ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

სადოქტორო პროგრამა ბიოლოგია - მიკრობიოლოგიის მოდული

IV სემესტრის დოქტორანტი

ელენე კაკაბაძე

დოქტორანტის სემინარი თემაზე

ძაფისებრი ბაქტერიოფაგების დახასიათება და მათი ბიოტექნოლოგიური მნიშვნელობა

ხელმძღვანელი: ნინო ჭანიშვილი

თბილისი, 2015 წელი

ანოტაცია

ბაქტერიოფაგები პროკარიოტულ უჯრედებთან კოევოლუციის პირობებში ვითარედებოდნენ და დღეს გარემოში ბაქტერიების და არქეების პოპულაციის ბალანსირების უმნიშვნელოვანეს აგენტებად გვევლინებიან. ამასთან ბაქტეიოფაგები მრავალ ბიოტექნოლოგიურ აპლიკაციაში გამოიყენება.

ძაფისებრი ბაქტერიოფაგი 6-10ნმ სისქის და ≈900 ნმ სიგრძის ფილამენტური ნაწილაკია, რომელიც შეიცავს წრიულ ერთჯაჭვიან დნმ-ს. კონკრეტული ნაწილაკის ზუსტი სიგრძე განისაზღვრება მისი დნმ-ის სიგრძით. ძაფისებრი ფაგები გრამ-უარყოფით ბაქტერიებს ასნებოვნებენ სპეციფიური ადსორბციის - უჯრედის წვერზე არსებულ F-პილთან შეკავშირებით. F-პილის, ანუ სქესობრივი პილის ფუნქცია ერთი ბაქტერიიდან მეორეში F პლაზმიდური დნმ-ის, ან ინტეგრირებული პლაზმიდური დნმ-ის შემცელი ქრომოსომული დნმ-ის გადატანაა (კონიუგაცია). როგორც ყველა ვირუსი, ძაფისებრი ფაგები მასპინძელი უჯრედის გარეთ მეტაბოლურად ინერტულია, აქტიურდება და მრავლდება მხოლოდ შესაბამისი მასპინძელი უჯრედის ინფიცირების შემდეგ. სასიცოცხლო ციკლის მიხედვით ძაფისებრი ფაგები ორ ტიპად იყოფა: ეპისომალური რეპლიკაციის წარმართველი ე.წ. „ლითიური“ ფორმა და ზომიერი ფაგი - რომელიც ინტეგრირდება ქრომოსომაში. ეპისომალური ინფექციის შემთხვევაში ახლადწამოქმნილი ფაგური ელემენტები ინფიცირებულ უჯრედს ტოვებენ ფაგის მიერ კოდირებული პროტეინებით ფორმირებული ციტოპლაზმა - გარე - მემბანული კომპლექსური არხის მეშვეობით. კუდიანი ფაგებისგან განსხვავებით ძაფისებრი ფაგი გამრავლებისას მასპინძელ უჯრედს არ კლავს. ეპისომალურად გამრავლებადი ფაგი შთამომავლობას დიდი რაოდენობით (10^{13}კწე/მლ) წამოქმნის. M13, F1 და Fd - დაწვრილებით შესწავლილი ძაფისებრი კოლიფაგებია, აღნიშნული ვირიონები გამოიყენება კლონირების, ანტიგენების გამოვლენის, მცირე მოლეკულური მწკრივების და სტუქტურული კლევებისთვის. დადგენილია, რომ ზომიერი ფილამენტური ფაგები დიდ როლს თამაშობენ მასპინძლეი ორგანიზმის პათოგენეზში.

ძაფისებრი ბაქტერიოფაგები ფაგ-გამოვლენის ტექნოლოგიის (Phage display) ძირითადი კომპონენტია. ამ მეთოდოლოგიის გამოყენებით ვირუსული ნაწილკის ზედაპირზე შესაძლებელია სასურველი პეპტიდური მიმდევრობის გამოვლენა და მიზნისმიერი აპლიკაცია. ასევე ძაფისებრი ფაგები გამოიყენება ნანოტექნოლოგიის ისეთ მიმართულებებში, როგორიცაა ბიოსენსორები, ნანოელექტრონიკა, თხევად-კრისტალური ნანოსტრუქტურები, ნანოლელმენტები და სხვა.

Abstract

Procariotic cell infecting virusies are designated as Bacteriophages. This type of viral particles are the most abundant near-life form on earth. Prokaryotic cells evolved in co-evolution with phages, therefore phages are strongly involved in Bacterial and Archaea population regulation and in some cases in bacterial strain pathogenesis. Due to their specific features, phages are widely used in Biotechnology.

Filamentous bacteriophage are 6-10 nm wide and ≈900 nm length filamentous particles with ssDNA insert. Particular size of phage particle is defined by phage genome size. They infect gram-negative bacteria by specific adsorption to bacterial F-pili. In bacterial reproduction F-pili or sex pilus transfers plasmid DNA, or chromosome integrated plasmid DNA to recipient cell (Conjugation).

Like all viruses, filamentous phages are inert outside the living organism. Activation and reproduction starts after host cell infection. In Case of filamentous phages, two distinguished life cycle is recognized: episomal replication mode and temperate phage type behavior-integration in host chromosome. In case of episomal infection, phage progeny leaves host cell using phage encoded protein channel. In contrast to tailed phages filamentous phage replication and progeny relies do not involve host cell burst or lysis, but remains fully viable. Due to this feature high yield of phage progeny can be harvested in short time (10^{13} pfu/ml).

M13, F1 and Fd – are well characterized *E.coli* infective phages which are widly used in cloning, antibody display technology, short molecular chein and ctructural studeys.

Filamentous phages are main object for phage display technology. Meaning specific target peptide display on gene-modified phages for further biotechnological and biomedical application. Also filamentous phages are used in wide range of Nanotechnological applications, such as Biosensors, Nanoelectronics, Organic-inorganic liquid crystal nanostructures, nanowires and nanorings, Inorganic nanostructures and lithium-ion nanobatteries.

შინაარსი

ანოტაცია 2

Abstract 3

ძაფისებრი ბაქტერიოფაგების დახასიათება და მათი იოტექნოლოგიური მნიშვნელობა 5

შესავალი 5

ფილამენტური ანუ ძაფისებრი ბაქტერიოფაგები 8

1. ზოგადი დახასიათება 8
2. კაფსიდის ცილები 12
3. გენომი 14

ფაგ-გამოვლენის (Phage display) ტექნოლოგია 15

ნანოტექნოლოგიური აპლიკაცია 18

1. ბიოსენსორები და ნანოელექტრონიკა 18
2. ორგანულ -არაორგანული თხევად კრისტალური ნანოსტრუქტურები 18
3. Li-იონური ელემენტი 19

დასკვნითი ნაწილი 19

გამოყენებული ლიტერატურა 20

ძაფისებრი ბაქტერიოფაგების დახასიათება და მათი იოტექნოლოგიური მნიშვნელობა

შესავალი

პროკარიოტული უჯრედების ვირუსებს ბაქტერიოფაგები ეწოდება. ისინი დედამიწაზე ყველაზე ფართოდ გავრცელებული ვირუსული ნაწილაკებია. ოკეანის წყლის 5 მკლ-ში მათი ტიტრი საშვალოდ 10^8 აღეწევს [7]. ფაგები პროკარიოტულ უჯრედებთან კოევოლუციის პირობებში ვითარედებოდნენ და დღეს გარემოში ბაქტერიების და არქეების პოპულაციის ბალანსირების უმნიშვნელოვანეს აგენტებად გვევლინებიან. ბაქტერიოფაგები ასნებოვნებენ 140-ზე მეტი გვარის ბაქტერიას, მათ შორის გრამ-დადებით და უარყოფით აერობულ და ანაერობულ, ენდო და ეგზო-სპორების წამომქმნელ სახეობებს, ციანობაქტერიებს, სპიროქეტებს, მიკოპლაზმას, ქლამიდიებს, ექსტრემალურ ჰალოფილებს და მეთანოგენებს. ასევე ჰიპერთერმოფილურ არქეებს რომლებიც 100ºC-ზე იზრდება.

სტრუქტურული პოლიმორფიზმი, გენეტიკური მრავალფეროვნება, რეკომბინაციების და სხვადასხვაგვარი ალტერაციების სიხშირე ვირუსებს შორის ევოლუციური კავშირის დადგენას და მათ კლასიფიკაციას (ფილოგენეტიკური ტაქსონომია) ფაქტიურად შეუძლებელ ხდის. ვირუსების კლასიფიკაციის საერთაშორისო კომიტეტის ტაქსონომიის მიხედვით (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) ეუკარიოტული უჯრედების ვირუსები იყოფა სამ ძირითად რიგად: Caudovirales-რომელიც აერთიანებს სამ ოჯახს, Ligamenvirales-აერთიანებს ორ ოჯახს, და 13 ოჯახი რომელიც არ ერთიანდება ცალკეულ რიგებში [10].

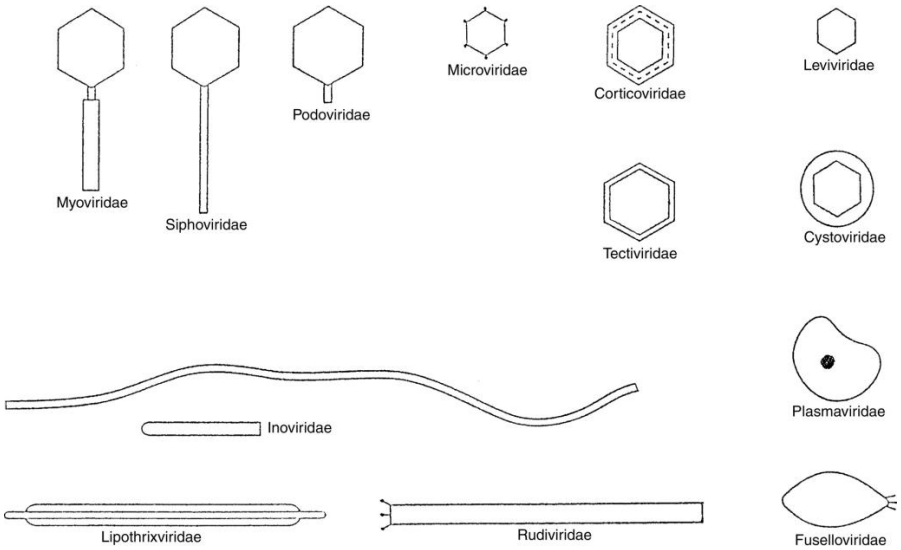
ფაგი შედგება ცილოვან გარსში მოქცეული ნუკლეინის მჟავისგან რომელსც ფაგის გენომი ეწოდება და აკოდირებს ყველა იმ გენს რომელიც აუცილებელია ფაგების რეპროდუქციისთვის. ბაქტერიოფაგები საკმაოდ მრავალფეროვანი ჯგუფია, მათი გენომი შეიძლება შედგებოდეს ორმაგჯაჭვიანი ან ერთჯაჭვიანი დნმ-ის ან რნმ-ისგან. გენომი შეიძლება იყოს ხაზოვანი ან წრიული. დამცავი შეფუთვა ანუ კაფსიდი რომელიც გარს აკრავს ფაგის გენომს შედგება ფაგის მიერ კოდირებული ცილებისგან [9].

რიგი	ოჯახი	მორფოლოგია	ნუკლეინის მჟავა
Caudovirales	Myoviridae	გარსის* გარეშე, კუმშვადი კუდით	დნმ ორძაფიანი, ხაზოვანი
	Siphoviridae	გარსის გარეშე, გრძელი არაკუმშვადი კუდით	დნმ ორძაფიანი, ხაზოვანი
	Podoviridae	გარსის გარეშე, მოკლე არაკუმშვადი კუდით	დნმ ორძაფიანი, ხაზოვანი
Ligamenvirales	Lipothrixviridae	გარსით, ჩხირის ფორმის	
	Rudiviridae	გარსის გარეშე, ჩხირის ფორმის	დნმ ორძაფიანი, ხაზოვანი
სხვა	Ampullaviridae	გარსით, ბოთლისებრი ფორმით	დნმ ორძაფიანი, ხაზოვანი
	Bicaudaviridae	გარსის გარეშე, ლიმნისებრი ფორმით	დნმ ორძაფიანი, წრიული
	Clavaviridae	გარსის გარეშე, ჩხირის ფორმის	დნმ ორძაფიანი, წრიული
	Corticoviridae	გარსის გარეშე, იზომეტრული	დნმ ორძაფიანი, წრიული
	Cystoviridae	გარსის გარეშე, სფერული	დნმ ორძაფიანი, სეგმენირებული
	Fuselloviridae	გარსის გარეშე, ლიმნისებრი ფორმით	დნმ ორძაფიანი, წრიული
	Globuloviridae	გარსით, იზომეტრული	დნმ ორძაფიანი, ხაზოვანი
	Guttaviridae	გარსის გარეშე, ოვალური	
	Inoviridae	გარსის გარეშე, ძაფისებრი	დნმ ერთძაფიანი, წრიული
	Leviviridae	გარსის გარეშე, იზომეტრული	რნმ ერთძაფიანი, ხაზოვანი
	Microviridae	გარსის გარეშე, იზომეტრული	დნმ ერთძაფიანი, წრიული
	Plasmaviridae	გარსით, პლეომორფული	დნმ ორძაფიანი, წრიული
	Tectiviridae	გარსის გარეშე, იზომეტრული	დნმ ორძაფიანი, ხაზოვანი

ცხრილი 1 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია ვირუსების კლასიფიკაციის საერთაშორისო კომიტეტის ტაქსონომიის მიხედვით [10]
*იგულისხმება სუპერკაფსიდი

დღემდე ლიტერატურაში აღწერილი ფაგების 95%-ზე მეტი მიეკუთვნებ Caudovirales-ს რიგს (კუდიანი ფაგები). ამ რიგის ფაგების მასის ნახევარი ორმაგჯაჭვიან დნმ-ზე მოდის, ხოლო დანარჩენს ცილები წარმოადგენენ. იკოსაედრალური თავი შედგება ერთი ან რამოდენიმე ტიპის სპეციფიური პროტეინიდან. კაფსიდის კუთხეები როგორც წესი შედგება პროტეინის პენტამერებისგან, ხოლო დარჩენილი ნაწილი იმავე ან მსგავსი პროტეინის ჰექსამერებისგან. დღეისთვის კუდის მორფოლოგიის მიხედვით განსაზღვრულია კუდიანი ფაგების სამი ძირითადი ოჯახი: აღწერილი ფაგების 60%-ს Siphoviridae-ს ოჯახის, გრძელი მოქნილი კუდის მქონე ფაგები წამოადგენე, 25% - Myoviridae- კუმშვადი კუდიებით და 15% არის მოკლე არაელასტიური კუდის მქონე Podoviridae- ოჯახი, ამ უკანასკნელებს ზოგ

შემთხვევაში გაანჩიათ სპეციალური ინფექციური პროტეინები, რომლებიც მოთავსებულია ფაგის თავში და საშვალება აქვს გარდაიქმნას კუდის გაფართოოებად მასპინძელთან კონტაკტის დროს, რაც ნაჩვენებია T7 კოლიფაგის მაგალითზე. Caudovirales-ს რიგის ფაგებში კომპლემენტარული ბაქტერიული უჯრედის ამოსაცნობი და შემაკავშირებელი მექანიზმები სწორედ ფაგის კუდზეა მოთავსებული. [6]



სურათი 1 პროკატიოტული უჯრედების ვირუსების ზოგიერთი მორფოტიპი

ასევე ფაგების კლასიფიკაცია შესაძლებელია სიცოცხლის ციკლის მიხედვით, როგორც: ვირულენტური და ზომიერი ფაგები. ვირულენტურ ფაგებს გამრავლება მხოლოდ ლითიური ციკლის წარმართვისას შეუძლიათ. ფაგის ვირიონი ადსორბირდება მასპინძელი ბაქტერიის უჯრდის კედელზე და უჯრედში შეყავს თავის გენომი, ინაკულირებული დნმ-ი (ან რნმ-ი) იწყებს მასპინძლის მეტაბოლიზმის კონტროლს და აყალიბებს მოლეკულურ მექანიზმებს ახალი ფაგური ნაწილაკების საწარმოებლად. უმეტეს შემთხვევაში ინფიცირებული ბაქტერია იშლება (წუთების ან საათების შმედეგ) და ანთავისუფლებს მრავალ ახალ ფაგურ ნაწილაკს. ზომიერი ფაგებს ბაქტერიის ინფიცირების შემდეგთ აქვთ რეპოდუქციულ ციკლებს შორის არჩევანის საშვალება. შესაძლებელია ზომიერმა ფაგმა გააქტიუროს ლითიურ ციკლი და გამოიწვიოს მასპინძელი უჯრედის ლიზისი, ან გააქტიუროს ალტერნატიული-ლიზოგენური ციკლი. ლიზოგენური ციკლის პირობებში რეპლიკაციის ნაცვლად ფაგის გენომი გადადის მოსვენებულ ფაზაში, რომელსაც ეწოდება პროფაგი. პროფაგი ჩაეშენაბა მასპინძელი ბაქტერიის გენომში ან არსებობს როგორც პლაზმიდა, ის ამ დგომარეობაში იმყოფება განუსაზღვრელი დროის მანძილზე და რეპლიცირდება მასპინძელ უჯრედთან ერთად.

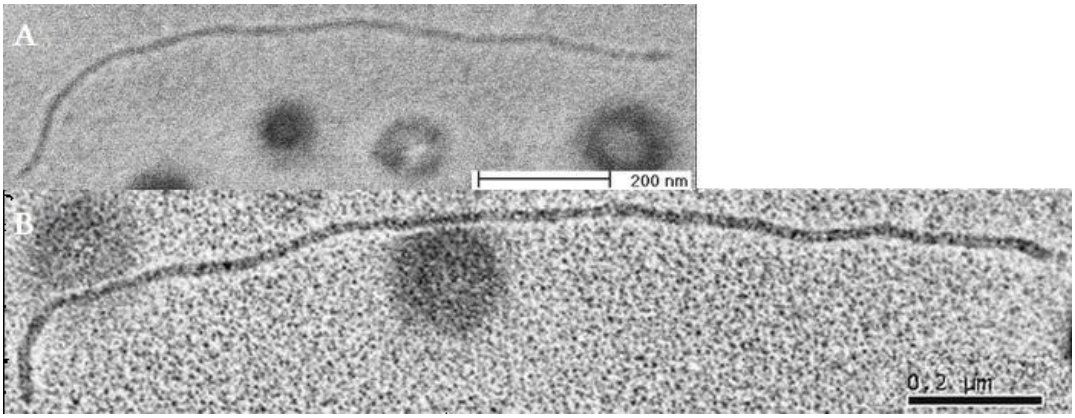
პროფაგის მატარებელ ბაქტერიულ უჯრედს ლიზოგენურები ეწოდება. (პროფაგებს ნებისმიერ დროს შეუძლიათ ლითიურ ფაზაში გადასვლა). [7][8]

ფილამენტური ანუ ძაფისებრი ბაქტერიოფაგები

1. ზოგადი დახასიათება

ფილამენტური ანუ ძაფისებრი ბაქტერიოფაგები მიეკუთვნება Inoviridae-ს ოჯახის *Inovirus*-ს გვარს. ხასიათდებიან ჩხირისებრი მორგოლოგიით, არ აქვთ სუპერკაფსიდი, დნმ-ერთჯაჭვიანია, ასნებოვნებენ გრამ-უარყოფით ბაქტერიებს [1].

ძაფისებრი ბაქტერიოფაგი არის 6-10ნმ სისქის და ≈900 ნმ სიგრძის ფილამენტური ნაწილაკი (სურათი 2), რომელიც შეიცავს წრიულ ერთჯაჭვიან დნმ-ს. კონკრეტული ნაწილაკის ზუსტი სიგრძე განისაზღვრება მისი დნმ-ის სიგრძით. ძაფისებრი ფაგები გრამ-უარყოფით ბაქტერიებს ასნებოვნებენ სპეციფიური ადსორბციის საშუალებით, უჯრედის წვერზე არსებულ F-პილთან შეკავშირებით. F-პილის, ანუ სქესობრივი პილის ფუნქცია ერთი ბაქტერიიდან მეორეში F პლაზმიდური დნმ-ის, ან ინტეგრირებული პლაზმიდური დნმ-ის შემცელი ქრომოსომული დნმ-ის გადატანაა (კონიუგაცია)[5].



სურათი 2 A-ფაგი M13 მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპია (SEM)
B- ფაგი M13 ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპია (TEM)[14]

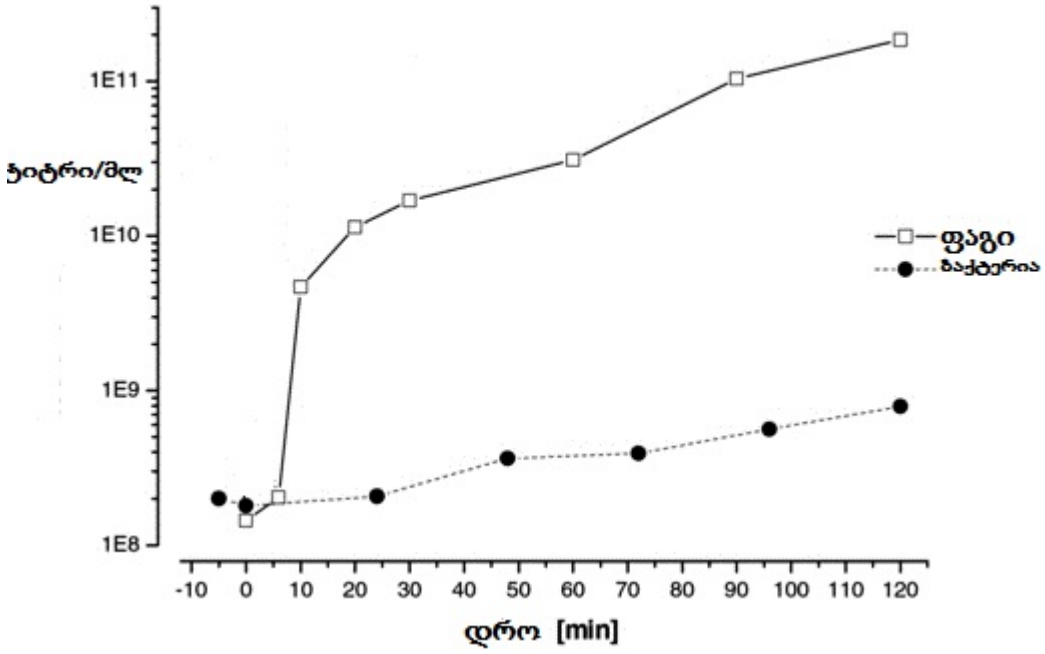
ახალი ვირუსული ნაწილაკები გამოიყოფა ინფიცირებიდან დაახლოებით 15 წუთში, გამოყოფის სიხშირე ექსპონენციალურად იზრდება პირველი 60 წუთის განმავლობაში, შემდეგ ბქტერიულ შტამთან ერთად გადადის სტაციონალურ ფაზაში. 9 ფაგით 1 ბაქტერიული უჯრედის ინფიცირებისას პირველი საათის განმავლობაში დაახლოებით 1000 ახალ ფაგური ნაწილაკი წარმოიქმნება. მიუხედავად იმისა რომ თეურიულად შესაძლებელია

ბაქტერიულმა უჯრედმა შეუფერხებლად განაგრძოს ზრდა და გამრავლება, ფაგით ინფიცირების პროცესი საგრძნობლად ანელებს კულტურის ზრდის სიჩქარეს.

როგორც ყველა ვირუსი, ძაფისებრი ფაგები მასპინძელი უჯრედის გარეთ მეტაბოლურად ინერტულია, აქტიურდება და მრავლდება მხოლოდ შესაბამისი მასპინძელი უჯრედის ინფიცირების შემდეგ. Caudovirales-ს რიგის ფაგებისგან გასხვავებით ძაფისებრი ბაქტერიოფაგები მრავლდება არა მასპინძელი უჯრედის ციტოპლაზმაში, არამედ უჯრედის კედელთან და სეკრეტორული მექანიზმის საშვალებით კოორდინირებულად გამოიყოფა უვნებელი ცოცხალი მასპინძელი უჯრედიდან [2].

სასიცოცხლო ციკლის მიხედვით ძაფისებრი ფაგები ორ ტიპად იყოფა: ეპისომალური რეპლიკაციის წარმართველი ე.წ. „ლითიური“ ფორმა და ზომიერი ფაგი - რომელიც ინტეგრირდება ქრომოსომაში. ეპისომალურად გამრავლებადი ფაგი შტამომავლობას დიდი რაოდენობით (10^{13}კწე/მლ) წამოქმნის. ამის საპირისპიროდ ქრომოსოაში ინდეგრირებადი ფაგის გამრავლება ძალიან ნელა წარიმართება, ინდუცირების შემთხვევაში 10-100 უჯრედზე გენერირდება მხოლოდ 1 ფაგური ნაწილაკი. ეპისომალური ფაგის რეპლიკაცია და გენების ექსპრესია, უჯრედის ინფივირების შემდეგ, შეუფერხებლად მიმდინარეობს. მისი გენომი არ აკოდირებს რეგულატორულ პროტეინებს. ქრომოსომულად ინტეგრირებულ ფაგებში გენების ექსპრესია და რეპლიკაცია მკაცრად კონტროლირდება. ეს ფაგის მიერ კოდირებული ტრანსკრიფციის რეგულატორები მეშვეობით ხდება, რომელთა ფუნქციაა სტრანსკრიფციის დათრგუნვაა.

ეპისომალური ინფექციის შემთხვევაში ახლადწამოქმნილი ფაგური ელემენტები ინფიცირებულ უჯრედს ტოვებენ ფაგის მიერ კოდირებული პროტეინებით ფორმირებული ციტოპლაზმა - გარე - მემბანული კომპლექსური არხის მეშვეობით. სხვა ფაგებისგან განსხვავებით ძაფისებრი ფაგი გამრავლებისას მასპინძელ უჯრედს არ კლავს. ახალი ვირიონების წამოქმნა უწყვეტად მიმდინარეობს. სწორედ ასეთი არა-ლითიური გამრავლების მოდელის წყალობით ძაფისებრი ფაგის მაღალი ტიტრის კულტურის მიღება მარტივადაა შესაძლებელი. Ff ფაგების ზრდის მრუდი ნათლად უჩვენებს ვირუსების ნაწილაკების რაოდენობის მყისიერ ზრდას მოკლე ლატენტური პერიოდის შემდეგ (სურათი 3)[13].



სურათი 3 F1 ფაგის ზრდის მრუდი [13]

დღეისთვის ბიოფიზიკური და მოლეკულური მეთოდების გამოყენებით დაწვრილებითაა შესწავლილი I და II კლასის ძაფისებრი ფაგები:

- M13 (F-სპეციფიური(Ff)) – მასპინძელი *E.coli* (I კლასი)
- F1 (F-სპეციფიური(Ff)) - მასპინძელი *E.coli* (I კლასი)
- Fd (F-სპეციფიური (Ff)) - მასპინძელი *E.coli* (I კლასი)
- Pf4 - მასპინძელი *Pseudomonas aeruginosa* (II კლასი)

M13, F1და Fd საკმაოდ მსგავსი ვირუსებია, მათი გენომი 98.5%-ით ჰომოლოგიურია.

აღნიშნული ვირიონები გამოიყენება კლონირების, ანტიგენების გამოვლენის, მცირე მოლეკულური მწკრივების და სტუქტურული კლევებისთვის [4].

დადგენილ იქნა, რომ ზომიერი ფილამენტური ფაგების პირდაპირ ან არაპირდაპირ კავშირშია ისეთი გვარის ბაქტერიების პათოგენეზში როგორიცაა : *Vibrio cholerae, Neisseria meningitidis* და *Pseudomonas aeruginosa* [6]. ასევე აღსანიშნავია რომ ზოგიერთი ფაგური ნაწილაკი მონაწიელობას იღებს მასპინძელი ბაქტერიის „სოციალურ“ ქცევაში, ანუ ბიოფილმის დინამიკაში Pf4 -ით ინფიცირებული *Pseudomonas aeruginosa*-ს შემთხვევაში. ნაჩვენები იქნა, რომ ძაფისებრ ფაგი წამყვან როლს თამაშობს *Pseudomonas aeruginosa*-ს

სასიცოცხლო ციკლსა და ადაპტაციურ ქცევაში, რითითაც აიხსნება ფაგების სიჭარბე და გავრცელება ამ ორგანიზმებს შორის [15].

ზოგიერთი ფილამენტური ფაგი აძლიერებს მასპინძელი უჯრედის ვირულენტურობას, ყველაზე მნიშვნელოვანი მაგალითი *Vibrio cholera* ფაგი CTXφ-ია, რომელიც აკოდირებს ქოლერას ტოქსინს [22].

ძაფისებრი ბაქტერიოფაგები ფართოდ არის გავრცელებული გრამ-ნეგატიურ ბაქტერიების ისეთ გვარებში, როგორიცაა *Escherichia, Salmonella, Pseudomonas, Xanthomonas, Vibrio, Thermus* და *Neisseria*. დღეისთვის 60-ზე მეტი ძაფისებრი ფაგია ახწერილი, მათ შორის გრამ-დადებითი ბაქტერიების მიმართ აქტიური ფაგები აღწერილია მხოლოდ *Clostridium acetobutylicum* NCIB 6444 ფაგი CAK1 და *Propionibacterium freudenreichii* თვის ფაგი B5. ჰიბრიდიზაციის მონახემებმა აჩვენა, რომ CAK1 ერთჭვიანი დნმ M13 ჰომოლოგიურია [17]. ასევე ნაჩვენები იქნა რომ B5 სავარაუდო კაფსიდის პროტეინი ჰომოლოგიურია *Thermus thermophilus* ის ფაგის PH75 და *Pseudomonas aeruginosa* ფაგის Pf3 კაფსიდის პროტეინებისა, შესაბამისად ევოლუციურად ენათესავება გრამ-უარყოფითი ბაქტერიოების ძაფისებრ ფაგებს [16].

ძაფისებრი ფაგების უმეტესობა ფინჯანზე ვერ წამოქმნის უარყოფით კოლონებს. ძაფისებრი კოლიფაგები (F1, Fd, M13) დღეისთვის ცნობილ ფილამენტურ ფაგებს შორის ყველაზე პროდუქტიულებია, მათი ტიტრი 10^{13} კწე/მლ ახწევს. ასეთი მაღალი პროდუქტიულიბა ანელებს მასპინძელი ბაქტერიის გამრავლებას და ფინჯანზე წამოიქმნება დაბურული უარყოფითი კოლონიები. ეს სამი ფაგი გამოიყენება მემბრანული ტრანსაქციების შესასწავლ მოდელურ ორგანიზმებად და კომბინატორულ ტექნოლოგიებში, მაგალითად თერაპევტულ რეკომბინანტულ ანტისხეულების და ლითიუმის იონების ნანო-ელემენტების შესაქმნელად [18].

ძაფისებრი ბაქტერიოფაგის გამოყოფის პროტოკოლი

ძაფისებრი ბაქტერიოფაგის გამოყოფის მეთოდოლოგია სტანდარტული პროტოკოლის მსგავსია, თუმცა ფაგის ტიტრის დადგენა ადამსის ორმაგი შრის მეთოდით უარყოფითი კოლობიების სუსტი გამოხატუვის გამო ნაკლებად გამოიყენება.[19]

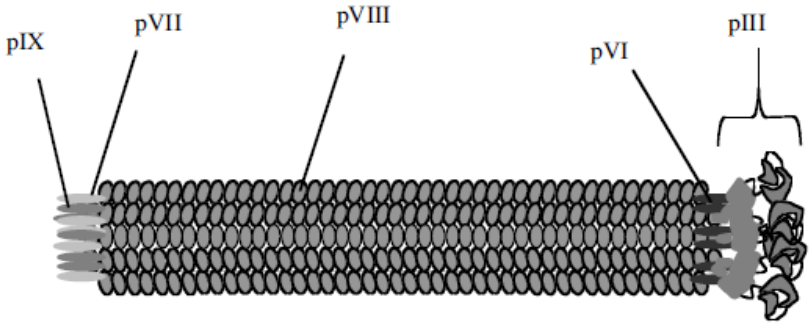
სავარაუდო ზომიერი ფაგის შემცველი მასპინძელი ბაქტერია კულტივირდება 200 მლ შესაბამის თხვეად საკვებ არეში 18 სთ-ის განმავლობაში ოპტიმალურ ტემპერატურულ რეჟიმსა და აერაციის პირობებში. ცენტრიფუგირების შემდეგ სუპერნატატნი იფილტრება 0.2მკმ ფორის ზომის ფილტრით. გაფილტრული სუპერნატანტის დაახლოებით 20მკმ

გადაიტანება მყარ საკვებ არეზე სტერილურობაზე შესამოწმებლად. სუპერნატანტში არსებული სავარაუდო ფაგები ილექება NaCl და პოლიეთილენ გლიკოლის დამატებით, საბოლოო კონცეტრაცია 3 და 5% წონა/მოცილობა. ნაზავი 2 საათის განმავლობაში ყოვნდება ყინულზე და ცენტრიფუგირდება 20 წუთის განმავლობაში 12000g ზე. ფაგის შემცველი ნალექი რესუსპენდირდება 1მლ SM ბუფერში.

გასუფთავებული ფაგის ვიზუალიზაცია ტრანსმისიური ელექტორნული მიკროსკოპიის გამოყენებით ხორციელდება, ჩვეულებრივ შემდგომ პჯრ და სხვა გენეტიკური მეთოდებს მიმართავენ [20].

2. კაფსიდის ცილები

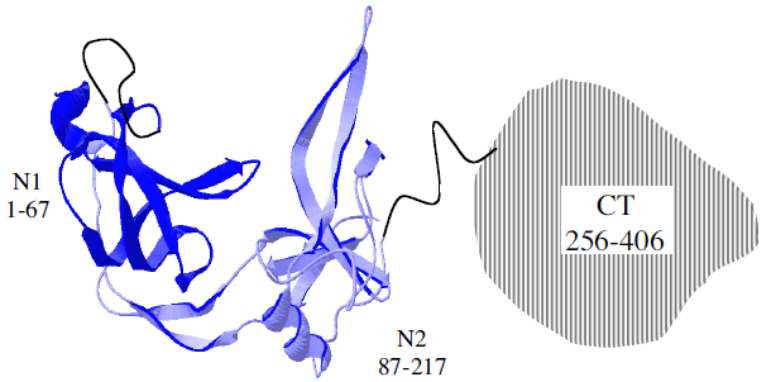
Ff ვირუსების კაფსიდის პროტეინების უმეტეს ნაწილს აკოდირებს გენი VIII. დაახლოებით pVIII გენის 2700 ასლი მას კაფსიდის მთავარ პროტეინად ქმნის. ფილამენტური სხეული ფორმირდება ათასობით სპირალურად დალაგებული pVIII პროტეინის ასლებისგან. pVIII მცირე ზომის ცილა რომელიც შედგება მცოლოდ 50 ამინო მჟავოსგან. მეორეული კაფსიდის პროტეინები წარმოდგენილია მხოლოდ რმდენიმე ასლით და ვირუსული უჯრედის კიდეებზეა განაწილებული. დისტალური კიდე, რომელიც აიგება პირველი შეიცავს pVII და pIX ცილებს, ხოლო პროქსიმალური კიდე, რომელიც შედის მასპინზელ უჯედში შეიცავს pVI და pIII პროტეინებს (სურათი 4)[3].



სურათი 4 Ff ძაფისებური ფაგის კაფსიდის პროტეინები

Ff ფაგების ერთჯჭვინი დნმ ჯამში სამი კლასის პროტეინებს აკოდირებს : რეპლიკაციის (pII, pX და pV), მორფოგენეტიკური (pI, pIV და pXI) და სტრუქტურული (pVIII, pIII, pVI, pVII და pIX) ცილები.

იმის გათვალისწინებით რომ ვირიონების ზომა დამოკიდებულია ფაგის დნმ-ის ზომასა და კომფორმაციაზე, დნმ-ის შეყვანა ან ამოჭრა ვირიონის ზომის კონტროლის მარტივი მეთოდია. ბუნებრივი ტიპის Ff ფაგის ზომა ~900 ნანომეტრია, გენური ალტერაციების საშუალებით ფაგის ზომის ზღვრული შემცირება ხმოლოდ 50ნმ-ა შესაძლებელი. შეფუთული დნმ-ის სიგრძის გარდა კაბსიდის ზომას ასევე ინიციაციის ან ტერმინაციის ელონგაციის შეფარდებითი ეფექტურიობა განსაზღვრავს. Ff მუტანტებში, სადაც ინჰიბირებულია pVII/pIX პროტეინები ან ტერმინირებულია pIII/ pVI ასამბლეა, წარმოიქმნება ექსტრემალურად გრძელი ვირიონები რომელბიც შეიცავს თანმიმდევრულად შეფუთულ დნმ-ს (20 რიგით აღმატებული)[3].

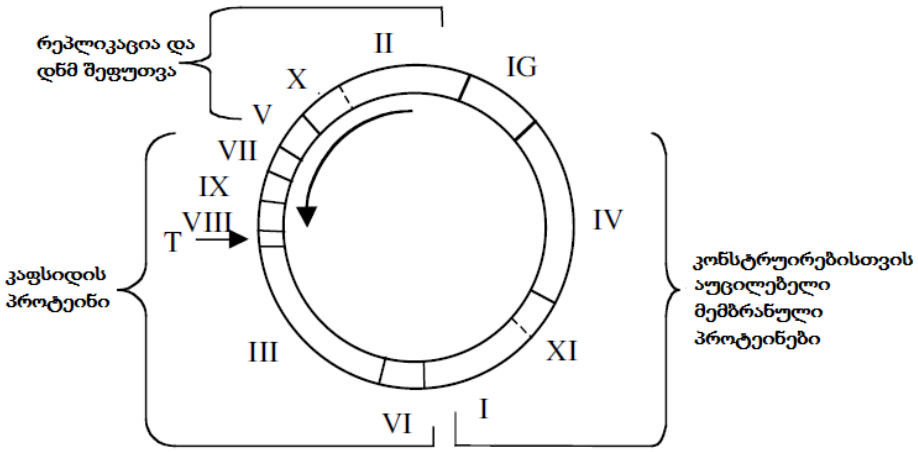


სურათი 5 Ff ფაგის ადსორბციის პროტეინის pIII დომენის სტრუქტურა.

Ff ფაგის ადსორბციის პროტეინის pIII დომენის სტრუქტურა. (სურთი 5)-ზე ცალკეული დომენის წარმომქმნელი თითოეული ამინომჟავა აღნიშნულია თანმიმდევრობის რიცხვით. N1 (ლურჯი) და N2 (ცისფერი) დომენები ჩართულია შიდა-დომენურ კონტაქტში, N1 დომენი არეგულირებს მასპინძელი ბაქტერიის კო-რეცეპტორულ პროტეინთან - TolA -თან ბმის პროცესს. N2 ბმას წარმოქმნის F-პილთან (ნაშთის მეშვეობით რომელიც მდებარეობს N2 გარე რგოლზე და არა N1 და N2 ცენტრალურ ღრუში). CT (ნაცრისფერი) მონაწილეობს ვირიონების აწყობაში, თუმცა მისი ტოპოლოგია ნაკლებადაა შესწავლილი. მოძრავი შემაკავშირებელი რეგიონი (შავი ხაზი) შეიცავს განმეორებად ტანდემურ თანმიმდევრობებს GGGS და EGGGS.

3. გენომი

Ff ფაგის ერთჯაჭვიანი წრიული დნმ-ი შდგება 6407 ნუკლეოტიდისგან, რომლებიც აკოდირებს 11 ცილას და 9 ღია წაკითხვის ჩარჩოს. ახალი ვირიონის აწყობა იწყება შეფუთვის სიგნალზე pIX და pVII ცილების მიბმით. pV რომელიც ფაგის დნმ-ს ციტოზოლში მოქნილ ჯაჭვად გარდაქმნის, ჩაინაცვლება მთავარი კაფსიდური პროტეინით - pVIII და ნაწილაკები გამოდის გარე მემბრანიდან. როგორც კი სხეულის განაპირა ნაწილები შეიფუთება pVIII, pIII და pVI ცილებით ნაწილაკი გადის უჯრედიდან. ეს პროცესი შეიძლება შეწყდეს pIII (FpIIId) დელეციით. მიუხედავად იმისა რომ ფაგის რეპლიკაცია და კონსტრუირევბა საკმაოდ კარგადაა შესწავლილი *in vitro*, ფაგის კონსტრუირების უჯრედული საიტი და გამონთავისუფლება აქტიური კვლევის საგანია.



სურათი 6 Ff ფაგის გენეტიკური რუქა

დევიდ ალსტინის და კოლეგების მიერ (Alsteens D. 2013) ძალის-მანძილზე მრუდზე-დაფუძნებული ატომური ძალის მიკროსკოპიის (FD CB AFM) გამოყენებით დადგენილ იქნა, რომ ვირიონის კონსტუქციის საიტი მდებარეობს ბაქტერიული უჯრედის სეპტაში რბილი ნანოდომენის სახით, რომელიც შემოსაზღვრულია უჯრედის კედლის მაგარი ფრაქციით. კვლევა ჩატარდა Fwt ფაგით ინფიცირებული *E. coli* ბაქტერიაზე FD CB AFM-ს Ni2 þ -NTA ტერმინალური წვერის გამოყენებით [5].

როგორც ზემოთ ავღნიშნეთ, ძაფისებრი ფაგების პირველადი რეცეპტორი პილია, გრძელი ძაფისებრი წამონაქმნი ბაქტერიის ზედაპირზე. პილის სამი ტსხვადასხვა ტიპი შეიძლება ასრულებდეს რეცეპტორის ფუნქციას: კონიუგავიურ, N (ან I) და IV ტიპი. მეორეული რეცეპტორის ფუნქციას *E. Coli*-ს Ff და *V. cholerae* CTXφ ფაგისთვის ასრულებს შიდა მემბრანის პროტეინების კომპლექს - TolQRA, რომელიც დიდი რამოდენობითაა გრამუარყოფით ბაქტერიებში.

TolQRA მიეკუთვნება მსხვილ ტრანს-მემბრანულ Tol-Pal კომპლექს, რომელიც მონაწილეობს უჯრედის გაყოფაში და უჯრედის გარსის მთლიანობის შენარჩუნებაში. აღსანიშნავია რომ ეპისომალური და ლატენტური ფაგების გენომის აქტივობა მასპინძელ უჯრედში დამოკიდებულია ორმაგჯაჭვიან დნმ-ის ფერმენტებზე: რნმ პოლიმერაზა ნეგატიური ჯაჭვის რეპლიკაციისთვის და XerC რეკომბინაზა ქრომოსომაში ინრეგრაციისთვის. ორივე შემთხვევაში ჩახვეული ერთჯავიანი დნმ-ი ქმნის კვაზი-ორმაგჯაჭვიან შეკავშირების საიტს შესაბამისი პროტეინებისთვს: -35 და -10 ბოქსები რნმ პოლიმერაზასთვის და dif საიტები საიტ სპეციფიური XerCD რეკომბინაზასთვის.

ფაგ-გამოვლენის (Phage display) ტექნოლოგია

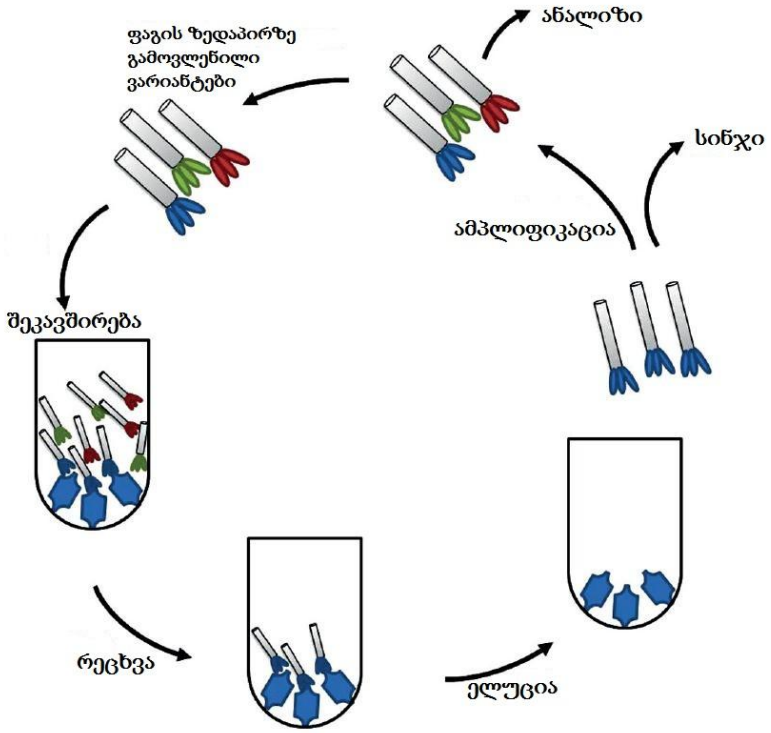
ძაფისებური ფაგის აღმოჩენიდან დაახლოებით 30 წლის შემდეგ ჯორჯ სმიტის მიერ ჩატარებული კვლევის საფუძველზე (Smith G., 1985) ფაგის გენომში უცხო დნმ-ის ფრაგმენტის ჩაშენების - გენეტიკური მოდიფიკაციის შედეგად უჯრედის ზედაპირზე პეპტიდურ თანმიმდევრობაში წარმოიქმნა ახალი პოლიპეპტიდური თანმიმდევრობა, როელსაც ამ ახალი პოლიპეპტიდის სპეციფიური ანტისხეული მარტივად უკავშირდებოდა. ამ მეთოდოლოგიის საშვალებით დამყარდა პირდაპირი ფიზიკური კავშირი ფენოტიპსა (პოლიპეპტიდი) და გენოტიპს (ინტეგრირებული დნმ) შორის. მოცემული შრომა მიჩნეული ფაგ-გამოვლენის ტექნოლოგიის პირველ მცდელობად [11].

დნმ ბიბლიოთეკების განვითაებამ - რეკომბინაციული დნმ ტექნოლოგიების, რესტრიქტაზების, ლიგაზების, ოლიგონუკლეიტებზე-მიმართული მუტაგენეზის და პჯრ ტექნოლოგიების საფუძველზე, განაპირობა ფაგ-გამოვლენის ტექნოლოგიის სწრაფი წინსვლა.

მომდევნო კვლევება აჩვენა, რომ ძაფისებური ფაგის ზედაპირზე სასურველი მიმდევრობის და ფუნქციის მქონე ცილების სინთეზი შესაძლებელია [2].

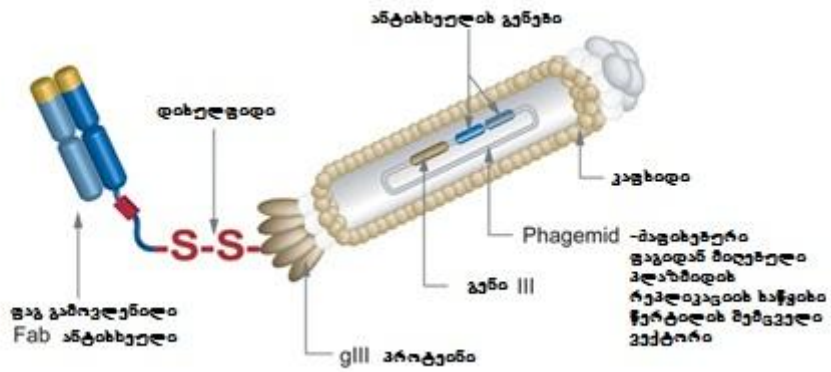
ძაფისებური ფაგის ზედაპირზე შესაძლებელია მრავალი სხადასხვა ტიპის მოლეკულის გამოვლენა. დღეს კვლევის უმეტესი ნაწილი მიმართულია სპეციფიური სამიზნე მოლეკულის ამოცნობის და შეკავშირების უნარის მქონე ცილების გამოვლენაზე, მაგალითად ანტისხეულის ფრაგმენტები.

ძაფისებრი ფაგები კლონირების ვექტორებად და ფაგ-გამოვლენის ვექტორებად ფართოდ გამოიყენება, თუმცა ბიფაზურ ქლოროფორმ-წყლის ინტერფაზა ფაგის სპეციფიურ შეკუმშვას იწვევს და ის არავირულენტურ I- და S-ფორმებს იღებს [21].



სურათი 3 ფაგ-გამოვლენის ციკლი

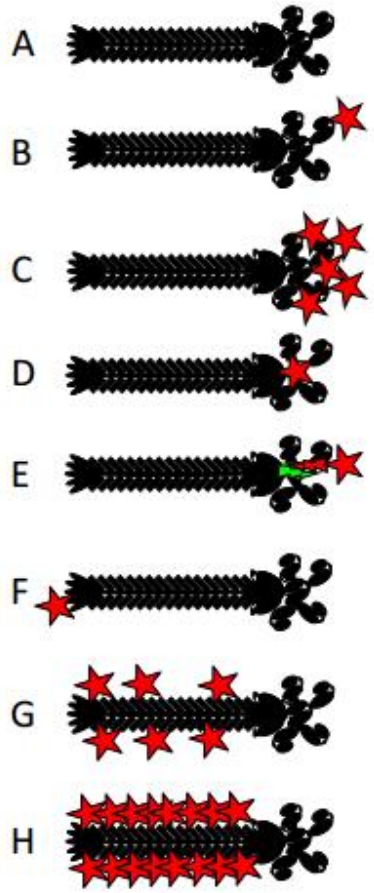
ანტისხეულების ფრაგნეტების გამოვლენა ფაგის ზედაპირზე განსაკუთრებული ინტერესის სფეროა, ამ მოლეკულებს აპლიკაციის ფართო სპექტრი აქვთ: დიაგნისტიკა, თერაპევტული აპლიკაცია, ბიოსენსორები და ა.შ. აღსანიშნავია, რომ ადამიანის ანტისხეულების 30% მდე გამოყოფილ იქნა სწორედ ფაგ-გამოვლენის ტექნოლოგიის გამოყენებით. თანამედროვე კვლევები მიმართულია სამიზნე მოლეკულის მიმართ ძლიერი ბმების წამომქმნელი (მაღალი აფინურობის მქონე) და მაღალსპეციფიური პოლიპეპტიდების შემუშავების და გამოვლენის მეთოდების დახვეწაზე [2].



სურათი 4 Fab ანტისხეულ გამოვლენილი M13 ფაგი [12]

ქვემოთ მოცემულია ფაგ-გამოვლენის სხვადასხვა ტიპების აღერა შესაბამისი ილუსტრაციებით:

A. ბუნებრივი ტიპის ფაგი
B. pIII ცილის გამოვლება, მონოვალენტური, შერწყმული სრული სიგრძის pIII-თან
C. pIII -პოლივალენტური გამოვლენა, შერწყმული სრული სიგრძის pIII -თან
D. pIII -მონოვალენტური გამოვლენა, შერწყმა pIII ის C დომენთან
E. არაპირდაპირი ფაგ-გამოვლენა, მაგალითად ლეიცინით კავშირი pIII და გამოვლენილ პროტეინს შორის
F. pVII ან pIX გამოვლენა
G. მოზაიკური pVII გამოვლენა, სადაც ბუნებრივი pVIII კო-ინტეგრირებულია ვირიონში
H. უნიფორმული pVIII გამოვლენა, სადაც ყველა pVIII შერწყმულია პეპტიდებთან



სურათი 7 ფაგ-გამოვლენის ტიპები

ნანოტექნოლოგიური აპლიკაცია

1. ბიოსენსორები და ნანოელექტრონიკა

მორფოლოგიური მახასიათებლების გათვალისწინებით ფილამენტური ფაგები შესაძლებელია განვიხილოთ ნანომართულის-მსგავს ელემენტებად.

ზირპელის და კოლეგების მიერ (Zirpel et al. 2014) ჩატარებულ ცვდაში Tyr შემცველი 5 მონომერული პეპტიდი გამოვლენილ იქნა ფილამენტზე, Au-ის შეკავშირები და აღდგენის გასაძლიერებლად. ბუნებრივი და სამი გენმოდიფიცირებული ფაგი შესწავლილი იქნა კვარცის კრისტალის მიკრობალანსით(QCM), ატომური ძალის მიკროსკოპიით (AFM), მასკანირებელი ელექტორნული მიკროსკოპიით (SEM) და ენერგიის დისპერსიული X-გამოსხივების სპეტროსკოპიით (EDX). მხოლოდ ერთი Tyr ერთეულის არსებობამ ფაგის ზედაპირზე გაზარდა Au ბმის აფინურობა. რეკომბინანტული ფაგის Au კლასტერული შეფუთვა ერთჯერადი მეტალიზაციის რეაქციით გახდა შესაძლებელი. შემდგომი გენეტიკური მოდიგიკაციებით შესაძლებელია საიტ-სპეციფიური ავტოკონსტრუირებადი ფაგის დამუშავება, რომელიც ნანოელექტონიკასა და ბიოსენსორებში ბიოთარგის ფუნქციას შეასრულებს [23] .

2. ორგანულ -არაორგანული თხევად კრისტალური ნანოსტრუქტურები

Ff ფაგბის ტენდენცია წამოქმნან კრისტალური შეფენილობა გამოყენებულ იქნა როგორც საშენი მასალა სამ-განზომილებიანი ცხაურის და აპკების კონსტრუირებაში. ამ მიზნით ფაგის pIII ბოლოზე არაორგანული მოლეკულების შემაკავშირებელი ცილები გამოიხატება და კონცენტრირდება მაგნინტურ ველთან ექსპოზიციისას. წამოიქმნება კომპლექსური თხევად-კრისტალური შრეები. გაშრობის შემდეგ თხევადი კრისტალები ქმნიან აპკს, რომელში მოქცეული ფაგი ვირულენტობას 7 თვის განმავლობაში ინარჩუნებს [24]. ასევე სველი-სპინინგის და ელექტროსპინინგის საშვალებით შესაძლებელია Ff ფაგის ნანობოჭკოების დამზადება. ამგვარი ბოჩკოების გამოყენება შესაძლებელია ბიოსამედიცინო , ქსოვილის ინჟინერიის და ელექტრონული ან ოპტიკური მასალის სინთეზში.

3. Li-იონური ელემენტი

ლის და კოლეგების მიერ (Lee J. Y. at al. 2009) Ff ფაგზე სპეციფიურ - გამოვლენილმა ცილა pVIII, საშვალება მისცა ანჰიდრიდული $FePO_4$ ნანომავრთულის კონსტრურება ფილამნტის გასწვრივ. ნახშირბადის ნანომილაკების მიმბმელი პროტეინები გამოხატული იყო pIII კიდეზე. წარმოიქმნა Ff ფაგზე არსებული ფილამენტების და ნანომილაკების პლათფორმა, კონსტრუირებული $FePO_4$ ნანომავრთულებით. კონსტრუირდა მაღალი ძალის მწარმოებელი ლითიუმის იონური ელემენტი (ჰიბრიდული ნანოსტუქტურა) [18].

დასკვნითი ნაწილი

- ძაფისებრი ბაქტერიოფაგები გრძელი ფილამენტებია რომელებიც ერთჯაჭვიან წრიულ დნმ შეიცავს.
- არ იწვევენ უჯრედის ლიზისს, გამოიყოფა სეკრეციის გზით, შესაბამისი ფაგისმიერი სეკრეციის სისტემის გავლით.
- ფაგის სეკრეციის კონსტრუირება მოითხოვს ატფ-ს.
- ზოგიერთი ფაგი მრავლდება როგორც ეპისომები. ნაწილი კი ინტეგრირდება ქრომოსომაში - ზომიერი ძაფისებრი ფაგები.
- *E. coli* f1, M13 და fd ფაგები გამოიყენება როგორც ვეტორები და დამხმარე ფაგები დნმ სექვენირებაში, პროტენის გამოვლენის პლათფორმებში და ნანოტექნოლოგიებში.

ფილამენტური ბაქტერიოფაგები ძალიან მნიშვნელოვანი აგენტებია როგორც ბაქტერიების ეკოლოგიის, პათოგენეზის და ფიზიოლოგიის კუთხით ასევე ბიოტექნოლოგიური მნიშვნელობით. ძაფისებრი ბაქტერიოფაგების კვლევა და სხვადასხვაგვარი აპლიკაცია ინტენსიურად მიმდინარეობს.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Ilyina, T. S. "Filamentous bacteriophages and their role in the virulence and evolution of pathogenic bacteria." *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 30, no. 1 (2015): 1-9.
2. Karlsson, Fredrik. *The biology of filamentous phage infection-implications for display technology*. Lund University, 2004.
3. Ploss, Martin, and Andreas Kuhn. "Kinetics of filamentous phage assembly." *Physical biology* 7, no. 4 (2010): 045002.
4. Wang, Ying A., Xiong Yu, Stacy Overman, Masamichi Tsuboi, George J. Thomas, and Edward H. Egelman. "The structure of a filamentous bacteriophage." *Journal of molecular biology* 361, no. 2 (2006): 209-215.
5. Alsteens, David, Heykel Trabelsi, Patrice Soumillion, and Yves F. Dufrêne. "Multiparametric atomic force microscopy imaging of single bacteriophages extruding from living bacteria." *Nature communications* 4 (2013).
6. Rakonjac, Jasna. "Filamentous Bacteriophages: Biology and Applications." *eLS* (2011).
7. Kutter, Elizabeth, and Alexander Sulakvelidze, eds. *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, 2004.
8. Advances in Applied Microbiology Volume 70, 2010, Pages 217–248 Advances in Applied Microbiology
9. Burton Guttman, Raul Raya, Elizabeth Kutter, 3 Basic Phage Biology, The Lab of Phage Biology, The Evergreen State College, Olympia, WA Cerela, Tucuman, Argentina
10. http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp
11. Smith, George P. "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* 228, no. 4705 (1985): 1315-1317.
12. Qi, Huan, Haiqin Lu, Hua-Ji Qiu, Valery Petrenko, and Aihua Liu. "Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction." *Journal of molecular biology* 417, no. 3 (2012): 129-143.
13. Ploss, Martin, and Andreas Kuhn. "Kinetics of filamentous phage assembly." *Physical biology* 7, no. 4 (2010): 045002.
14. http://www.smem.uni-bayreuth.de/en/samples_gallery/Transmission-Electron-Microscopy-_TEM_/Biological-Samples/virus/index.html

15. Rice, Scott A., Chuan Hao Tan, Per Jensen Mikkelsen, Vanderlene Kung, Jerry Woo, Martin Tay, Alan Hauser, Diane McDougald, Jeremy S. Webb, and Staffan Kjelleberg. "The biofilm life cycle and virulence of Pseudomonas aeruginosa are dependent on a filamentous prophage." *The ISME journal* 3, no. 3 (2009): 271-282.
16. Chopin, Marie-Christine, Annette Rouault, S. Dusko Ehrlich, and Michel Gautier. "Filamentous phage active on the gram-positive bacterium Propionibacterium freudenreichii." *Journal of bacteriology* 184, no. 7 (2002): 2030-2033.
17. Kim, AUGUSTINE Y., and HANS P. Blaschek. "Isolation and characterization of a filamentous viruslike particle from Clostridium acetobutylicum NCIB 6444."*Journal of bacteriology* 173.2 (1991): 530-535.
18. Lee, Yun Jung, Hyunjung Yi, Woo-Jae Kim, Kisuk Kang, Dong Soo Yun, Michael S. Strano, Gerbrand Ceder, and Angela M. Belcher. "Fabricating genetically engineered high-power lithium-ion batteries using multiple virus genes." *Science* 324, no. 5930 (2009): 1051-1055.
19. Adams, Mark Hancock. "Bacteriophages." *Bacteriophages* (1959).
20. Wang, Qiuya, Biao Kan, and Ruibai Wang. "Isolation and characterization of the new mosaic filamentous phage VFJ Φ of Vibrio cholerae." *PloS one* 8, no. 8 (2013).
21. Olofsson, Linus, Jonas Ankarloo, Per Ola Andersson, and Ian A. Nicholls. "Filamentous bacteriophage stability in non-aqueous media." *Chemistry & biology* 8, no. 7 (2001): 661-671.
22. Rakonjac, Jasna. "Filamentous Bacteriophages: Biology and Applications."*eLS* (2011).
23. Zirpel, Nuriye Korkmaz, Taner Arslan, and Hyeji Lee. "Engineering filamentous bacteriophages for enhanced gold binding and metallization properties." *Journal of colloid and interface science* 454 (2015): 80-88.
24. Merzlyak, Anna, and Seung-Wuk Lee. "Phage as templates for hybrid materials and mediators for nanomaterial synthesis." *Current opinion in chemical biology*10, no. 3 (2006): 246-252.