžiosios dalies nukleotidų G+C procentinės sudėties analizė. Jos metu nustatyta, kad fago RaK2 genomines DNR G+C sudaro 32% bendro nukleotidų kiekio. Panaši ir fago T4 DNR G+C procentinė sudėtis (34,5%), kuri yra gerokai mažesnė nei šių fagų ląstelių-šeimininkų G+C (50%). Žemas G+C kiekis būdingas ir kitiems T4-tipo fagams (Miller ir kt., 2003).

Apibendrinus gautuosius duomenis iš didžiosios RaK2 geno dalies (300 kb iš 350 kb) galime teigti, kad šis bakteriofagas, kaip ir anksčiau minėtasis *Salmonella* fagas VinS9, galėtų būti priskiriamas vadinamųjų uodeguotųjų fagų grupei, *Myoviridae* šeimai. Šis fagas taip pat turi fago T4 esminių genų tolimų homologų rinkinį, todėl galėtų būti priskiriamas T4-tipo fagams. Norint paremti šią prielaidą, atlikti papildomi darbai, padedantys detaliau charakterizuoti minėtuosius bakteriofagus.

3.3 Genominės DNR metilinimo tyrimai

Tipinio T4-tipo bakteriofago T4 genomine DNR yra modifikuota - į jos sudėtį įeinantis citozinas pakeistas 5-hidroksimetilcitozinu (HMC), kuris dar būna glikozilintas.. DNR nukleotidų bazių modifikacijos būdingos ir daugeliui kitų T4-tipo bakteriofagų (Miller ir kt., 2003). Norint nustatyti, ar metilinimas būdingas ir šiame darbe tirtiems fagams VinS9 ir RaK2, buvo atliekami keleto tipų tyrimai. Pirmųjų metu bakteriofagų genomine DNR buvo veikama metilintos DNR neskaldančiomis (EcoRII, NotI, MboI) ir savo fermentinio aktyvumo dėl šios modifikacijos neprarandančiomis (AluI) restriktazėmis (3.1 pav.).

1.K 1.A 1.B 1.C 1.D M 2.K 2.A 2.B 2.C 2.D



1.K- VinS9, neveikta
restriktazėmis
1.A- VinS9, EcoRII
1.B- VinS9, NotI
1.C- VinS9, MboI
1.D- VinS9, AluI
2.K- RaK2, neveikta
restriktazėmis
2.A- RaK2, EcoRII
2.B- RaK2, NotI
2.C- RaK2, MboI
2.D- RaK2, AluI

3.1 pav. VinS9 ir RaK2 genomines DNR, paveiktos metilintą DNR skaldančiomis ir neskaldančiomis restriktazėmis.

Kaip matyti iš 3.1 paveiksle pateiktų duomenų, tos pačios metilintos DNR taikinių neatpažįstančios restriktazės fagų VinS9 ir RaK2 genomines DNR suskaldė skirtingai. Pirmuoju atveju EcoRII, NotI ir MboI suskaldė fago Vins9 genomine DNR (fragmentų dydis sumažėjo). Antruoju, RaK2 genomines DNR restrikcija nebuvo pastebėta. Tuo tarpu savo fermentinio aktyvumo dėl DNR metilinimo neprarandanti, daug taikinių DNR sekose turinti restriktazė AluI suskaldė tiek VinS9, tiek RaK2 genomines DNR. Iš to galime manyti, kad *Klebsiella* fago RaK2 genomine DNR yra metilinta, VinS9 - nemetilinta.

Norint tuo įsitikinti, buvo atliktas fagų genomines DNR metilinimo laipsnio nustatymas su EZ DNA Methylation- Gold™ Kit rinkiniu (2.2.11 skyrelis). Darbuose naudota VinS9, RaK2 ir T4 genomine DNR. Bakteriofago T4 DNR sudėtyje esančio citozino metilinimas buvo įrodytas jau anksčiau (Miller ir kt., 2003). Šiuo atveju, T4 bakteriofago DNR naudota kaip kontrolė, siekiant įsitikinti pasirinktojo metodo veiksmingumu dirbant su fagų genominėmis DNR ir palyginti gautuosius rezultatus tarpusavyje.

Išskirta fagų genomine DNR buvo paveikta demetilinimo rinkinio reagentais. Po to, naudojant specifinius pradmenis, suamplifikuoti žinomų sekų DNR fragmentai, kurie siųsti sekvenuoti į Biotechnologijos instituto Sekoskaitos centrą. Tirtųjų bakterijų virusų genomo fragmentų sekos prieš ir po numetilinimo pateikiamos žemiau. Jei prieš reakciją C nukleotidai buvo metilinti, tai jie ir po numetilinimo lieka C, o jei nebuvo metilinti, tai po reakcijos virsta į U. Bakteriofagų genomo fragmentų sekos prieš ir po numetilinimo EZ DNA Methylation- Gold™ Kit rinkiniu pateikiamos žemiau esančiuose paveiksluose.

```

T4_prieš      GGGCTCGTGAATTTATTGCTAAGAATCCC GGGTTTTATAATATCAATCGT 50
T4_po        GGGCTCGTGAATTTATTGCTAAGAATCCC GGGTTTTATAATATCAATCGT 50
*****

T4_prieš      GATGACTATCGCCAATCTATTATGGCGCATGAAGAACGCGATGAGTACAA 100
T4_po        GATGACTATCGCCAATCTATTATGGCGCATGAAGAACGCGATGAGTACAA 100
*****

T4_prieš      GTATACCAAAAAGAAAGAAGGTATCGTAACTGGTATGCAGTTTGATACAG 150
T4_po        GTATACCAAAAAGAAAGAAGGTATCGTAACTGGTATGCAGTTTGATACAG 150
*****

```

3.2 pav. Bakteriofago T4 geno fragmento sekos palyginimas prieš ir po numetilinimo EZ DNA Methylation- Gold™ Kit rinkiniu.

```

RaK2_prieš    ACATAGTAGTTCAAAAGCTGTTAATGGTGTATTGGAATTAGGAGGAGTTC 50
RaK2_po      ACATAGTAGTTCAAAAGCTGTTAATGGTGTATTGGAATTAGGAGGAGTTC 50
*****

RaK2_prieš    AAGGCTTTCAACACAATAATAATACGTATACATCTGTGTTGGTTGGAACT 100
RaK2_po      AAGGCTTTCAACACAATAATAATACGTATACATCTGTGTTGGTTGGAACT 100
*****

RaK2_prieš    GGTACAAATTAGATAAAAACAACACCAGTGTATCAATTCAACAGTTC TTT 150
RaK2_po      GGTACAAATTAGATAAAAACAACACCAGTGTATCAATTCAACAGTTC TTT 150
*****

```

3.3 pav. Bakteriofago RaK2 geno fragmento sekos palyginimas prieš ir po numetilinimo EZ DNA Methylation- Gold™ Kit rinkiniu.

```

VinS9_prieš   GAAGATACCCGAAGATGAGCGGC TGGTAATCCCATTCTGGACCCAAGAC 50
VinS9_po     GAAGATA TTTGAAGATGAG TGGT TGGTAAT TTTATT TTTGGA TTTAAGAT 50
*****

VinS9_prieš   GGGCGCATGAAGATAGTT CAGGGGCGGCATT CGGCGATAACC TTCC TGA 100
VinS9_po     GGG TGTATGAAGATAGTT TTAGGGG TGT TATT TGGT GATAA TTT TTT TGA 100
*** * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

VinS9_prieš   TGGGGTATTACGGTATGCCACTGTCAAGCCTAAGAACGAAGACACTAAAA 150
VinS9_po     TGGGGTATTATGGTATGTTATTGTTAAGTTTAAGAA TGAAGATATTAAAA 150
*****

```

3.4 pav. Bakteriofago VinS9 geno fragmento sekos palyginimas prieš ir po numetilinimo EZ DNA Methylation- Gold™ Kit rinkiniu.

Darbo metu surinkti duomenys patvirtino restrikinės analizės rezultatus, kad fagų T4 ir RaK2 genomine DNR yra metilinta, o VinS9 DNR ši modifikacija nėra būdinga.

3.4 Virionų struktūrinių baltymų analizė

Tam tikros taksonominės fagų grupės paprastai turi homologiškų esminių genų rinkinius, kuriuose dažniausiai būna ir struktūriniai genai, todėl atliekant bakteriofagų charakterizavimą ir priskyrimą konkrečiai taksonominei grupei, svarbi esminių struktūrinių

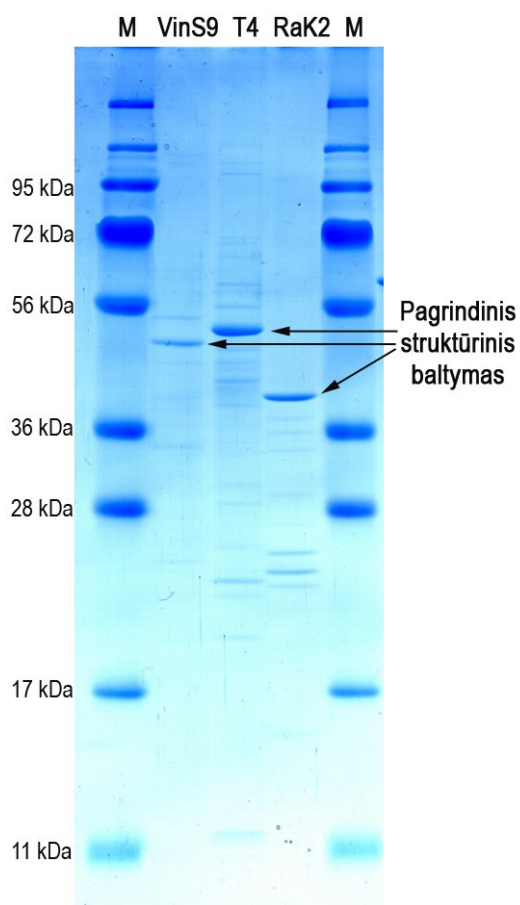
genų koduojamų produktų (pvz., fago T4 atveju gp18; gp19, gp23) palyginamoji analizė (Desplats ir Krisch, 2003).

Šio darbo metu buvo siekiama nustatyti, ar fagų VinS9 ir RaK2 virionų struktūriniai baltymai yra panašūs į fago T4 baltymus. Šiam tikslui pasiekti buvo atliekama virionų baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje, kurios metu naudoti tiriamųjų bakteriofagų. VinS9, RaK2 ir tipinio T4-tipo virusų atstovo, fago T4, virionų baltymų preparatai (3.5 pav.).

Atliktų darbų rezultatai leidžia manyti, kad VinS9 ir T4 pagrindinio struktūrinio baltymo dydis panašesnis nei T4 ir RaK2. Palyginus visų fagų hipotetinius gp23, nustatyta,

kad jų a.r. skaičius atitinka baltymų elektroforezės duomenis. Sekų palyginimas pateiktas 3.6 pav.

Nepaisant didelio genomo, RaK2 hipotetinis gp 23 yra mažiausias iš visų jo aptiktų homologų. Jį koduoja tik 1179 bp genas, daugumos kitų fagų šis genas siekia ~1,3 kb, o fago T4 - net 1563 bp. Darbo metu taip pat atliktas fagų RaK2 ir VinS9 potencialaus pagrindinio struktūrinio baltymo (gp23) sekų palyginimas su artimiausiais homologais (3.6 pav., 3.4 lentelė).



3.5 pav. Fagų VinS9, T4 ir RaK2 viriono baltymų dydžių palyginimas naudojant elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje.

3.4 lentelė Fagų gp23 dydžio ir sekų palyginimas.

Bakteriofago pavadinimas	Šeima/tipas	Genomo dydis (kb)	Gp23 b.p. sk.	Gp23 a.r. sk.	Gp23 m.m. (kDa)	a.r.identiškumas su VinS9 (%)	a.r.identiškumas su RaK2 (%)
<i>Salmonella</i> fagas VinS9		~150	1320	440	~48	-----	-----
<i>Klebsiella</i> fagas RaK2		~350	1179	393	~40	-----	-----
Enterobacteria fagas T4	<i>Myoviridae</i> , T4-tipas	169	1563	521	56,0	35,7	57,4
<i>Salmonella</i> fagas Vi01	<i>Myoviridae</i>	157	1320	440	48,0	98,9	28,1
<i>Shigella</i> fagas phiSboM-AG3	<i>Myoviridae</i>	158	1320	440	48,0	94,3	27,4
<i>Stenotrophomonas</i> fagas Smp14	<i>Myoviridae</i> , T4-tipas	~160	1239	412	44,5	41,0	29,2
<i>Campylobacter</i> fagas CP220	<i>Myoviridae</i>	178	1332	444	48,6	29,9	26,9
<i>Serratia</i> fagas KSP90	<i>Myoviridae</i>	-----	1323	441	48,4	84,6	28,0
<i>Deftia</i> fagas phiW-14	<i>Myoviridae</i>	157	1317	439	47,5	54,0	29,5

Nepaisant tam tikrų skirtumų, bei apibendrinus rezultatus galime teigti, kad tiek VinS9, tiek RaK2 turi tolimus fago T4 gp23, taip pat kitų struktūrinių baltymų homologus, kurių (kaip ir daugumos kitų šių fagų baltymų) nukleotidų sekos homologiškiausios *Myoviridae* šeimos bakteriofagų sekoms. Šie apibendrinimai kartu su elektroninės mikroskopijos nuotraukomis (žr. 1.4 ir 1.5 pav.), leidžia manyti, jog šiame darbe tiriami bakteriofagai VinS9 ir RaK2 galėtų būti priskiriami *Myoviridae* šeimai ir/ar netgi T4-tipui.

3.5 Esminių replikacinių genų palyginamieji tyrimai, komplementacijos eksperimentai

T4-tipo fagų esminių genų rinkinį sudaro struktūriniai ir replikacijos genai. Analizuojant sekas nustatyta, kad tiriamieji fagai VinS9 ir RaK2 turi bakteriofago T4 ne tik struktūrinių, bet ir esminių replikacijos genų tolimus homologus: g41 (helikazės), g61 (praimazės), g43 (DNR polimerazės), g44-62 (DNR polimerazės žiedo užkėlėjo). Atliktos palyginamosios analizės apibendrinti duomenys pateikti 3.5 lentelėje.

3.5 lentelė. Bakteriofagų VinS9, RaK2 ir T4 replikacijos baltymų homologų palyginimas.

Bakteriofagas	Baltymas	Baltymo a.r. sk.	Homologija su T4	
			a.r. sekų ident. (%)	a.r. sekų panaš. (%)
VinS9	Gp41	475	30,8	68,2
	Gp 44-62	471	39,5	61,9
	Gp 61	354	32,8	60,9
	Gp43	998	27,0	58,1
RaK2	Gp41	522	24,6	57,5
	Gp44-62	526	-----	-----
	Gp61	511	24,9	59,3
	Gp43	996	24,2	52,5

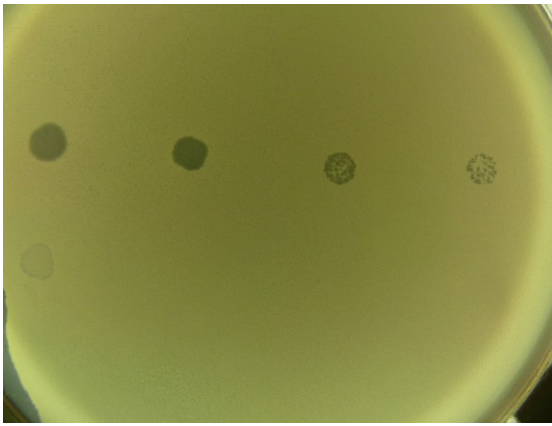
Fago VinS9 esminių hipotetinių funkcinių genų produktų sekos buvo nustatytos DNR fragmentuose, gautuose pagal jau žinomas fago genomo sekas užsisakant specifinius DNR oligonukleotidų pradmenis ir atliekant amplifikaciją PGR būdu (2.2.4 skyrelis) arba tiesiogiai nuo genomines DNR, išskirtos per Quick gDNATM MiniPrep kolonėlę, taikant gamintojo siūlomą protokolą (2.2.3 skyrelis). RaK2 esminių hipotetinių funkcinių genų produktų sekos buvo nustatytos gavus RaK2 genomo sekvenavimo rezultatus.

Kaip matome iš 3.5 lentelėje pateiktų duomenų, visų VinS9 replikacijos genų produktų a.r. identiškumas su atitinkamomis fago T4 sekomis yra 30-40%. Bakteriofago RaK2 atveju šis skaičius nesiekia net 25% (gp44-62 homologų E įverčio ribose iki 10 duomenų bazėse apskritai nepavyko rasti).

Siekiant patikrinti, ar bakteriofagų VinS9 ir RaK2 esminiai replikacijos genų produktai komplementuoja atitinkamų T4 genų produktų funkciją, atlikti komplementacijos eksperimentai. Jų metu tirta, ar VinS9 gp41, gp44-62, gp61 ir RaK2 gp41 gali atstatyti fago T4 atitinkamų esminių genų delecinių mutantų vystymąsi. Tam tikslui buvo sukonstruotos rekombinantinės plazmidės su įklonuotais VinS9 41, 44-62, 61 ir RaK2 41 genais. Atitinkami genai buvo gaunami PGR būdu, panaudojant specialiai užsakytus pradmenis, ir klonuojami į indukuojamo plazmidinio vektoriaus pBAD24 NcoI (bukintas) ir PaeI arba HindIII taikinius. pBAD24 vektorius pasirinktas dėl griežtos arabinoze indukuojamo promotoriaus reguliacijos ir dėl to, kad šis vektorius jau buvo išbandytas bakterijų esminių genų nulinių mutacijų komplementacijos tyrimuose (Guzman ir kt., 1995).

Transformavus gautomis rekombinantinėmis plazmidėmis *E. coli* GM2163 bakterijas, buvo indukciniėmis sąlygomis išsėjamos jų vejos ir ant jų lašinamos fago T4 atitinkamų esminių genų delecinių mutantų suspensijos. Deleciniai esminių genų mutantai nesivysto, jei šių genų produktai nesintetinami ląstelėse *in trans*. Tuo tarpu, jei nuo rekombinacinėse plazmidėse arabinoze indukuojamų genų produktai atstatytų trūkstamą fago T4 esminę funkciją, tai fagas vystytųsi ir vejose būtų formuojamos lizės zonos.

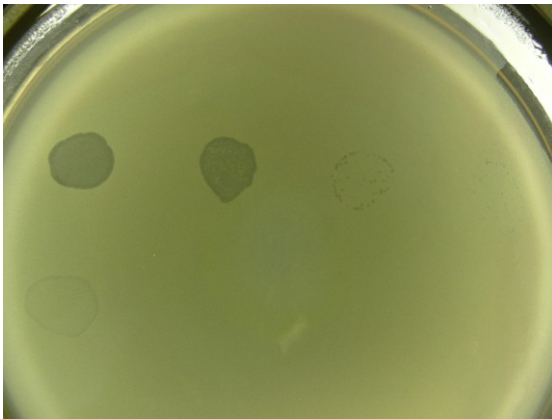
Palyginamosios analizės metu nustatyta, kad tiriamųjų fagų homologija T4 atžvilgiu nėra didelė, todėl tiriant hipotetinių fagų VinS9 gp41, gp44-62, gp61 ir RaK2 gp41 komplementaciją fago T4 atžvilgiu, minėtųjų genų produktų funkcijų atstatymas nebuvo tikėtinas. Rezultatus iliustruojančios nuotraukos pateikiamos apačioje.



T4 (laukinis fenotipas)

T4Δ41

3.7 pav. VinS9 gp41 komplementacija T4 gp41 atžvilgiu. Lašinimo testai atlikti su T4 ir T4Δ41, naudojant rekombinantines plazmides su VinS9 g41 turinčias *E. coli* GM2163_pBAD24_VinS9-41.



T4 (laukinis fenotipas)

T4Δ41

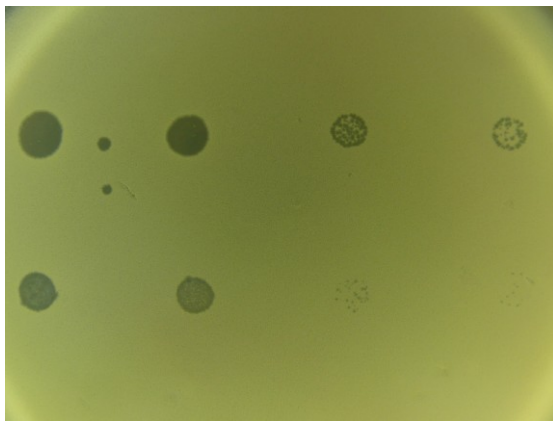
3.8 pav. RaK2 gp41 komplementacija T4 gp41 atžvilgiu. Lašinimo testai atlikti su T4 ir T4Δ41, naudojant rekombinantines plazmides su RaK2 g41 turinčias *E. coli* GM2163_pBAD24_RaK2-41.



T4 (laukinis fenotipas)

T4Δ44-62

3.9 pav. VinS9 gp44-62 komplementacija T4 gp44-62 atžvilgiu. Lašinimo testai atlikti su T4 ir T4Δ44-62, naudojant rekombinantines plazmides su VinS9 g44-62 turinčias *E. coli* GM2163_pBAD24_VinS9-44-62.



T4 (laukinis fenotipas)

T4Δ61

3.10 pav. VinS9 gp61 komplementacija T4 gp61 atžvilgiu. Lašinimo testai atlikti su T4 ir T4Δ61, naudojant rekombinantines plazmides su VinS9 gp61 turinčias *E. coli* GM2163_pBAD24_VinS9-61.

Komplementacija stebėta tik *E. coli* GM2163 pBAD24_VinS9-61 atveju, tačiau tai gali būti susiję su tuo, jog pačių komplementacijos eksperimentuose naudotų *E. coli* GM 2163 ląstelių praimazė komplementuoja atitinkamą T4 geno produktą (Benson ir Kreuzer, 1992). Išsėjus fagą T4Δ61 ant bakterijų sluoksnio be komplementacinės plazmidės, buvo gauti analogiški rezultatai.

Apžvelgiant visus gautus rezultatus, galima teigti, kad tiriamieji bakteriofagai labai skiriasi nuo fago T4, tačiau abu turi šio fago esminių genų tolimų homologų rinkinį, todėl ateityje galėtų būti priskiriami ne tik *Myoviridae* šeimai, bet ir T4 tipui, kuriame suformuotų atskiras grupes.

IŠVADOS

- VinS9 genominės DNR nukleotidų sekos homologiškiausios *Myoviridae* šeimai priklausančių *Salmonella* fago Vi01 (97-99%) ir *Shigella* fago phiSboM-AG3 (70-80%) genomų nukleotidų sekoms;
- Fago VinS9 genome yra koduojami fago T4 esminių struktūrinių (g21, g22, g23) ir replikacijos (g41 (helikazės), g61 (praimazės), g44-62 (DNR polimerazės žiedo užkėlėjo), g43 (DNR polimerazės) genų produktų homologai;
- Atlikus ~300 kb (iš ~ 350 kb) bakteriofago RaK2 genomo sekų analizę, nustatyti 362 hipotetiniai ASR, tarp kurių aptikti bakteriofagų esminių struktūrinių ir funkcinių genų produktų homologai;
- Didžioji dalis (63%) RaK2 ASR koduojamų baltymų aminorūgščių sekų neturi patikimos homologijos su kitų bakteriofagų genų sekomis, bet aptinkami kituose organizmuose (daugiausia bakterijose). 27% ASR koduoja baltymus, homologiškus kitų fagų baltymams ribose nuo 18% iki 58% (iš kurių didžioji dauguma pasižymi didžiausia a.r. sekų homologija su T4-tipo fagų a.r. sekomis). Likusių 10 % RaK2 ASR analogų NCBI duomenų bazėje nebuvo rasta;
- Bakteriofago RaK2 genominės DNR fragmentai yra metilinti, VinS9 – ne;
- VinS9 ir T4 pagrindinio struktūrinio viriono baltymo (gp23) dydžiai artimesni nei RaK2 ir T4, tačiau pastarųjų fagų didesnis a.r. sekų identiškumas;
- Nuo rekombinantinių plazmidžių indukuoti bakteriofagų VinS9 ir RaK2 gp41, taip pat VinS9 gp61 ir gp44-62 neatstato delecinių T4K10 fago mutantų atitinkamų genų funkcijų.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
MIKROBIOLOGIJOS IR BIOTECHNOLOGIJOS KATEDRA
Eugenijus Šimoliūnas
Naujų *Salmonella* ir *Klebsiella* bakteriofagų charakterizavimas

Magistrinio darbo SANTRAUKA

Šio darbo tikslas buvo dviejų naujų, Lietuvoje išskirtų, virulentinių bakteriofagų – *Salmonella* fago VinS9 ir *Klebsiella* fago RaK2 charakterizavimas genetiniais ir biocheminiais metodais. Darbų metu atlikus bioinformacinę analizę paaiškėjo, kad fago VinS9 genomines DNR sekas homologiškiausios *Myoviridae* šeimai priklausančių *Salmonella* fago Vi01 (97-99%) ir *Shigella* fago phiSboM-AG3 (70-80%) genomų sekoms. Pilnai nustatytos fago VinS9 koduojamos T4 esminių struktūrinių (g21, g22, g23) ir funkcinių (g41 (helikazės), g61 (praimazės), g44-62 (DNR polimerazės žiedo užkėlėjas), g43 (DNR polimerazės)) genų produktų homologų sekos. Darbo metu taip pat atlikta ~300 kb (iš esamų ~ 350 kb) bakteriofago RaK2 genomo sekų analizė, nustatyti 362 hipotetiniai ASR, tarp jų esminių bakteriofagų struktūrinių ir funkcinių genų produktų homologai. Atskleista, kad didžioji dalis (63%) RaK2 ASR neturi patikimos homologijos su kitų bakteriofagų genų sekomis, bet aptinkami kituose organizmuose (daugiausia bakterijose). 27% ASR koduoja baltymus, homologiškus kitų fagų baltymams ribose nuo 18% iki 58% (iš kurių didžioji dauguma pasižymi didžiausia a.r. sekų homologija su T4-tipo fagų a.r. sekomis). Likusių 10 % RaK2 ASR analogų NCBI duomenų bazėje nebuvo rasta. Bakteriofagų genomines DNR metilinimo tyrimais įrodyta, kad tirtieji RaK2 genomines DNR fragmentai yra metilinti, o VinS9 – ne. Tuo tarpu fagų virionų struktūrinių baltymų analizė atskleidė, kad VinS9 ir T4 pagrindinio struktūrinio viriono baltymo (gp23) dydžiai yra artimesni nei RaK2 ir T4, tačiau RaK2 ir T4 hipotetinio gp23 didesnis a.r. sekų identiškumas. Taip pat nustatyta, kad nuo rekombinantinių plazmidžių indukuoti bakteriofagų VinS9 ir RaK2 gp41, taip pat VinS9 gp61 ir gp44-62 neatstato delecinių T4 fago mutantų atitinkamų genų funkcijų. Gauti rezultatai leidžia manyti, kad ateityje bakteriofagai VinS9 ir RaK2 galėtų būti priskiriami *Myoviridae* šeimos į T4 fagą panašių virusų tipui, kuriame galėtų suformuoti atskiras grupes.

VILNIUS UNIVERSITY

FACULTY OF NATURAL SCIENCES

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Eugenijus Šimolūnas

Characterization of new *Salmonella* and *Klebsiella* bacteriophages

Master thesis SUMMARY

The aim of this work was to biochemically and genetically characterize two novel, virulent bacteriophages VinS9 and RaK2 infecting *Salmonella* and *Klebsiella*, respectively. Bioinformatic analyses uncovered that the genomic DNA sequences of bacteriophage VinS9 have the biggest homology with *Salmonella* phage Vi01 (97-99%) and *Shigella* phage phiSboM-AG3 (70-80%) which belong to the *Myoviridae* family. The sequences of Vins9 hypothetical ORFs were determined and it was also shown that they share homology with phage's T4 essential structural (g21, g22, g23) and functional (g41 (helicase), g61 (primase), g44-62 (DNA clamp-loader subunits), g43 (DNA polymerase)) genes. RaK genome sequences were also analyzed, where ~300 kb of the total ~ 350 kb genome contained 362 hypothetical ORFs showing homologies with essential structural and functional genes of other bacteriophages. It was established, that most of the RaK2 ORFs (63%) do not have reliable homology with sequences of other phages, but are found in other organisms, especially in bacteria. 27% ORFs codes proteins, that share homology with proteins of other phages with identity between 18% and 58% (most of them are the most homological with genome sequences of phage T4). The last 10% ORFs of the phage RaK2 had no homologues in national databases tested. DNA methylation experimental analyses unraveled that RaK2 genomic DNA fragments are methylated, while VinS9 genomic DNA fragments were not. The analysis of phages structural virion proteins showed that the size of hypothetical gp23 protein of phage VinS9 and gp23 of phage T4 are more similar than hypothetical gp23 protein of phage RaK2 and gp23 of phage T4. Meanvile T4 and RaK2 have bigger homology with sequences of gp23 than T4 and VinS9. The complementation tests showed that gp41 of phages VinS9 and RaK2 and gp61, gp44-62 of VinS9 do not restore the functions of the same gene products in phage T4 deletion mutants. Results of this work suggest that in the future phages VinS9 and RaK2 should be classified as members of the family *Myoviridae* and may form a new subgroup within the super family of T4 related bacteriophages.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abuladze, T.** ir kt. (2008) "*Bacteriophages Reduce Experimental Contamination of Hard Surfaces, Tomato, Spinach, Broccoli, and Ground Beef by Escherichia coli O157:H7*" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, p. 6230–6238.
- Ackerman, H.-W.** ir **DuBow, M.S.** (1987) "*General Properties of Bacteriophages*" Viruses of Prokaryotes, Vol. 1, pp. 13–28 ir 130–135.
- Ackerman H. W.** ir **Krisch H. M.** (1997). "*A Catalogue of T4-type Bacteriophages.*" Arch Virol 142:2329-45.
- Ackerman, H. W.** (2005). "*Bacteriophage Classification.*" In: Bacteriophages Biology and Applications. Kutter, E. and Sulakvelidze, A. eds. CRC Press.
- Ackerman, H. W.** (2006) "*5500 Phages examined in the electron microscope*" Archives of Virology 152 p. 227–243
- Ackerman H. W.** (2008). "*Phage Classification and Characterization.*" In: Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, vol. 501. Martha R.J. Clokie, Andrew M. Kropinski (eds.), p. 127-140.
- Arisaka F.** (2005). "*Assembly and Infection Process of Bacteriophage T4.*" Chaos 15:047502.
- Bamford, D. H.** (2005) (a). Family *Tectiviridae*. In: "*Virus Taxonomy: VIIIth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses*". (C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U.).
- Bamford, D. H.** ir kt. (2005) (b). "*What does structure tell us about virus evolution?*" Current Opinion in Structural Biology, 15:655–663.
- Barman, P.** ir **Gadre D.** (2006) "*A Study Of Phage Based Diagnostic Technique For Tuberculosis*" Indian J Tuberc 54:36-40.
- Benson, K. H** ir **Kreuzer, K. N.** (1992). "Plasmid models for bacteriophage T4 DNA replication: requirements for fork proteins". J. Virology, 66, 6960-6968.
- Carlton, R. M.** (1999) "*Phage Therapy: Past History and Future Prospects*" Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 47, p. 267–274
- Colomer-Lluch, M.** (2011) "*Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples*" PLoS ONE 6(3): e17549.
- Comeau, A. M.** ir kt. (2007) "*Modular architecture of the T4 phage superfamily: A conserved coregenome and a plastic periphery*" Virology 362 p. 384–396.
- Comeau A. M.** ir **Krisch H. M.** (2008). "*The Capsid of the T4 Phage Superfamily: the Evolution, Diversity and Structure of the Most Prevalent Proteins In the Biosphere.*" Mol Biol Evol 25:1321-32.
- Desplats, C.** ir **Krisch, H. M.** (2003). "*The Diversity and Evolution of the T4-type Bacteriophages.*" Res Microbiol 154:259-67.

- Fauquet, CM** ir kt. (2005) *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press/Elsevier, London,
- Fauquet, CM** ir **Fargette, D** (2005) "*International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species*" *Virology Journal* 2:64
- Fiers W.** ir kt. (1976). "*Complete Nucleotide Sequence of Bacteriophage MS2 RNA: Primary and Secondary Structure of the Replicase Gene.*" *Nature* 260:500-7.
- Friman, V. P.** (2011) "High Temperature and Bacteriophages Can Indirectly Select for Bacterial Pathogenicity in Environmental Reservoirs" *PLoS ONE* 6(3): e17651.
- Guntupalli, R.** ir kt. (2008) "*Real-time optical detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using lytic phage probes*" *Biosensors and Bioelectronics* 24 p.151–154
- Guzman, L.M.** ir kt., (1995). "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose" PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177, 4124-4130.
- Hatfull, G. F.** (2006) "*Exploring the Mycobacteriophage Metaproteome: Phage Genomics as an Educational Platform*" *PLoS Genetic* 2(6): e92.
- Hendrix, R. W.** (2008) "*Phage evolution*" In: *Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses*, S. T. Abebon (ed.) p.177-179
- Kanamaru, S.** (2009) "*Structural similarity of tailed phages and pathogenic bacterial secretion systems*" *PNAS* 106 (11) , p 4067–4068
- Kropinski, A. M.** (2006) "*Phage therapy – Everything old is new again*" *Can J Infect Dis Med Microbiol* 17(5):297-306.
- Krupovič, M.** ir kt. (2010) "*Comparative Analysis of the Mosaic Genomes of Tailed Archaeal Viruses and Proviruses Suggests Common Themes for Virion Architecture and Assembly with Tailed Viruses of Bacteria*" *J. Mol. Biol.* 397, p. 144–160.
- Kutter, E.** ir **Sulakvelidze, A.** (2004) "*Bacteriophages: biology and applications*". CRC Press:
- Labrie, S. J.** ir kt. (2010) "*Bacteriophage resistance mechanisms*" *Nature reviews Microbiology* 8(5):317-327.
- Lavigne, R.** ir kt. (2008) "*Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the Podoviridae using BLASTP-based tools*" *Research in Microbiology* 159, p. 406-414.
- Lavigne, R.** ir kt. (2009). "*Classification of Myoviridae Bacteriophages Using Protein Sequence Similarity.*" *BMC Mikrobiol*, 9:224.
- Mahoni, J.** ir kt. (2011) "*Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens*" *Current Opinion in Biotechnology* 22 p.157–163.

Manderville, R. A. ir **Kropinski, A. M.** (2009) "*Approaches to the Compositional Analysis of DNA*" Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 2: Molecular and Applied Aspects, vol. 502 Martha R.J. Clokie, Andrew M. Kropinski (eds.),11-17.

Matsuzaki, S. ir kt. (2005). "*Bacteriophage Therapy: a Revitalized Therapy Against Bacterial Infectious Diseases.*" J Infect Chemother. 11(5): p. 211-9.24

Meipariani, A. (2009). "*The Use of Bacteriophages Against Infections.*" www.phageinternational.com/phagetherapy/infectionsphagetherapy.htm

Miller, E. S. ir kt. (2003) "*Bacteriophage T4 Genome*" MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, p. 86–156.

Nishikawa, H. ir kt. (2008) "*T-even-related bacteriophages as candidates for treatment of Escherichia coli urinary tract infections*" Arch Virol 153:507–515

Prescott, L. (1993). Microbiology, Wm. C. Brown Publishers, ISBN 0-697-01372-3.

Sambrook, J. F. ir kt., (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2(nd) ed. Cold Spring harbor, N.Y.: Cold Spring harbor Laboratory Press.

Server, P. ir kt. (2007) "*Propagating the missing bacteriophages: a large bacteriophage in a new class*" Virology Journal 2007, 4:21

Sullivan, M. B. (2005) "*Three Prochlorococcus Cyanophage Genomes: Signature Features and Ecological Interpretations*" PLoS Biol 3(5): e144.

Suttle, C. A. (2005) "*Viruses in the sea*" NATURE Vol 437 (356-361).

Thiel, K. (2004) "*Old Dogma, New Tricks-21 Century Phage Therapy*" J NATURE BIOTECHNOLOGY, 22 (1) p. 31-36.

Tormo-Mas, M. A. (2010) "*Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands*" Nature, vol. 465 p.(779- 783).

Wommack, K. E. ir **Colwell R. R.** (2000) "*Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems*". Microbiol Mol Biol Rev, 64(1): p. 69-114.

Yim, P. B. ir kt. (2009) "*Quantitative Characterization of Quantum Dot-Labeled Lambda Phage for Escherichia coli Detection*" Biotechnology and Bioengineering 104 (6) p.1059-1067

Zafar, N. ir kt. (2002) "*CoreGenes: A computational tool for identifying and cataloging "core" genes in a set of small genomes*" BMC Bioinformatics 3:12

Internetiniai šaltiniai:

1. <http://www.phagetherapycenter.com>

2 <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>

3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=10239&type=6&name=Phages>

4.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=10663&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>