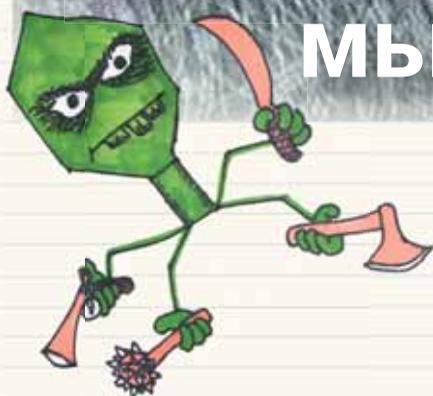
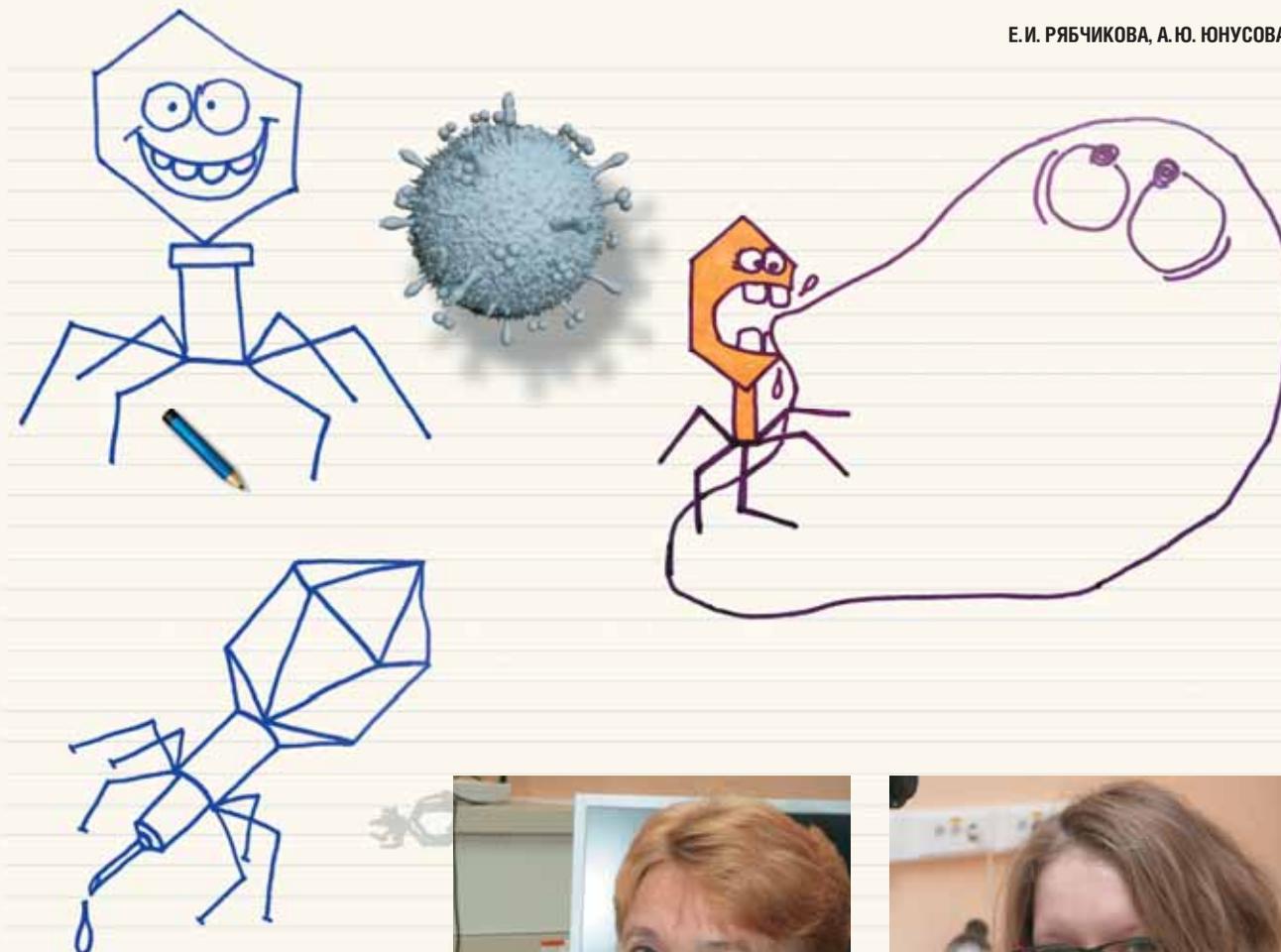




Бактериофаг, мы тебя видим!



Прошло сто лет с того времени, как английский микробиолог Ф. Туорт отметил прозрачные стекловидные пятна в колониях микрококков, где погибли бактериальные клетки. После открытия бактериофагов их исследования долгое время носили феноменологический характер из-за недостаточного развития экспериментальных методов. Ученые не имели возможности детально изучить особенности противобактериального воздействия бактериофагов, так как последние нельзя увидеть не только невооруженным глазом, но и с помощью светового микроскопа. Изучение вирусов, в том числе вирусов бактерий, вышло на принципиально новый уровень лишь с созданием и внедрением в научную практику электронного микроскопа



Так выглядят нитевидные бактериофаги после негативного контрастирования фосфорновольфрамовой кислотой в поле зрения электронного микроскопа Jet 1400 (JEOL, Япония)

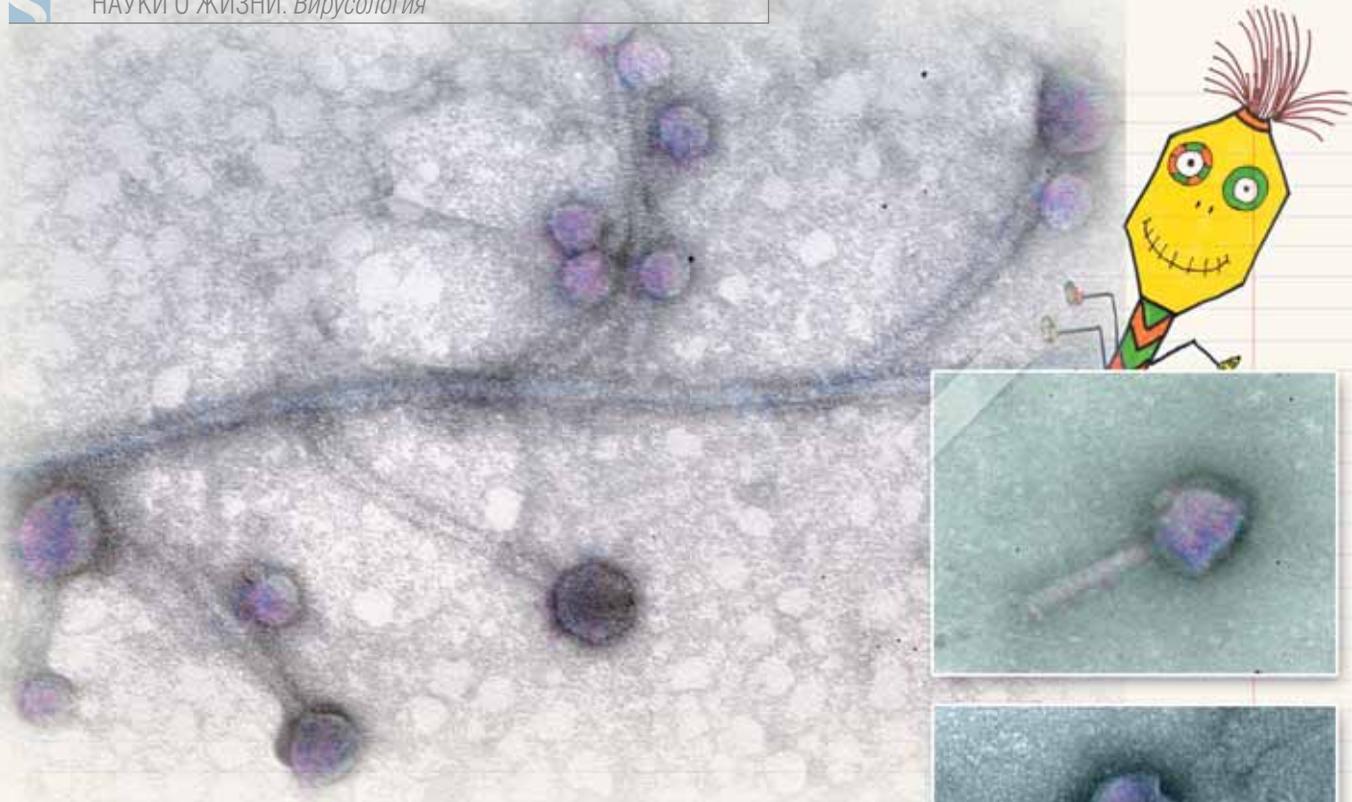


РЯБЧИКОВА Елена Ивановна – доктор биологических наук, заведующая группой микроскопических исследований Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), доцент кафедры биомедицинской физики и кафедры молекулярной биологии Новосибирского государственного университета. Автор и соавтор более 150 научных работ

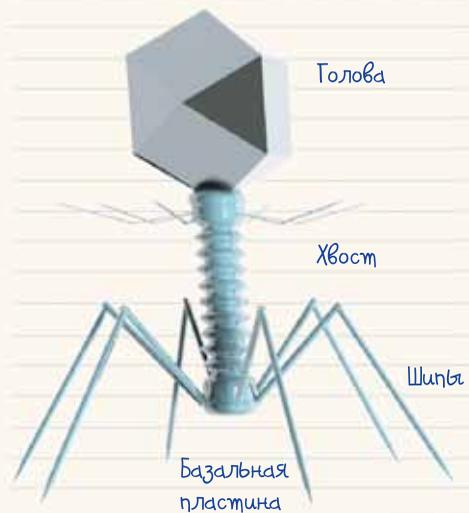
ЮНУСОВА Анастасия Юрьевна – аспирант группы микроскопических исследований Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 4 научных работ

Ключевые слова: бактериофаги, вирусы бактерий, морфология, электронная микроскопия.
Key words: bacteriophages, bacteria viruses, morphology, electron microscopy

© Е. И. Рябчикова, А. Ю. Юнусова



Методом негативного контрастирования хорошо выделяются разные морфологические формы бактериофагов. Например, в суспензии, полученной на основе клеточной культуры бактерии *Proteus mirabilis*, видны фаги разного размера, с «хвостом» и бесхвостые (вверху). Справа: бактериофаги разной формы в смыве с кишечника индюшки

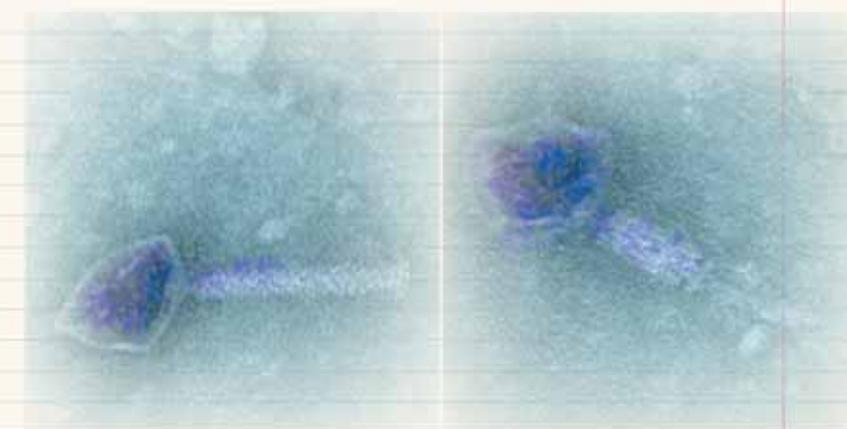


Типичный бактериофаг состоит из «головы», где содержится ДНК или РНК, окруженная белковой или липопротеиновой оболочкой (капсидом), и «хвоста» — белковой трубки, которую вирус использует для «инъекции» генетического материала в бактериальную клетку

С появлением электронной микроскопии стало понятно, что бактериофаги являются даже не микро- а наноорганизмами, так как их размеры не превышают 100 нм. Также выяснилось, что по своему строению они отличаются колоссальным разнообразием. Соответственно, возник вопрос об их номенклатуре. В основу первой классификации, которая была предложена еще в 1943 г., легли особенности строения фагов, установленные с помощью электронной микроскопии. Один из ее основоположников, Э. Руска, в своей общей схеме классификации вирусов выделил бактериофаги отдельно, разделив их на три типа по морфологическим характеристикам (Ackermann, 2009).

В основу современной систематики бактериофагов, созданной в 1967 г., легла классификация, включавшая шесть морфотипов. Но по мере открытия новых бактериофагов в нее включались все новые семейства, роды и виды. С развитием методов молекулярной биологии появились дополнительные критерии классификации, учитывающие тип нуклеиновой кислоты и (или) композицию белков в составе фага.

В соответствии с решением Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) бактериофагами называют вирусы, специфически инфицирующие клетки бактерий и архей. Определение видовой принадлежности бактериофагов проводят на основе комплекса признаков, в который обязательно входит форма и размеры вирусного капсида, тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), слагающей геном, наличие/отсутствие оболочки



Несокращенный «хвост»

Сокращенный «хвост»

Применение в исследованиях бактериофагов современных молекулярных методов позволило выявить множество особенностей этих интересных организмов. Бактериофаги в свою очередь оказались для молекулярных биологов очень полезным методологическим инструментом (Brussow, 2013).

Была бы голова, а хвост будет

Бактериофаги, по сути, устроены сравнительно просто: каждый такой вирус представляет собой комплекс нуклеиновой кислоты и белков, упакованных особым образом. Форма их может быть причудлива, однако около 96% всех известных бактериофагов имеют «хвостатый» фенотип (Matsuzaki *et al.*, 2005). У них имеется «голова» икосаэдрической формы (белковый резервуар, где упакована нуклеиновая кислота) и «хвост» — белковая структура, где расположены элементы, способные прочно связываться с рецепторами (особыми белками или полисахаридами) на поверхности бактерии. Разные виды «хвостатых» бактериофагов различаются размерами «головы», размером и тонкой структурой «хвоста».

Чтобы узнать вид бактериофага, нужно определить его ультраструктурные характеристики, для

«Хвост» бактериофагов может быть разной длины и структуры: длинный, гибкий и несокращенный «хвост» — признак фагов семейства Siphoviridae, короткий — Podoviridae. А представители семейства Myoviridae обладают жестким, способным к сокращению «хвостом», отделенным от «головы» своеобразной «шейкой» (вверху)

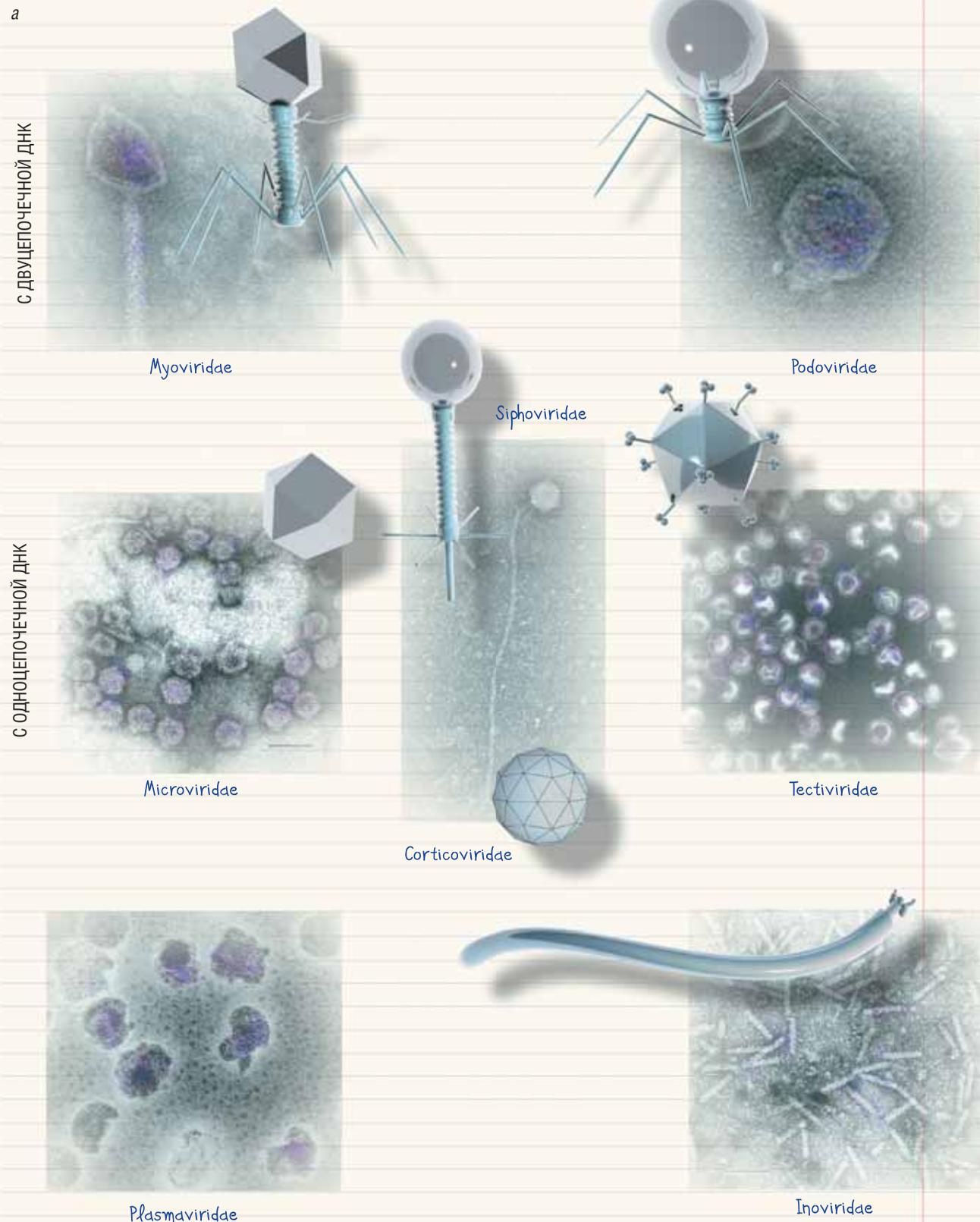
чего используют метод негативного контрастирования. Образцом может служить любая взвесь, содержащая фаги: вода из природного источника, смывы с кишечника животных или суспензия бактериальных клеток после инкубации с бактериофагом в условиях лаборатории. На каплю подготовленной суспензии помещают специальную медную сетку, покрытую тонкой полимерной пленкой, на которую и сорбируются бактериофаги. Затем сетку обрабатывают контрастирующим веществом (обычно уранилацетатом или фосфорно-вольфрамовой кислотой), которое окружает частицы бактериофага и создает темный фон, на котором бактериофаги, имеющие низкую электронную плотность, становятся видны в электронном микроскопе.

На сегодняшний день с помощью электронной микроскопии описано свыше 6,3 тыс. бактериофагов (Ackerman & Tiekotter, 2012; Ackermann & Prangishvili, 2012). Оказалось, что далеко не у всех бактериофагов можно четко выделить «голову» и «хвост», а что касается их наследственного материала, то наиболее часто встречаются фаги с двуцепочечной ДНК. Систематика бактериофагов очень динамична, поскольку регулярно обнаруживаются новые фаги (Ackermann, 2007).

Охота на бактерию

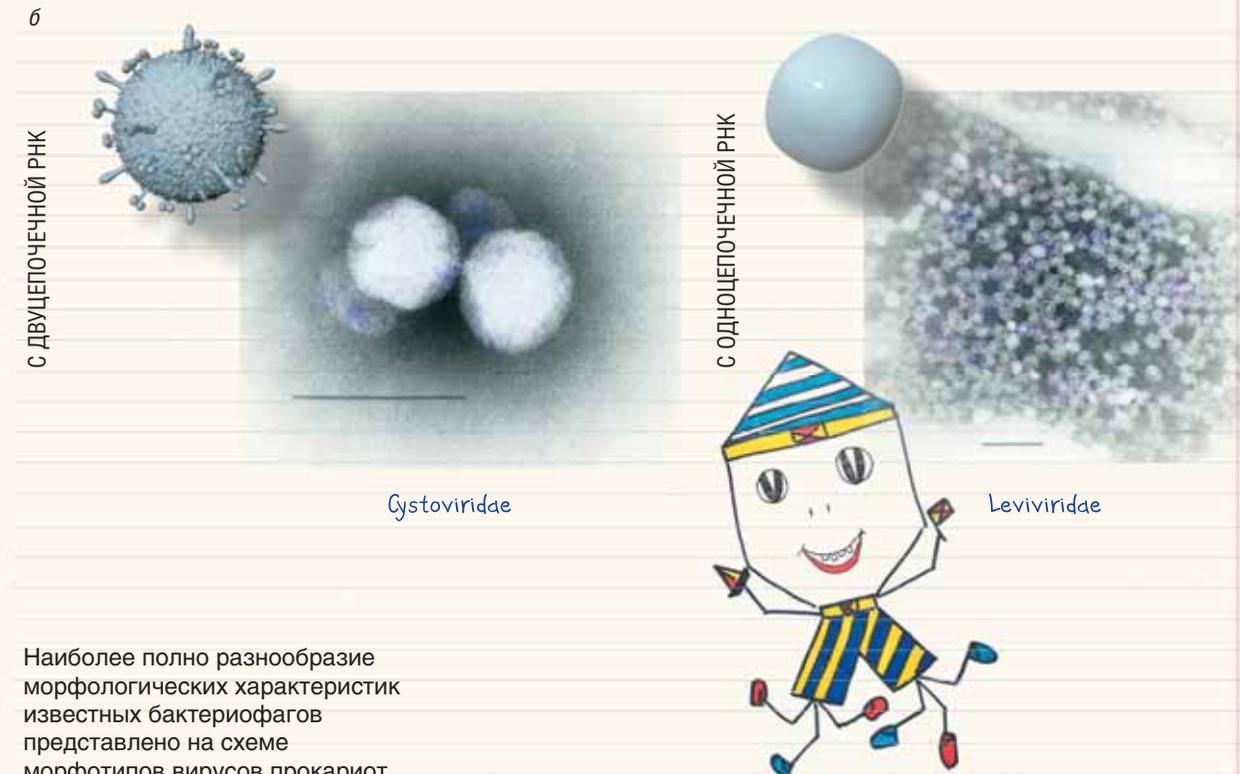
Совершенствование методов электронной микроскопии позволило визуализировать не только сами бактериофаги, но и процесс их размножения. Наиболее детально исследован процесс проникновения в клетку «хвостатых» бактериофагов, описаны молекулярные механизмы «впрыскивания» фаговой ДНК в цитоплазму бактериальной клетки (Guerrero-Ferreira & Wright, 2013).

Типичное поведение бактериофага при «нападении» на бактерию можно проследить на примере лизирующего фага. Сначала фаг прикрепляется к поверхности бактерии, используя ее рецепторы в качестве «якоря». Затем его «хвост» с помощью специальных белков внедряется в бактериальную стенку — образуется «канал», по которому нуклеиновая кислота фага вбрасывается в клетку. В течение следующего получаса в клетке бактерии



с ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

с ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК



с ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК

с ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК

Наиболее полное разнообразие морфологических характеристик известных бактериофагов представлено на схеме морфотипов вирусов прокариот, разработанной Г. Аккерманном. На ней представлено 10 семейств вирусов бактерий и 11 семейств вирусов архей. Схема учитывает основные таксономические признаки фагов – форму капсида и тип нуклеиновой кислоты, ДНК (а) или РНК (б) (Ackermann, 2007). «Голова» бактериофагов, как правило, симметрична и имеет шестиугольный контур. Бактериофаг может быть лишен «хвоста», но при этом иметь дополнительную оболочку, как у представителей семейства Corticoviridae, а отсутствие «головы» – типичный признак семейства Inoviridae, объединяющего «нитчатые» бактериофаги.

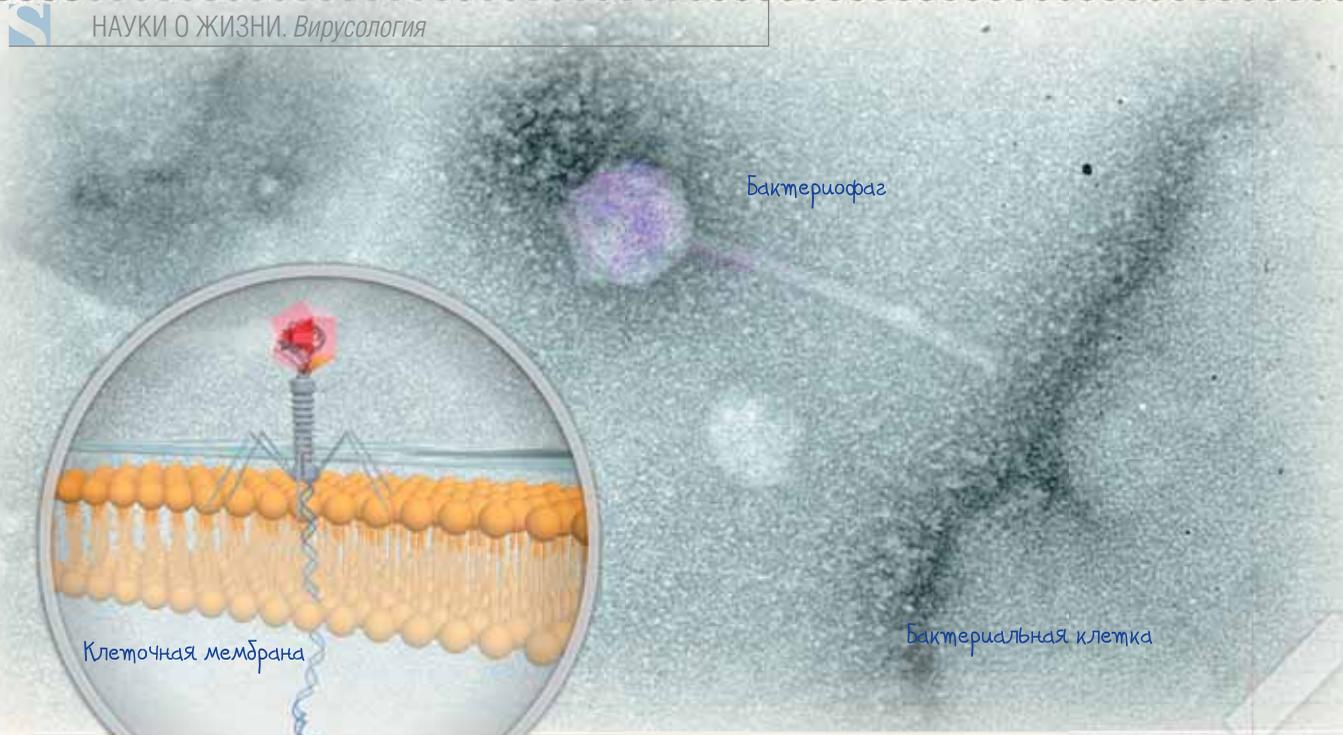
Царство прокариот (доядерных организмов) подразделяется, как известно, на бактерии и архей. Представители этих подцарств отличаются друг от друга структурой клеточной стенки, особенностями жизнедеятельности и степенью устойчивости к факторам внешней среды (большая часть архей обитает в экстремальных условиях). Несмотря на небольшое число выделенных видов вирусов архей, их морфологическое разнообразие уже сейчас превосходит разнообразие фагов бактерий. Среди них встречаются и типичные для последних «хвостатые» формы, однако подавляющее большинство археофагов имеют уникальные морфотипы. Среди них – вирионы в виде «эллипсоида» веретенообразной, каплевидной и бутылочной формы, бесхвостые или с двумя хвостами, сферические и палочковидные вирионы и т. п. При этом обнаруженное морфологическое разнообразие вирусов архей представляет собой, вероятно, лишь верхушку айсберга.

Уникальные характеристики археофагов наряду с существованием трех «клеточных линий» на планете – бактерий, архей и эукариот (ядерных организмов) – свидетельствуют о наличии трех специфических вирусных «доменов», образовавшихся в результате долгой совместной эволюции вирусов и их «хозяев», хотя некоторые из этих вирусов сохранили следы их общего происхождения (Pina *et al.*, 2011)

* При методе ультратонких срезов клетки заливают в особую смолу, и из получившихся твердых блоков готовят срезы толщиной 60–80 нм на ультрамикротоме с помощью стеклянного или алмазного ножа

происходит синтез белковых и нуклеиновых компонентов фагов и сборка новых фаговых частиц. После этого клетка разрушается, освобождая зрелые вирионы.

Сочетание методов негативного контрастирования и ультратонких срезов* позволяет проследить все этапы воспроизводства бактериофагов, включая сорбцию частиц фага на поверхности бактериальных клеток, их проникновение в клетки и копирование. К сожалению, эта область исследований разработана существенно хуже, чем визуализация и идентификация



Бактериофаг

Бактериальная клетка

Клеточная мембрана

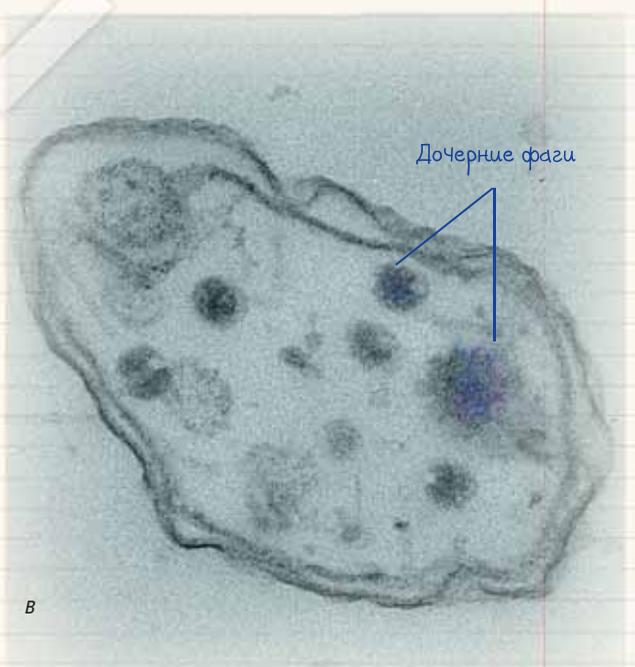
а

Эти фотографии иллюстрируют основные этапы репродукции бактериофага семейства *Mioviridae* в клетках бактерий (а). На ультратонких срезах инфицированной бактериальной клетки видны вирусные частицы, как сорбированные на поверхности клетки, так и находящиеся в цитоплазме (б). Результат заражения фагом – гибель бактериальной клетки, цитоплазма которой лизирована и содержит дочерние фаги (в)



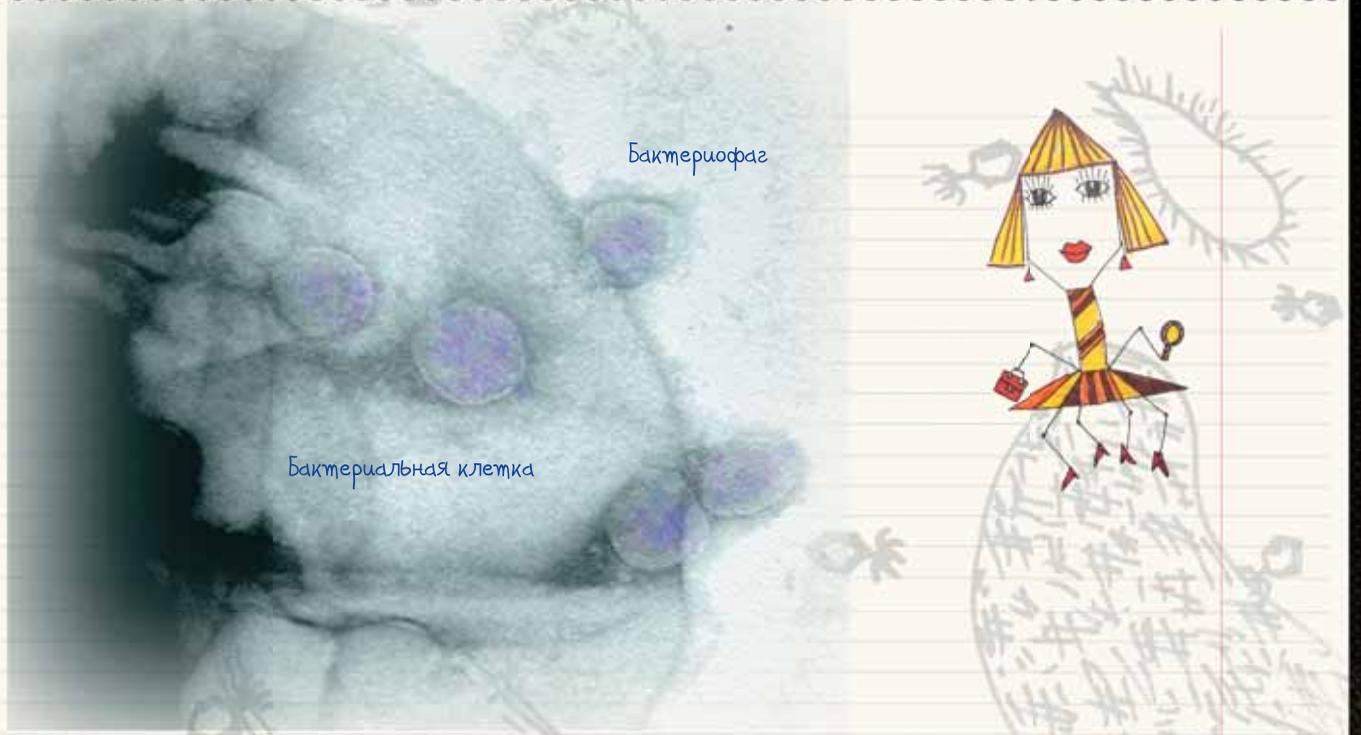
Бактериофаг

б



Дочерние фаги

в



Бактериофаг

Бактериальная клетка

Сорбция на поверхности бактериальной клетки «короткохвостых» частиц фагов семейства *Podoviridae*, которые прикрепляются к клетке с помощью небольших белковых субъединиц

бактериофагов методом негативного контрастирования. Между тем ультраструктурные характеристики каждого из этапов жизненного цикла бактериофагов могут быть полезны для адекватной оценки эффективности разрабатываемых методов фаговой терапии.

Лутература
 Ackermann H. W., Prangishvili D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. 2012. N. 157. P. 1843–1849.
 Ackermann H. W., Tiekotter K. L., Murphy's law – if anything can go wrong, it will // Bacteriophage. 2012. N. 2:2. P. 122–129.
 Bacteriophages methods and protocols / Ed. A. M. Kropinski, R. J. Clokie. Humana Press, 2009. V. 1.
 Duckworth D. H. Who discovered bacteriophage? // Bacteriological reviews. 1976. V. 40. N. 4. P. 793–802.
 Introduction: a short history of virology // Viruses and man: a history of interactions / Ed. M. W. Taylor. Springer, 2014. P. 1–21.
 Krylov V. N. Phage therapy in terms of Bacteriophage genetics: hopes, prospects, safety, limitation // Rus. J. of genetics. 2001. V. 37. N. 7. P. 869–887.
 Matsuzaki S., Rashel M., Uchiyama J., et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases // J. Infect. Chemother. 2005. N. 11. P. 211–219.

Бактериофаги, несомненно, представляют собой уникальное явление на нашей планете: с одной стороны, они просто устроены, с другой – характеризуются колоссальным разнообразием как своей морфологии, так и своих потенциальных «жертв».

Для нас эти микроорганизмы не только безопасны, но и «дружественны», так как способны убивать патогенные бактериальные клетки, не затрагивая при этом клетки высших организмов, включая человека, а также сельскохозяйственных животных или растений. Это свойство позволяет использовать бактериофаги для терапии бактериальных инфекций, следуя принципу «враг моего врага – мой друг».

Перспективность фаговой терапии определяется не только самим фактом уничтожения бактерий фагами, но и высокой специфичностью взаимодействия фаг-«хозяин». Наконец, поскольку речь идет о природном феномене, человек может воздействовать на патогенные бактерии, не применяя вредные химические агенты.

В публикации использованы фото авторов и рисунки Жени Власова