

На правах рукописи

Буркальцева Мария Владленовна

**ИЗУЧЕНИЕ ДВУХ ГРУПП УНИКАЛЬНЫХ - фKZ-ПОДОБНЫХ И
T7-ПОДОБНЫХ - БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Специальность 03.00.03 - молекулярная биология.

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2005

Работа выполнена в лаборатории генетики бактериофагов Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор В.Н. Крылов

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор С.В. Каменева

доктор биологических наук
В.З. Ахвердян

Ведущая организация:

Институт общей генетики РАН

Защита диссертации состоится “___” _____ 2005 г. в _____ часов на заседании
Диссертационного совета Д.217.013.01 при Государственном научно-исследовательском
институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов по адресу: 117545, г.
Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГосНИИ Генетика.

Автореферат разослан _____ 2005 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук,



В.И. Щербакова

2006-4
16362

2182696

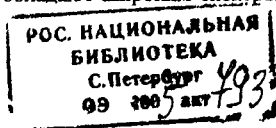
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последнее время резко увеличилось количество сообщений о появлении клинических изолятов патогенных бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам (multi-drug-resistant bacteria). Как следствие этого возникла идея возрождения фаготерапии как метода лечения бактериальных инфекций. Однако введение фаготерапии в широкую практику ограничивается определенной опасностью при использовании бактериофагов (фаговая конверсия, трансдукция и распространение островков патогенности и др.). Поэтому во всех работах, где рассматривается возможность применения фаготерапии, считается обязательным всестороннее изучение используемых бактериофагов, вплоть до определения полной последовательности геномов.

Среди патогенных бактерий особое значение имеют бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Они являются причиной раневых и ожоговых инфекций, осложнений после хирургических операций и поражений различных органов при иммунодефицитных состояниях и др. *P. aeruginosa* колонизирует легкие больных наследственным заболеванием кистозным фиброзом, что в конечном итоге приводит к летальному исходу. Этот вид микроорганизмов является этиологическим агентом 15-20% всех внутрибольничных инфекций. Такая частая встречаемость *P. aeruginosa* среди клинических изолятов вызвана устойчивостью бактерий данного вида ко многим широко используемым антибиотикам а также их способностью легко и быстро образовывать биопленки, непроницаемые для антибиотиков и ферментов, а также генетических векторов, несущих гены, комплементирующие дефектный ген CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene) при кистозном фиброзе.

В настоящей работе мы провели детальное исследование двух групп бактериофагов *P. aeruginosa*, представляющих большой научный и практический интерес.

Цель и задачи исследования. Первая группа исследованных фагов – это гигантские фКЗ-подобные бактериофаги. Фаги этой группы обладают широким спектром литической



активности и часто присутствуют в коммерческих препаратах для фаготерапии. Первым из этой группы был исследован фаг фКЗ *P. aeruginosa* [Крылов В.Н., Жазыков И.Ж. 1978], относящийся к семейству *Myoviridae*. Особые свойства фага фКЗ: широкий спектр литической активности, очень большой конечный выход, гигантский размер фаговой частицы, необычный способ упаковки ДНК, а также особенности генома фКЗ делают этот фаг интересным объектом как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Поэтому для первой части настоящей работы были поставлены следующие цели: дальнейшее изучение фага фКЗ, определение распространенности родственных ему фагов в популяциях *Pseudomonas* разных регионов, выделение в этих регионах новых фКЗ-подобных фагов, их изучение и сравнение с ранее классифицированными фагами этой группы с целью оценки их родства и путей эволюции.

Целью второй части настоящей работы было исследование новой группы впервые выделенных бактериофагов *P. aeruginosa*, стратегия развития которых сходна с фагом T7 *E. coli* (фКМV-подобные фаги). Эти фаги также обладают набором уникальных свойств и являются активными компонентами большинства фаготерапевтических смесей.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые исследована группа гигантских фКЗ-подобных фагов *P. aeruginosa*, выделенных в различных регионах. Фаги данной группы проявляют значительное сходство по многим генетическим и фенотипическим признакам: внешнему виду негативных колоний, размеру и морфологии фаговой частицы, широкому спектру литической активности, способности преодолевать подавляющее действие многих плазмид, размеру генома, устойчивости ДНК к действию определенных эндонуклеаз, способности к общей трансдукции и др. На основании проведенных исследований (в том числе сравнения спектра литической активности, инактивации сывороткой, рестрикционного и гибридизационного анализов фаговой ДНК, анализа полипептидного состава зрелых фаговых частиц, N-концевой последовательности мажорного капсидного белка и др.) проведена классификация фКЗ-подобных фагов. Сделан

вывод, что фаги этой группы являются филогенетически родственными и представлены тремя видами: фКZ, Lin68 и EL нового рода фКZ семейства *Myoviridae*. Показано, что доминирующими в природных популяциях являются бактериофаги вида фКZ (11 из 15 выделенных фагов данной группы). Фаг фКZ обладает наибольшим геномом (около 300 т.п.н.) среди вирусов бактерий с известной полной последовательностью ДНК. В геноме фКZ идентифицировано 306 потенциальных открытых рамок считывания, из них только 59 кодируют продукты с известной функцией. Шесть представлены собственными тРНК, остальные - в основном белками, связанными с метаболизмом предшественников нуклеиновых кислот. Особенностью фКZ является отсутствие генных продуктов, сходных с какой-либо из известных ДНК-полимераз и наличие у него генов, кодирующих белки, гомологичные продуктам различных эукариотических организмов и патогенных бактерий.

Впервые выделен и изучен T7-подобный фаг фКMV, активный на бактериях *P. aeruginosa* и имеющий ряд уникальных свойств: очень большой размер негативной колонии, очень высокая скорость роста, рост на бактериях, утративших способность поддерживать рост других фагов, устойчивость ДНК к очень большому количеству эндонуклеаз рестрикции и др. Геном фага фКMV (42 519 п.н.) содержит 48 предполагаемых генов. Несмотря на отсутствие гомологии на уровне ДНК, 11 из 48 предполагаемых генных продуктов фага фКMV, в том числе РНК-полимераза, белки, участвующие в репликации ДНК, некоторые структурные белки имеют сходство на аминокислотном уровне с белками T7-подобных фагов энтеробактерий. Нами исследовано 8 новых фКMV-подобных фагов, выделенных в различных регионах. Все фКMV-подобные фаги по совокупности генетических и фенотипических признаков отнесены к одному новому виду фКMV семейства *Podoviridae*.

Обе группы изученных фагов представляют несомненный интерес для научных исследований и перспективны для практического применения. Особенности роста и развития являются ценными свойствами этих фагов применительно к фаготерапии. Их

литические ферменты могут быть потенциальными кандидатами на использование в качестве антимикробных агентов (энзибиотиков) в клинической терапии. Способность продуцировать свои собственные РНК-полимеразу или тРНК также делают эти фаги привлекательным объектом молекулярно-биологических исследований и биотехнологии.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 115 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 16 рисунков. Библиография включает в себя 193 отечественных и зарубежных литературных источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 1. фKZ-ПОДОБНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ

1.1. Сравнение биологических свойств фагов.

Бактериофаги и их происхождение. Происхождение фага фKZ – Казахстан [Крылов В.Н., Жазыков И.Ж. 1978]. Бактериофаги, которые позднее были отнесены к двум видам фKZ и Lin68 [Krylov V.N., Tolmachova T.O., Akhverdian V.Z., 1993], имеют разное происхождение. Фаг Lin21 из типизирующей коллекции Линдберга [Lindberg R.B. et al., 1964] и фаг PTB80 [Krylov V.N., Tolmachova T.O., Akhverdian V.Z., 1993], выделенный из коммерческого препарата фагов, были отнесены к виду фKZ. Бактериофаг Lin68 из коллекции Линдберга [Lindberg R.B. et al., 1964], сходный с фKZ по морфотипу и размеру

Таблица 1. Происхождение фKZ –подобных бактериофагов

Бактериофаги	Происхождение
фKZ	Казахстан
Lin68, Lin21	коллекция Линдберга (США)
PTB80, NN	коммерческие препараты (Грузия, Нижний Новгород)
EL, RU; LBG (LBG20, LBG21, LBG22, LBG23, LBG26)	водоемы Москвы и Московской области
PBD (PBD1, PBD2, PBD3, PBD4)	р. Дунай (Германия)

генома, был отнесен к другому виду. Новые фаги были выделены в нашей лаборатории в ходе настоящей работы из различных природных водоемов и коммерческих терапевтических препаратов (таблица 1).

Фенотип негативных колоний фагов. Характерный признак всех фKZ-подобных фагов - опалесцирующие («голубые») негативные колонии. Негативные колонии фагов EL и RU отличаются меньшим размером и более сильной опалесценцией.

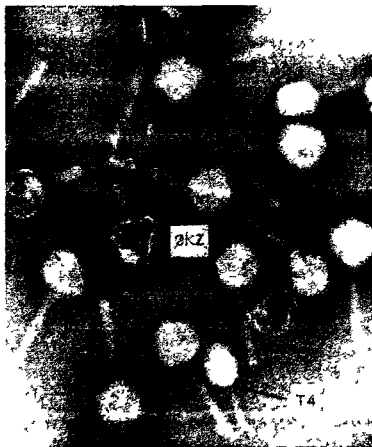


Рисунок 1. Частицы фага фKZ.

Морфология фаговых частиц. Частица бактериофага фKZ обладает очень большими размерами (рис 1): диаметр икосаэдрической головки составляет 120 нм, несокращенный хвостовой отросток имеет длину 180 нм и ширину 20 нм [Крылов В.Н. и др., 1978.] Анализ электронных микрофотографий фKZ-подобных фагов показал, что размеры капсида у них одинаковы. У фага LBG22 обнаружен сходный с Lin68 признак - укороченный хвост (порядка

160 нм). Остальные фаги не отличаются по этому признаку от фKZ.

Спектр литической активности. Учитывая использование фKZ-подобных фагов в коммерческих терапевтических смесях, представляло интерес выяснить возможные отличия по спектру роста между данными фагами, прежде всего на клинических бактериальных штаммах, на фагоустойчивых мутантах и на штаммах с плазмидами.

Оказалось, что фаги исследуемой группы обладают наиболее широким спектром литической активности среди других вирулентных фагов *P. aeruginosa* и способны развиваться на 50-60% всех клинических изолятов, причем часто только фаги этой группы способны их лизировать. Использование всех других известных видов вирулентных фагов повышает долю лизируемых клинических штаммов не более чем на 20%.

Таблица 2. Дифференциация фКЗ-подобных бактериофагов по спектру литической активности.

Бактериофаги	Бактерии					
	<i>P. aeruginosa</i>					<i>P. fluorescens</i> №9 и №21 биовара IV
	PAO1	PAO1 EL ^k (11, 14, 17)*	RV11	PAO303 (Rms148)	PAO38 (PMG53)	
фКЗ	+	+	-	-	-	-
Lin21	+	+	+	-	-	-
PTB80	+	+	+	-	-	-
Lin68	+	+	+	+	-	+
NN	+	+	+	-	-	-
EL	+	-	+	-	-	-
RU	+	-	+	-	-	-
LBG20	+	+	+	-	-	-
LBG21	+	+	+	-	-	-
LBG22	+	+	+	+	-	+
LBG23	+	+	+	-	-	-
LBG26	+	+	+	-	-	-
PBD1	+	+	-	-	-	-
PBD2	+	+	+	-	-	-
PBD3	+	+	+	-	-	-
PBD4	+	+	+	-	-	-

(+) – наличие роста, (-) – отсутствие роста, * – три штамма, отличающиеся по морфологии колоний, отобранные по устойчивости к фагу EL; RV11 – клинический изолят; PAO303(Rms148) и PAO38(PMG53) – получены от д-ра Jacoby G.A. (США); штаммы *P. fluorescens* получены от д-ра Кочеткова В.В. (ИБФМ, Пушкино)

Большинство плазмид из коллекции д-ра Jacoby G.A. (США), использованных в опыте (8 из 10) (PMG73, Rms139, PMG1, PMG35, Rms165, Rip64, RPL11, Rms163), не оказывали влияния на рост фагов изучаемой группы. Подавление обнаружено только в случае плазмид Rms148 (IncP9) и PMG53 (IncP2). Плазмида PMG53 полностью подавляет рост всех фКЗ-подобных фагов, а Rms148 – всех, кроме Lin68 и нового фага LBG22 (таблица 2).

Все фаги группы фКЗ кроме EL и RU растут практически на всех 70 фагоустойчивых мутантах *P. aeruginosa* PAO1, отобранных к различным бактериофагам в ходе настоящей работы и ранее. Лишь в редких случаях рост этих фагов немного ухудшается. Фаги EL и RU

растут на 50 фагоустойчивых мутантах. Все мутанты, полученные как устойчивые к EL или RU, не ограничивают рост остальных фагов данной группы.

Отличительной особенностью фагов Lin68 и LBG22 оказалась их способность инфицировать, хотя и с низкой эффективностью, два штамма родственного вида бактерий *P. fluorescens* №9 и №21 биовара IV.

Инактивация сывороткой. Использование специфической анти-φKZ сыворотки позволило распределить φKZ-подобные фаги в три группы. Фаги Lin21 и PTB80 относящиеся к виду φKZ, а также большинство новых фагов полностью инактивируются анти-φKZ сывороткой. Фаги Lin68 и LBG22 инактивируются со значительно меньшей эффективностью. Фаги EL и RU совсем не инактивируются анти-φKZ сывороткой. Таким образом, белки фаговой частицы, ответственные за адсорбцию, существенно различаются у разных представителей φKZ-подобных фагов.

1.2. Сравнение геномов фагов.

Сравнение размеров геномов. Геном бактериофага φKZ содержит 280 334 п.н. [Mesyanzhinov V V. et al., 2002]. Одинаковый размер капсидов фаговых частиц исследуемых фагов и данные рестрикционного анализа свидетельствуют, что размеры геномов других φKZ-подобных фагов сопоставимы с размером генома φKZ (больше 250 т п.н.), у фагов EL и RU размер генома может быть чуть меньше.

Сравнение рестрикционных профилей ДНК. На рис. 2 приведены результаты рестрикции ДНК φKZ-подобных фагов эндонуклеазой *HindIII*. Четырнадцать из шестнадцати бактериофагов обладают уникальным рестрикционным профилем. По характеру рестрикции все φKZ-подобные фаги делятся на три группы. Первая группа - фаги NN, LBG20, LBG21, LBG23, и LBG26, а также фаги PBD - проявляют значительное сходство с фагами, отнесенными ранее к виду φKZ (φKZ, Lin21 и PTB80) и содержат много идентичных фрагментов ДНК, что свидетельствует об определенной ограниченности числа и распределения сайтов рестрикции в геномах этих фагов. Более того, ДНК двух пар фагов:

LBG21 - LBG26 и PBD1 - PBD2, выделенных из разных природных источников, оказались идентичны между собой по характеру рестрикции при использовании разных эндонуклеаз. В то же время, как было показано выше, фаги PBD1 и PBD2 отличаются по росту на штамме RV11. Возможно, геномы этих фагов различаются точечными мутациями, неразличимыми при рестрикционном анализе.

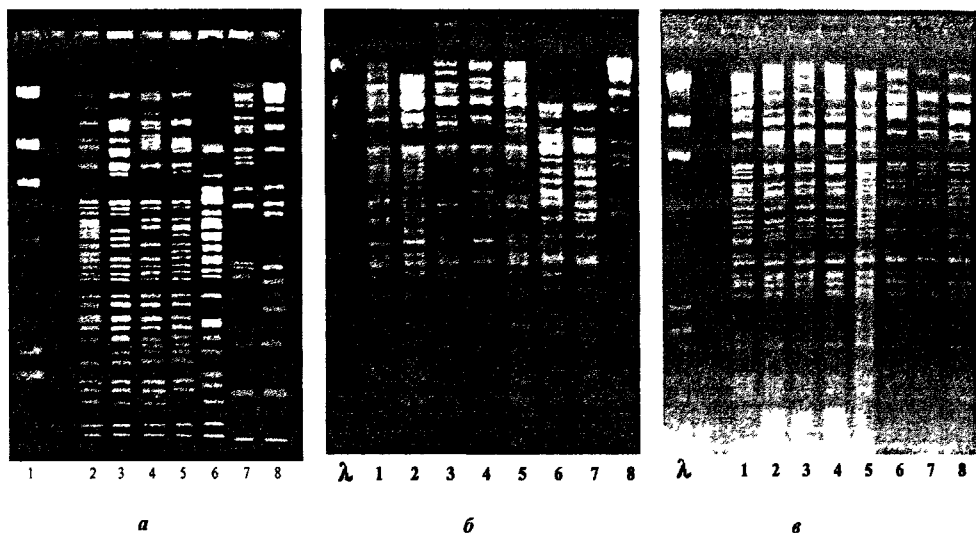


Рисунок 2. Характер рестрикции ДНК фКЗ-подобных бактериофагов эндонуклеазой *Hind III*:

а: 1 – λ, 2 – фКЗ, 3 – Lin21, 4 – PTB80, 5 – NN, 6 – Lin68, 7 – EL, 8 – Ru

б: 1 – фКЗ, 2 – LBG20, 3 – LBG21, 4 – LBG23, 5 – LBG26, 6 – LBG22, 7 – Lin68, 8 – Ru.

в: 1 – фКЗ, 2 – PBD1, 3 – PBD2, 4 – PBD3, 5 – PBD4, 6 – PTB80, 7 – Lin21, 8 – NN

Вторую группу фКЗ-подобных фагов со сходным типом рестрикции составляют фаги LBG22 и Lin68 (рис. 2а и 2б), имеющие много других характерных общих свойств. Третья группа – это фаги EL и RU, которые проявляют сходный характер рестрикции, существенно отличающийся от всех остальных фКЗ-подобных фагов (рис. 2а)

Определение гомологии ДНК Для определения степени гомологии ДНК внутри изучаемой группы фагов нами была проведена гибридизация ДНК новых фКЗ-подобных фагов с ДНК фагов фКЗ, LBG22 и EL (рис. 3 и 4). Эти фаги представляют три группы фКЗ-подобных фагов, различающихся по характеру рестрикции. Как можно видеть на рис. 3,

ДНК новых фагов NN, LBG20, LBG21, LBG23, и LBG26, а также фагов Lin21 и PTB80 проявляет высокую степень гомологии с ДНК фага фKZ. Для фагов группы PBD ДНК-ДНК гибридизация не проводилась, т.к. по характеру рестрикции они минимально отличаются от фагов вида фKZ (рис. 2в). Полученные данные позволяют отнести фаги NN, LBG20, LBG21, LBG23, LBG26 и фаги группы PBD к виду фKZ.

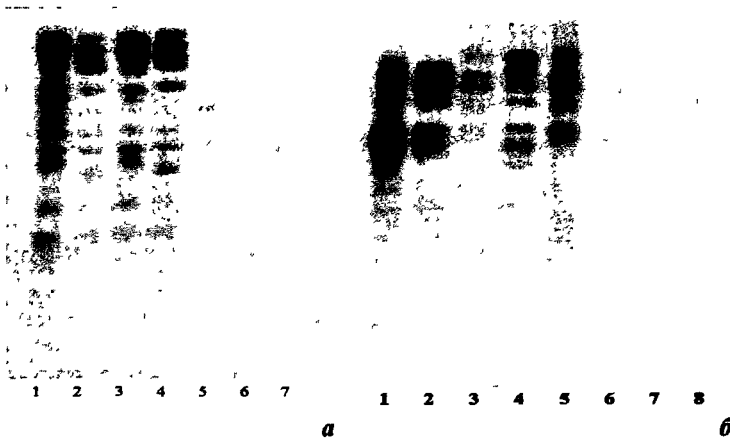


Рисунок 3. Гибридизация по Саузеру фрагментов ДНК фKZ-подобных бактериофагов после обработки эндонуклеазой *Hind III* с меченой ^{32}P ДНК фага фKZ.

а: 1 – фKZ, 2 – PTB80, 3 – Lin21, 4 – NN, 5 – Lin68, 6 – EL, 7 – RU
б: 1 – фKZ, 2 – LBG20, 3 – LBG21, 4 – LBG23, 5 – LBG26, 6 – LBG22, 7 – Lin68, 8 – Ru.

Лишь один из новых фагов, LBG22, проявляет гомологию с фагом Lin68 (рис. 4а)

Все видимые рестрикционные фрагменты Lin68 гибридизуются с ДНК LBG22, поэтому оба фага мы отнесли к виду Lin68. Как видно на рисунках 3а,б и 4а фаги вида Lin68 проявляют слабую ДНК-гомологию с фагами вида фKZ. Это свидетельствует о прямом родстве этих видов, хотя их дивергенция и произошла, по-видимому, достаточно давно.

Фаги EL и RU имеют высокий уровень гомологии ДНК. В то же время они проявляют полное отсутствие явной ДНК-гомологии со всеми остальными фKZ-подобными фагами (рис. 4б). Это позволяет отнести фаги EL и RU к новому отдельному виду фKZ-подобных бактериофагов – виду EL. Таким образом, на основании данных по сравнению

геномов ϕ KZ-подобные бактериофаги можно отнести к трем видам: ϕ KZ, Lin68 и EL (таблица 3):



Рисунок 4. Гибридизация по Саузерну фрагментов ДНК ϕ KZ-подобных бактериофагов после обработки эндонуклеазой *Hind III*

a: с меченой 32 P ДНК фага LBG22: 1 – ϕ KZ, 2 – LBG20, 3 – LBG21, 4 – LBG23, 5 – LBG26, 6 – LBG22, 7 – Lin68, 8 – Ru.
б: с меченой 32 P ДНК фага EL: 1 – ϕ KZ, 2 – PTB80, 3 – Lin21, 4 – NN, 5 – Lin68, 6 – EL, 7 – RU.

Таблица 3. Классификация ϕ KZ –подобных бактериофагов

Вид	Бактериофаги
ϕ KZ	ϕ KZ, Lin21, PTB80, NN, LBG20, LBG21, LBG23, LBG26, PBD1, PBD2, PBD3, PBD4
Lin68	Lin68 и LBG22
EL	EL и RU

1.3. Сравнение полипептидного состава зрелых частиц.

На рис. 5 представлены результаты электрофоретического разделения структурных белков зрелых частиц фагов изучаемой группы. Общее количество выявляемых индивидуальных белков у разных фагов приближается к 40. Каждый из фагов содержит несколько мажорных белков, сходных по молекулярному весу с соответствующими белками других фагов. Все фаги вида ϕ KZ не отличаются друг от друга по набору белков. Фаги Lin68 и LBG22

содержат меньшее количество видимых полипептидов, чем фаги вида ϕ KZ и проявляют небольшое отличие между собой. Фаги вида EL отличаются по набору полипептидов от фагов двух других видов.

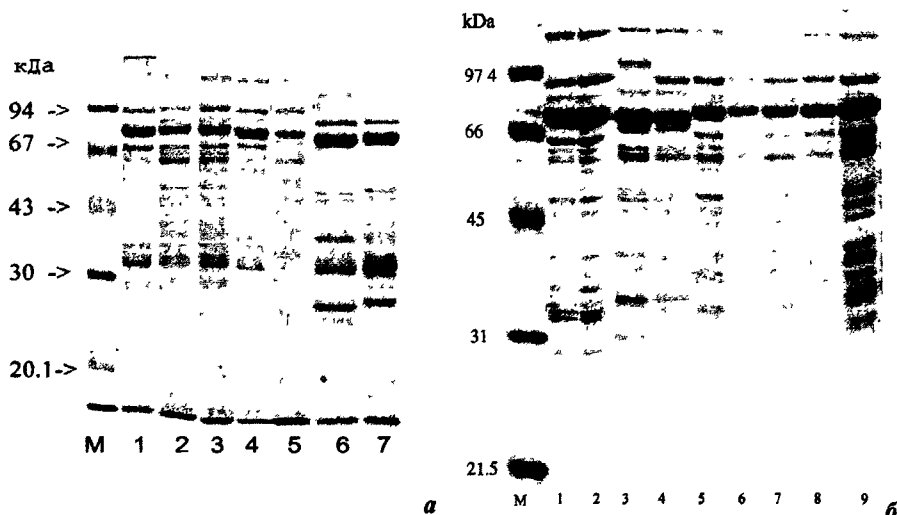


Рисунок 5. 12% SDS-ПААГ-электрофорез структурных белков ϕ KZ-подобных бактериофагов:

a: 1 – ϕ KZ; 2 – Lin21; 3 – PTB80; 4 – NN; 5 – Lin68;
6 – RU; 7 – EL

б: 1 – PBD4, 2 – PBD1, 3 – LBG22, 4 – Lin68,
5 – LBG26, 6 – LBG23, 7 – LBG21, 8 – LBG20, 9 – ϕ KZ.

M – маркеры молекулярных масс

Таблица 4. N-концевая последовательность главного белка капсида трех видов фагов группы ϕ KZ

Бактериофаг	Концевая последовательность аминокислот
ϕ KZ	Asn-Tyr-Asn-Glu-His-Ser-Gln
PTB80	Asn-Tyr-Asn-Glu-His-Ser-Gln
Lin21	Asn-Tyr-Asn-Glu-His-Ser-Gln
NN	Asn-Tyr-Asn-Glu-His-Ser-Gln
Lin68	Asn-Tyr-Asn-Glu-His-Ser-Gln
EL	Gly-Phe-Ser-Met-Gln-Asp-Phe
Ru	Gly-Phe-Ser-Met-Gln-Asp-Phe

В таблице 4 приведено сравнение N-концевой последовательности главного белка капсида с молекулярным весом около 66 кДа у фагов трех видов. Фаги видов ϕ KZ и Lin68, несмотря на практически полное отсутствие ДНК гомологий, имеют идентичные последовательности, тогда как фаги EL

и RU имеют другую последовательность этого мажорного белка. Это подтверждает наши

данные о том, что фаги вида Lin68 сохраняют большее родство с фагами вида фKZ, чем фаги вида EL.

Исходя из всех полученных данных, можно сделать вывод, что фаги исследованной группы являются филогенетически родственными и представлены тремя видами: фKZ, Lin68 и EL нового рода фKZ семейства *Myoviridae*. фKZ-подобные фаги широко распространены в природе, доминирующим в природных популяциях является вид фKZ (11 фагов).

1.4. Предполагаемые генные продукты фKZ.

Недавно в результате совместной работы с лабораторией геной технологии Католического университета г. Левен, (Бельгия) и лабораторией Института биоорганической химии РАН был проведен анализ полной последовательности ДНК фага фKZ. Размер генома фKZ (280 334 п.н.) является наибольшим среди геномов вирусов бактерий с известной полной последовательностью ДНК. В геноме фKZ идентифицировано 306 потенциальных открытых рамок считывания. Из них только 59 кодируют продукты с известной функцией, в основном белки, связанные с метаболизмом предшественников нуклеиновых кислот. Схожая ситуация характерна и для бактериофага T4, у которого происхождение большинства фаговых генов не известно (известна функция только 69 из 280 потенциальных генных продуктов).

Геном фKZ кодирует несколько собственных тРНК, что может способствовать расширению спектра используемых хозяев. Особенностью фKZ является отсутствие продуктов генов, сходных с какой-либо из известных ДНК-полимераз, что позволяет ставить важные вопросы о возможных способах репликации данного фага. Также не было найдено предполагаемых фKZ-кодируемых белков, которые имели бы сходство с белками хозяина *P. aeruginosa*. Важной особенностью генома бактериофага фKZ является наличие генов, кодирующих белки, гомологичные генным продуктам различных эукариотических организмов и патогенных бактерий, в том числе, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus*

influenzae, *Listeria* sp., *Rickettsia prowazekii*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* и др В таблице 5 приведены предполагаемые продукты генов фага фКЗ, гомологичные белкам различных организмов.

Таблица 5. Продукты генов бактериофага фКЗ, гомологичные белкам различных организмов

Номер ОРС	а/к	Ожидаемые свойства ГП-сходства с ГП из банков данных	Степень сходства	
			Bits	Expес
004	173	Дигидрофлатредуктаза, ЕС 1.5.1.3 <i>Haemophilus influenzae</i>	261	5e-22
039	327	Белок клеточного деления <i>Thermoplasma acidophilum</i>	100	6e-4
040	160	ОРС 59 <i>Pseudomonas</i> фар D3	201	4e-16
056	334	ОРС 36.1 Бактериофар SPP1 <i>Bacillus subtilis</i>	211	7e-16
065	388	Белок ДНК репарации <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	109	5e-04
072	316	Orf36.1 Бактериофар SPP1 <i>Bacillus subtilis</i>	178	4e-12
073	300	РНК-полимераза, β-субъединица, <i>Shewanella violacea</i>	99	0.006
074	677	Бета-субъединица РНК-полимеразы, <i>Listeria murrayi</i>	118	9e-05
084	505	Гипотетический белок, <i>Rickettsia prowazekii</i>	91	0.080
104	162	Гипотетический белок Rv0060, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	241	9e-20
114	94	Гипотетический белок <i>Xylella fastidiosa</i> (strain 9a5c)	152	7e-10
131	771	Гипотетический белок yomR фара SPBc2 <i>Bacillus subtilis</i>	115	2e-04
132	109	Родственный белку фага, гомолог yqcC, <i>Bacillus subtilis</i>	89	0.018
133	462	ORF xkdV профага PBSX <i>Bacillus subtilis</i>	82	0.062
134	457	Гипотетический белок yomR, фара SPBc2 <i>Bacillus subtilis</i>	117	8e-05
144	260	<i>Caulobacter crescentus</i> ГП, родственный фаровым ферментам лизиса	226	9e-18
145	789	ГП 49 бактериофага phi-C31, <i>Streptomyces</i>	111	7e-04
146	1093	Альфа-1 тип V коллаген, <i>Rattus norvegicus</i>	118	2e-04
155	481	Рибонуклеаза H <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200	2e-14
162	522	Белок органелл <i>Plasmodium yoelli</i>	96	0.023
164	296	Гемолизин <i>Aquifex aeolicus</i>	95	0.016
165	830	Гипотетический белок F35D11.11, <i>Caenorhabditis elegans</i>	144	5.4e-18
178	1450	РНК-полимераза <i>Thermus aquaticus</i>	164	1e-8
179	356	Продукт гена e11 бактериофага bIL170 <i>Lactococcus</i>	149	1e-08
181	2237	Гипотетический белок CC2326 <i>Caulobacter crescentus</i>	257	2e-20
182	664	Гипотетический белок <i>Caulobacter crescentus</i>	272	4e-22
184	230	Гипотетический белок [CAC1899] <i>Clostridium acetobutylicum</i>	96	0.008
188	352	Тимидилат киназа (DTMP -киназа), <i>Caulobacter crescentus</i>	177	6e-12
196	120	Белок иммунитета бактериофага SPbeta <i>Bacillus subtilis</i>	92	0.011
201	648	Олигопептидаза F, <i>Borrelia burgdorferi</i>	84	0.74
203	702	Вероятная хеликаза, <i>Chlamidia trachomatis</i>	114	7.5e-07
208	366	Белок VAT-2 <i>Thermoplasma acidophilum</i>	133	5e-07
214	189	Дезоксицитидин трифосфат дезаминидаза, <i>Rickettsia prowazekii</i>	525	4.0e-51
231	155	Белок Imp1, <i>Mycoplasma hominis</i>	99	0.002
232	302	Stringent starvation белок B; <i>Escherichia coli</i>	117	5e-05
233	235	Полипептид-деформилаза, <i>Chlamidia pneumoniae</i>	88	0.023
235	488	Тимидилат синтаза (EC 2.95.81), <i>Escherichia coli</i>	301	4e-26
237	277	Консервативный гипотетический белок ycgL, <i>Bacillus subtilis</i>	477	8e-47
243	298	Гипотетический белок, <i>Melanoplussanguinipes</i> entomopoxvirus	102	0.002
245	144	Продукт ОРС arg.3, бактериофага T4 <i>Escherichia coli</i>	129	7e-07
246	218	Гипотетический белок 19.2 KD <i>Pseudomonas denitrificans</i>	139	9e-08
286	508	Гомолог белка деления клетки ftsh, <i>Bacillus subtilis</i>	157	5.4e-15
303	645	Гигантский антиген, связанный с мембраной эритроцита <i>Plasmodium falciparum</i>	128	4e-06
305	386	Бета-цепь рибонуклеозид-редуктазы, <i>Salmonella typhimurium</i>	217	2e-16
306	778	Альфа-цепь рибонуклеозид-редуктазы, <i>Vibrio cholerae</i>	934	2e-99

Отсутствие заметной гомологии фКЗ с другими бактериофагами на уровне ДНК

свидетельствует о том, что фКZ-подобные фаги представляют собой эволюционно обособленную группу в семействе *Myoviridae*. Однако некоторые фКZ-кодируемые генные продукты имеют гомологию с белками широкого спектра микроорганизмов (энтеробактерии, псевдоманады, бациллы, стрептомицеты, метанобактерии, микоплазмы и др.), а 11 из них гомологичны белкам других фагов с двунитевой ДНК, инфицирующих различных хозяев, таких как *Bacillus*, *Lactococcus* и *Streptomyces*. Эти результаты согласуются с предположением, что все хвостатые фаги с двунитевой ДНК имеют общее происхождение [Hendrix R.W. et al., 1999]. Эволюция бактериофагов может происходить за счет обмена генами или генетическими модулями внутри общей “сети”, объединяющей как близко родственные так и отдаленно родственные геномы.

1.5. Возможность использования фКZ-подобных фагов в фаготерапии.

фКZ-подобные фаги считаются перспективными с точки зрения фаготерапии и часто используются в фаготерапевтических смесях. Эти фаги легко получать в больших титрах, они устойчивы при хранении, у них необычайно широкий спектр литической активности в отношении штаммов вида *P. aeruginosa*. Однако в связи с недавно обнаруженными особенностями фКZ-подобных фагов, такими как наличие генов с неясными функциями, кодирующими потенциальные токсины или белки патогенных бактерий, способность к псевдолизогении, а также освобождение при лизисе бактерий большого количества высокополимерной ДНК, создающей значительную вязкость, возникает вопрос о предосторожностях при их использовании для фаготерапии. Таким образом, пока не исключена возможность прямого горизонтального переноса генов разных организмов в геномы фагов этой группы, их способность к генетическому обмену с различными хозяевами, терапевтическое использование живых фагов этой группы преждевременно [Крылов В.Н., 2001]. Возможные последствия их применения могут быть более вредны, чем ценность присущего этим фагам широкого спектра литической активности. Результаты,

полученные нами при изучении фКZ-подобных фагов, подтверждают необходимость классификации и детального изучения бактериофагов, используемых в фаготерапии.

ГЛАВА 2. Бактериофаг фКМV.

2.1. Биологические свойства фага фКМV.

Выделение фага и внешние признаки негативных колоний Бактериофаг фКМV был выделен нами в 1999 г. из небольшого водоема в г. Москве. Отличительным признаком фКМV является большая величина негативной колонии (до 2 см), полная прозрачность центральной части и широкий ореол (см. рис. 8).

Морфология фаговых частиц. Электронная микроскопия фага фКМV (рис. 6) показала, что фаговая частица состоит из икосаэдрического капсида диаметром около 60 нм и короткого несократимого хвоста длиной порядка 20 нм. Таким образом, по морфологическим признакам фаг фКМV относится к семейству *Podoviridae* (фаги с короткими хвостами).

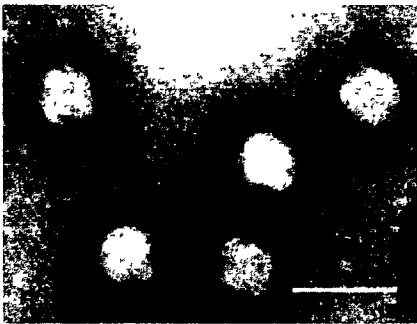


Рисунок 6. Частицы фага фКМV

Спектр литической активности.

Фаг фКМV проявлял достаточно высокую литическую активность, лизировав 10 из 30 проверенных клинических изолятов *P. aeruginosa*, полученных из бактериологической лаборатории НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского и Главного военного клинического госпиталя

им. Н.Н. Бурденко.

Рост и развитие фага. Характерным признаком фага фКМV является его очень быстрое развитие, проявляющееся в очень коротком минимальном латентном периоде (между 10 и 13 минутами). Другое важное свойство фКМV – то, что в отличие от других фагов он может продолжать расти на бактериях, утративших способность поддерживать

рост других фагов (зона лизиса, содержащая живой фаг продолжает увеличиваться на 2 – 4 сутки инкубации). Возможно, этот эффект объясняется особыми свойствами собственной РНК-полимеразы фага фКМV, схожей с РНК-полимеразой T7-подобных бактериофагов (см. далее).

2.2. Характеристика генома фКМV, полученная на основе анализа полной последовательности ДНК. В результате совместной работы с лабораторией генной технологии Католического университета г. Левен, (Бельгия) и лабораторией Института биоорганической химии РАН был проведен анализ полной последовательности ДНК фага фКМV. Геном фага фКМV представляет собой линейную двухцепочечную молекулу ДНК размером 42 519 п.н. с прямыми терминальными повторами в 414 п.н. Такой небольшой размер генома характерен для всех членов семейства *Podoviridae*, у которых к настоящему

Таблица 6. Предполагаемые генные продукты бактериофага фКМV.

№ ОРС	Старт-стоп	GC%	a/k	Предполагаемый ГП	Степень сходства	
					Bits	Expect
12	5503-6312	64,1	269	ДНК-полимераза А [T7]		0,001
16	8178-9371	61,2	397	ДНК-В подобная хеликаза (P500017)		1e-03
17	9978-10925	63,4	316	(V01146) ген 1.3, ДНК-лигаза [T7]	91	1e-17
				АТФ-зависимая ДНК-лигаза		
19	11254-13677	61,8	807	ДНК-полимераза А [T7]		6e-28
22	15091-16032	62,3	313	5'-3' экзонуклеаза [T5]		6e-03
23	16022-16462	61,0	146	Эндонуклеаза VII [T4]	43	0.001
26	18035-20486	62,7	816	РНК-полимераза [T7]	253	5e-66
30	21623-23155	62,6	510	Коннекторный белок [T7]	166	8e-40
31	23159-24127	64,8	322	Пролин-богатый участок		
32	24180-25187	62,8	335	Капсидный белок		
33	25284-25838	62,0	184	Хвостовой белок А [T3]	47	1e-04
34	25841-28321	62,0	826	Хвостовой белок В [T7]	128	2e-28
36	28866-31562	63,0	898	Лизоцим (E.C.3.2.1.17) [T4]	57	1e-06
43	38546-40351	62,6	601	ДНК-пакующий белок В [T7]	263	4e-69
44	40351-40548	62,6	66	Холин		
45	40545-41027	61,5	160	Лизоцим [ф-Еa1h]	89	2,E-17
				Фаговый лизоцим [T4]		

времени определена последовательность ДНК G+C состав генома фКМВ (62,3%) очень близок к G+C составу генома бактерии-хозяина *P. aeruginosa*. ДНК фага фКМВ не содержит последовательностей, гомологичных последовательностям ни одного из известных организмов.

Геном фага фКМВ содержит 48 предполагаемых генов. Несмотря на отсутствие гомологи на уровне ДНК 11 из 48 предполагаемых генных продуктов фКМВ (таблица 6) в том числе РНК-полимераза, белки, участвующие в репликации ДНК, некоторые структурные белки имеют сходство на аминокислотном уровне с белками Т7-подобных фагов. Удивительным является отсутствие гомологии большого капсидного белка фКМВ

Таблица 7. Устойчивость некоторых фагов *P. aeruginosa*, к известным последовательностям ДНК к рестрикционным ферментам (с сайтами узнавания ≥ 6 п.н.).

фКМВ 42,519 п.н.*			фКЗ 280,334 п.н.*	фСТХ 35,538 п.н.*	D3 56,425 п.н.*
<i>AatI</i>	<i>CviI</i>	<i>SauI</i>	<i>AatII</i>	<i>AccI</i>	<i>AccI</i>
<i>AatII</i>	<i>DraI</i>	<i>SbfI</i>	<i>CciI</i>	<i>BstI</i> 107I	<i>PacI</i>
<i>AccI</i>	<i>EclI</i> 136II	<i>SfrI</i> 274I	<i>EclI</i> 136II	<i>BstI</i> SN1	<i>PmeI</i>
<i>ApaI</i>	<i>EclI</i> XI	<i>SfrI</i> 303I	<i>EclI</i> XI	<i>EcoI</i> 105I	<i>SmaI</i>
<i>ApaI</i> L1	<i>EcoI</i> 147I	<i>SgfI</i>	<i>EcoI</i> CRI	<i>EcoI</i> T22I	<i>SpeI</i>
<i>AscI</i>	<i>EcoI</i> 24I	<i>SmaI</i>	<i>FseI</i>	<i>MphI</i> 1103I	<i>SwaI</i>
<i>AsnI</i>	<i>EcoI</i> 81I	<i>SpeI</i>	<i>NotI</i>	<i>NsiI</i>	
<i>AspI</i>	<i>EcoI</i> CRI	<i>SrfI</i>	<i>PspI</i> 124BI	<i>PacI</i>	
<i>AtsI</i>	<i>FrrOI</i>	<i>SseI</i> 8387I	<i>PspA</i> I	<i>PmeI</i>	
<i>BamHI</i>	<i>KspI</i>	<i>SseBI</i>	<i>PspA</i> LI	<i>PpuI</i> 10I	
<i>BanII</i>	<i>MspC</i> I	<i>SspI</i>	<i>PstI</i>	<i>RsrII</i>	
<i>BfrI</i>	<i>NotI</i>	<i>SstI</i>	<i>SacI</i>	<i>SmaI</i>	
<i>BglII</i>	<i>PacI</i>	<i>SwaI</i>	<i>SbfI</i>	<i>SnaBI</i>	
<i>BseI</i> 21I	<i>PmeI</i> 55I	<i>TthI</i> 111I	<i>SfiI</i>	<i>SpeI</i>	
<i>BspI</i> T1	<i>PmeI</i>	<i>VhaI</i> 646I	<i>SfrI</i> 274I	<i>SwaI</i>	
<i>BstI</i> 98I	<i>PshBI</i>	<i>VneI</i>	<i>SmaI</i>	<i>ZspI</i> 2I	
<i>BstI</i> X2I	<i>PspI</i> 124BI	<i>VspI</i>	<i>SrfI</i>		
<i>BstI</i> YI	<i>PstI</i>	<i>XhoI</i>	<i>SseI</i> 8387I		
<i>CciI</i>	<i>SacI</i>	<i>XhoII</i>	<i>SstI</i>		
<i>CfrI</i> 42I	<i>SacII</i>		<i>XhoI</i>		

* - размер генома данного бактериофага

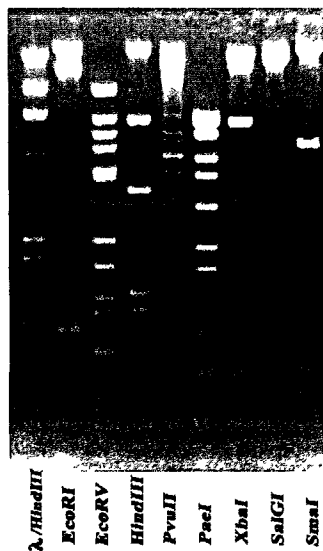


Рисунок 7. Характер рестрикции ДНК бактериофага фКМВ различными эндонуклеазами

(ГП 32) с белками известных бактериофагов. Ни один из предполагаемых генных продуктов, кодируемых фКМV, не имел сходства с белками *P. aeruginosa*, возможными прокариотическими токсинами и белками эукариот.

Гомология белков фагов фКМV и T7 свидетельствует о филогенетическом родстве T7-подобных фагов энтеробактерий и псевдомонад. Однако, полное отсутствие гомологии ДНК фКМV и T7 (также как и с другими бактериофагами) говорит о том, что это фаг эволюционно удален от других членов семейства *Podoviridae*.

Рестрикционный анализ ДНК Отличительной особенностью ДНК фага фКМV является устойчивость к большому числу рестрикционных ферментов с сайтами узнавания ≥ 6 п.н. Количество эндонуклеаз рестрикции, к которым устойчива ДНК фага фКМV, особенно, учитывая размеры генома фКМV, существенно выше, чем у других известных бактериофагов, активных на *P. aeruginosa* (таблица 7). Возможно, утрата чувствительных сайтов произошла в результате длительной эволюции и миграции этого бактериофага среди бактерий-хозяев, имеющих различные системы рестрикции.

На рис. 7 представлены результаты электрофоретического разделения ДНК фага фКМV, обработанной различными эндонуклеазами. В большинстве случаев количество сайтов, чувствительных к эндонуклеазам рестрикции, в геноме фКМV не велико (2 – 3).

2.2. фКМV-подобные бактериофаги.

Выделение новых фКМV-подобных бактериофагов Учитывая уникальные свойства фКМV, мы решили выяснить, насколько широко такие фаги распространены в природе. Основным признаком при отборе новых фагов служил вид негативной колонии (крупная, прозрачная, с характерным ореолом). В результате из природных водоемов и коммерческих фаготерапевтических препаратов различных производителей были отобраны 8 новых фКМV-подобных бактериофагов (Таблица 8).

Таблица 8. Происхождение фКМV –подобных бактериофагов

Бактериофаги	Происхождение
фКМV	водоем Москвы
PRA5, PRA6, PRA7	водоемы Москвы и Московской области
PGR	р. Дунай (Германия)
PRA1, PRA3, PRK , FMV	коммерческие препараты (Уфа, Пермь)

Фаг PRK образует еще более крупные негативные колонии, чем фКМV, а фаг FMV отличается от него по виду ореола (рис 8). Остальные фаги не отличаются по виду негативной колонии от фКМV.

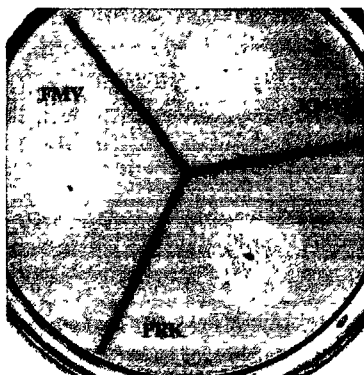


Рисунок 8. Негативные колонии фКМV-подобных фагов.

Электронная микроскопия. Электронная микроскопия новых бактериофагов показала, что все они по морфологии фоговой частицы относятся к семейству *Podoviridae*.

Спектр литической активности. Все вновь выделенные фКМV-подобные фаги сравнивали по росту на клинических изолятах бактерий, фагоустойчивых мутантах и на штаммах с плазмидами. Фаги исследованной группы

различались по росту на клинических изолятах *P. aeruginosa* и могли лизировать около 25% всех исследованных клинических штаммов. Из 10 использованных в опыте плазмид только PMG53 ограничивает рост фКМV-подобных фагов. Из 90 полученных в ходе настоящей работы и ранее мутантов *P. aeruginosa* PAO1, устойчивых к различным бактериофагам, фКМV-подобные фаги могли лизировать 40. Фагоустойчивые мутанты, полученные к любому из фКМV-подобных фагов, ограничивали рост всех фагов данной группы. Это объясняется тем, что все фаги этой группы используют сходные структуры для адсорбции на бактериальной клетке.

Рестрикционный анализ По результатам рестрикционного анализа все исследованные фКМV-подобные фаги были разделены на три группы (рис 9). Фаги первой группы – PRA5, PRA6, PRA7 и PGR - имеют идентичные с фКМV рестрикционные профили при использовании следующих эндонуклеаз. *EcoRV*, *HindIII*, *SalGI*, *SmaI*, *XbaI* Рестрикционные профили фагов второй группы – PRA1, PRA3 и PRK – идентичны. Они минимально отличаются от рестрикционных профилей фагов первой группы (при использовании эндонуклеаз *EcoRV* и *HindIII*) или не отличаются вовсе (при использовании эндонуклеаз *SalGI*, *SmaI*, и *XbaI*). Третью группу составляет единственный фаг FMV, характер рестрикции которого при использовании эндонуклеаз *EcoRV* и *HindIII* в большей степени отличается от характера рестрикции фагов первых двух групп. При обработке ДНК FMV “крупнощепящей” рестриктазой *XbaI* рестрикционные профили фагов FMV и

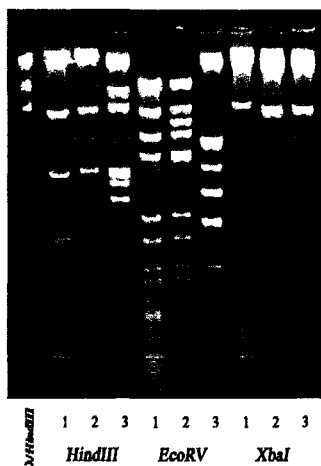


Рисунок 9. Характер рестрикции фКМV-подобных фагов различными эндонуклеазами. 1 - PRA1, 2 - фКМV, 3 - FMV.

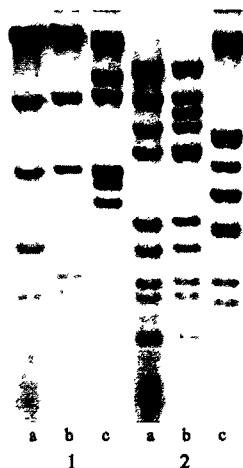


Рисунок 10. Гибридизация по Саузерну фрагментов ДНК фКМV-подобных бактериофагов после обработки эндонуклеазами 1 - *Hind III*; 2 - *EcoRV* с меченой ^{32}P ДНК фага фКМV. Бактериофаги: а - PRA1, b - фКМV, c - FMV.

φKMV оказались идентичными. Это может свидетельствовать о большой консервативности геномов φKMV-подобных фагов и исчерпании ими возможностей мутационной изменчивости. В то же время, было показано, что фаги в пределах групп, сходных по распределению сайтов рестрикции, имеют различия по спектру роста на клинических изолятах бактерий, и, следовательно, имеют определенные отличия в геномах.

Гибридизационный анализ На рис. 10 представлены результаты гибридизации ДНК фагов всех трех рестрикционных типов (фаги PRA3, φKMV и FMV) с меченой ^{32}P ДНК фага φKMV. Все рестрикционные фрагменты фагов PRA3 и FMV имеют высокий уровень гомологии с ДНК фага φKMV. Полученные данные позволяют отнести все фаги исследованной группы к одному новому виду φKMV.

Обнаружение новых φKMV-подобных фагов свидетельствует, что они достаточно широко распространены в природе. Все 8 вновь выделенных бактериофагов по совокупности свойств генома, морфологии фаговых частиц и фенотетическим признакам отнесены к виду φKMV семейства *Podoviridae*. Характерными особенностями стратегии развития: фагов данного вида являются очень быстрое развитие фага и лизис хозяйской клетки при относительно небольшом выходе зрелых фаговых частиц. Такое общее свойство геномов данной группы фагов как устойчивость ко многим эндонуклеазам рестрикции, минимальное количество сайтов узнавания и их совпадение у фагов, отобранных в разных регионах, может свидетельствовать о сходстве путей эволюции этих фагов, направленной на максимальную защиту генома от возможного разрушения при инфекции и повышение скорости развития.

2.3. Возможное практическое применение фагов вида φKMV. Способность фагов вида φKMV инфицировать многие клинические изоляты *P. aeruginosa* (обусловленная в том числе устойчивостью к подавляющим эффектам большинства известных плазмид этих бактерий), а также короткий латентный период и высокая скорость роста фагов данного вида делают их очень привлекательными для применения в фаготерапии. Действительно,

мы обнаружили, что фаги такого типа достаточно часто присутствуют в различных фаготерапевтических препаратах. Однако к фагам вида фКМV легко отбираются фагоустойчивые бактерии, поэтому эти фаги можно использовать только в смеси с фагами других видов, лизирующими такие бактерии.

Способность фагов вида фКМV продуцировать свою собственную РНК-полимеразу представляет интерес для молекулярно-биологических исследований и биотехнологии. Можно предположить, что литические ферменты этих фагов могут быть использованы в качестве антимикробных агентов в терапии бактериальных инфекций. Недавно было показано, что продукт гена 36 фага фКМV представляет собой высоко термостабильный лизоцим (сохраняющий 26% активности после 2 часов при 100° С и 21% после автоклавирования), который может представлять интерес для технологии консервирования продуктов питания [Lavigne R. et al., 2004].

ВЫВОДЫ

На основании изложенных выше результатов можно сделать следующие выводы:

1. Исследовано 15 гигантских фКZ-подобных фагов (из них 11 новых), выделенных в различных регионах; показано, что эти фаги широко распространены в природе и проявляют значительное сходство по многим признакам (широкий спектр литической активности, внешний вид негативных колоний, особенности роста и развития, морфология фаговой частицы, размер генома и др.).

2. На основании проведенных исследований: сравнения морфологии фаговых частиц, спектра литической активности, инактивации сывороткой, рестрикционного и гибридизационного анализов фаговой ДНК, анализа полипептидного состава зрелых фаговых частиц и др. проведена классификация фКZ-подобных фагов. Сделан вывод, что фаги этой группы являются филогенетически родственными и представлены тремя видами:

φKZ, Lin68 и EL нового рода φKZ семейства *Myoviridae*. Доминирующим в природных популяциях является вид φKZ. (11 фагов).

3. Отсутствие гомологии ДНК фагов вида EL с видами φKZ и Lin68 и ее крайне низкий уровень у фагов вида φKZ и Lin68 свидетельствуют о том, что дивергенция трех видов φKZ-подобных фагов произошла достаточно давно.

4. Впервые выделен T7-подобный фаг, активный на бактериях *P. aeruginosa* - фаг φKMV. Этот фаг имеет ряд уникальных свойств. очень высокую скорость роста, рост на бактериях, утративших способность поддерживать рост других фагов, что может следовать из особых свойств собственной РНК-полимеразы φKMV, имеющей гомологию с РНК-полимеразой фага T7 *E. coli*. Помимо РНК-полимеразы еще 10 из 48 предполагаемых генных продуктов фага φKMV, в том числе белки, участвующие в репликации ДНК и некоторые структурные белки имеют сходство на аминокислотном уровне с белками T7-подобных фагов энтеробактерий.

5. Исследовано 8 новых φKMV-подобных фагов, выделенных в различных регионах. Все φKMV-подобные фаги по совокупности генетических и фенотипических признаков отнесены к одному новому виду φKMV семейства *Podoviridae*.

6. Устойчивость ДНК φKMV к очень большому количеству эндонуклеаз рестрикции свидетельствует о длительной эволюции и миграции этого бактериофага среди бактерий-хозяев, имеющих различные системы рестрикции. Сравнение всех изученных φKMV-подобных фагов по характеру рестрикции показало чрезвычайную ограниченность разнообразия данного признака (всего 3 варианта рестрикционного профиля) у этой группы фагов, что доказывает исчерпанность возможности их мутационной изменчивости.

7. Особенности роста и развития φKZ-подобных фагов и фагов вида φKMV делают их перспективными для использования в фаготерапии. Они взаимодополняют друг друга в практическом отношении и могут быть использованы в оптимальных фаготерапевтических

смесях. Способность фагов изученных групп продуцировать свои собственные РНК-полимеразу или тРНК, а также различные литические ферменты делают их привлекательным объектом для молекулярной биологии и биотехнологии

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Mesyanzhinov V.V., Robben J., Grymonprez B., Kostyuchenko V.A., Bourkaltseva M.V., Sykilinda N.N., Krylov V.N., and Volckaert G. The Genome of Bacteriophage ϕ KZ of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Mol. Biol. 2002. V. 317. P. 1-19.

2. Буркальцева М.В., Крылов В.Н., Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Крылов С.В., Волкарт Г., Сыкилинда Н.Н., Курочкина Л.П., Месянжинов В.В. Феногенетическая характеристика группы гигантских ϕ KZ-подобных бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*. Генетика. 2002. Т. 38. № 11. С. 1470 – 1479.

3. V. Krylov, E. Pleteneva, M. Bourkaltseva, O. Shaburova, G. Volckaert, N. Sykilinda, L. Kurochkina and V. Mesyanzhinov. *Myoviridae* Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: a Long and Complex Evolutionary Pathway. Research in Microbiol. 2003. V. 154. P. 269 – 275.

4. R. Lavigne, M.V. Burkal'tseva, J. Robben, N.N. Sykilinda, L.P. Kurochkina, B. Grymonprez, B. Joncks, V.N. Krylov, V.V. Mesyanzhinov and G. Volckaert. The Genome of Bacteriophage ϕ KMV, a T7-like Virus Infecting *Pseudomonas aeruginosa*. Virology. 2003. V. 312. P. 49 – 59.

5. Буркальцева М.В., Кадыков В. А., Крылов В.Н. Изучение региональной специфичности геномов гигантских фагов *Pseudomonas aeruginosa*. Тезисы III Съезда ВОГиС. Москва. 6 – 12 июня 2004. С. 372.

6. Крылов В.Н., Буркальцева М.В., Сыкилинда Н.Н., Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Кадыков В. А, Миллер С., Библ М. Сравнение геномов новых гигантских фагов *Pseudomonas aeruginosa* из природных популяций разных регионов. Генетика. 2004. Т. 40. № 4. С. 462 – 468.

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 22.09.2005 г.

Формат 60х90 1/16. Усл.печ.л. 1,5. Тираж 80 экз. Заказ 564.

Тел. 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
2-й учебный корпус, 627 к.

№ 19810

РНБ Русский фонд

2006-4
16362