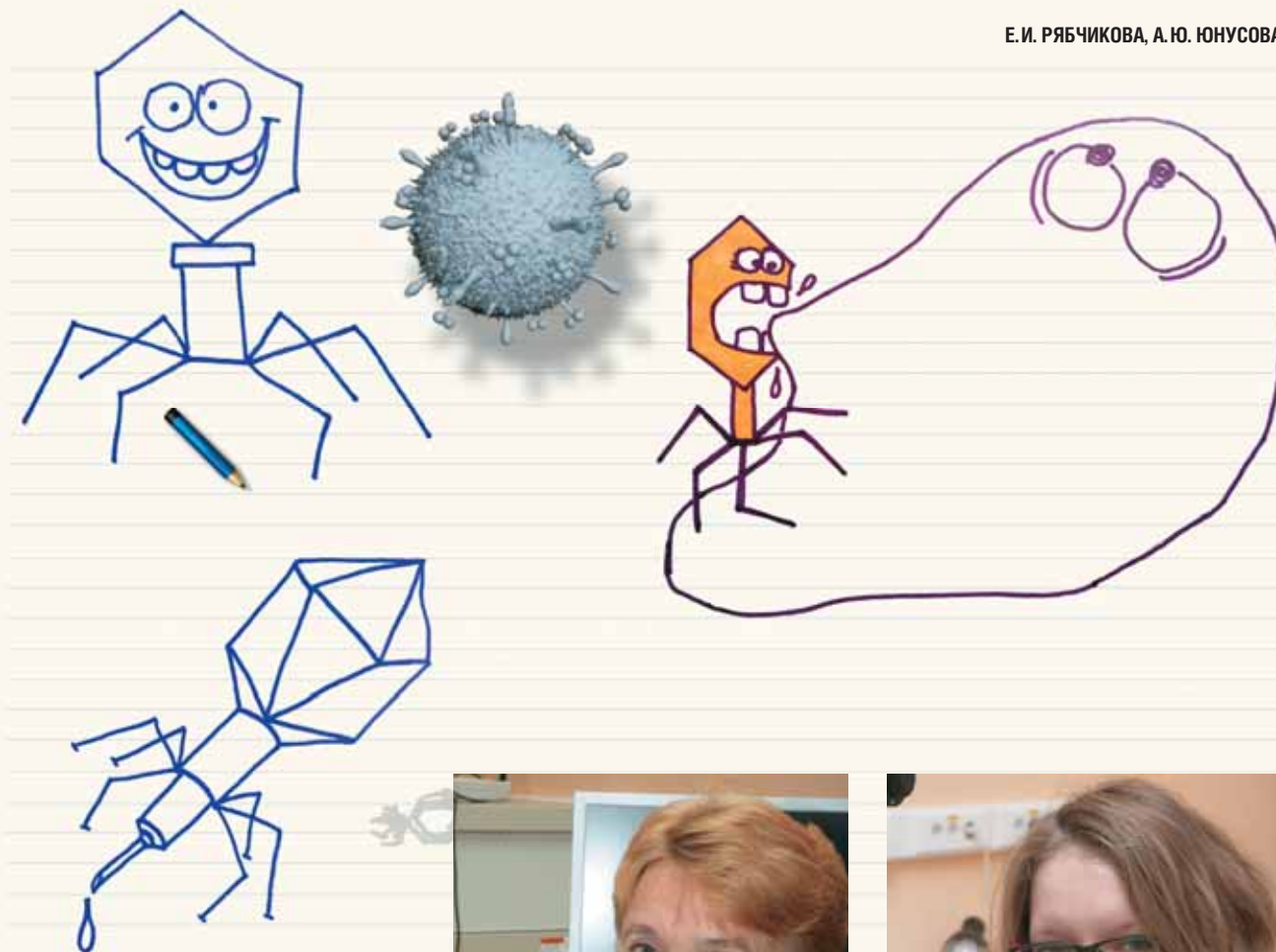




# Бактериофаг, мы тебя видим!



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)



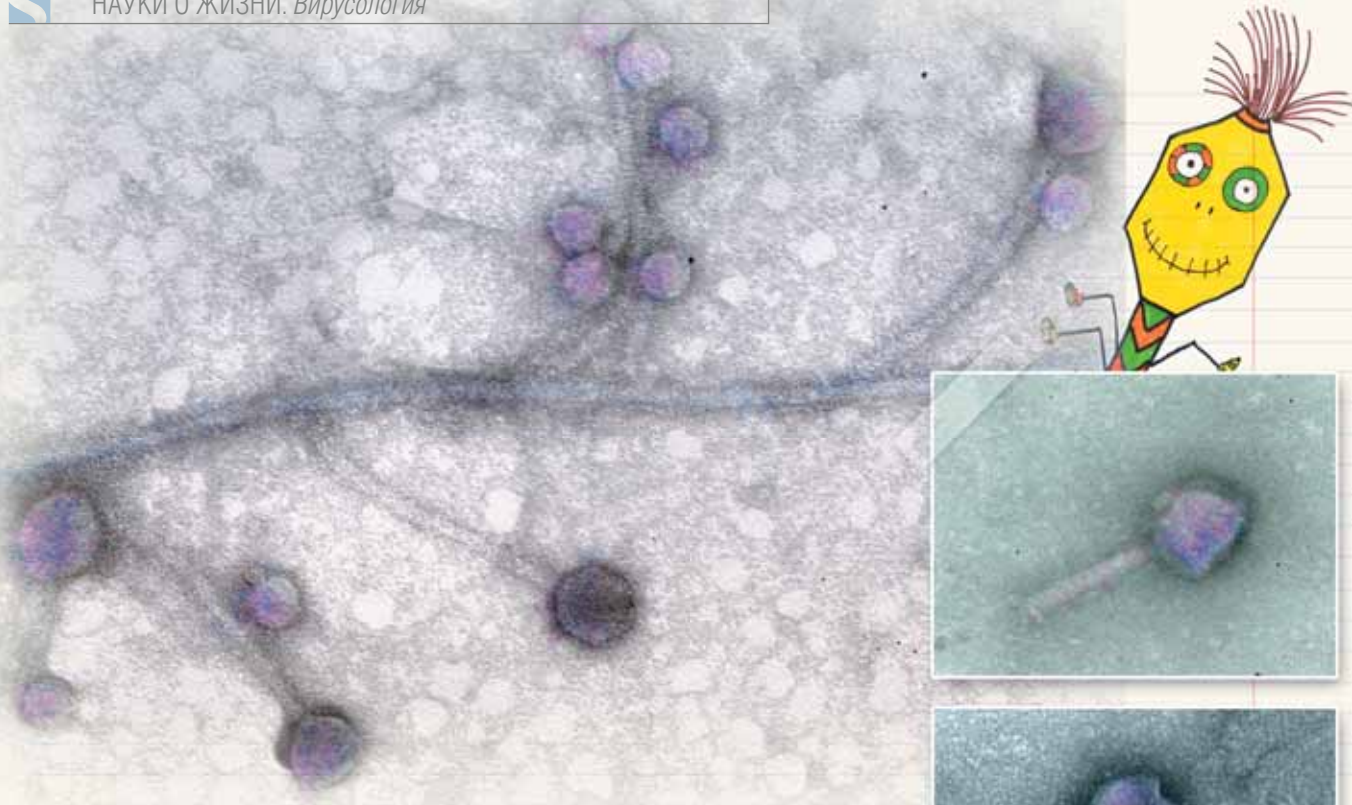
РЯБЧИКОВА Елена Ивановна – доктор биологических наук, заведующая группой микроскопических исследований Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), доцент кафедры биомедицинской физики и кафедры молекулярной биологии Новосибирского государственного университета. Автор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

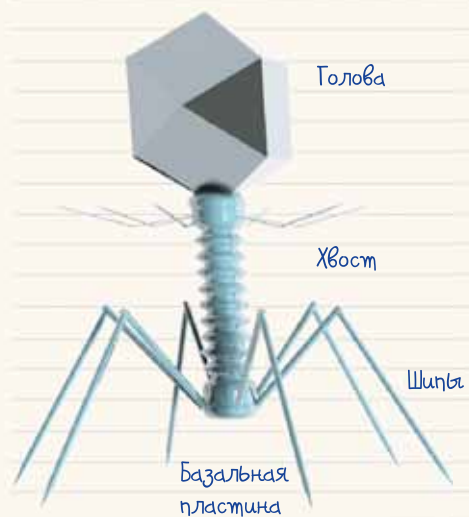
**Ключевые слова:** бактериофаги, вирусы бактерий, морфология, электронная микроскопия.  
**Key words:** bacteriophages, bacteria viruses, morphology, electron microscopy

© 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

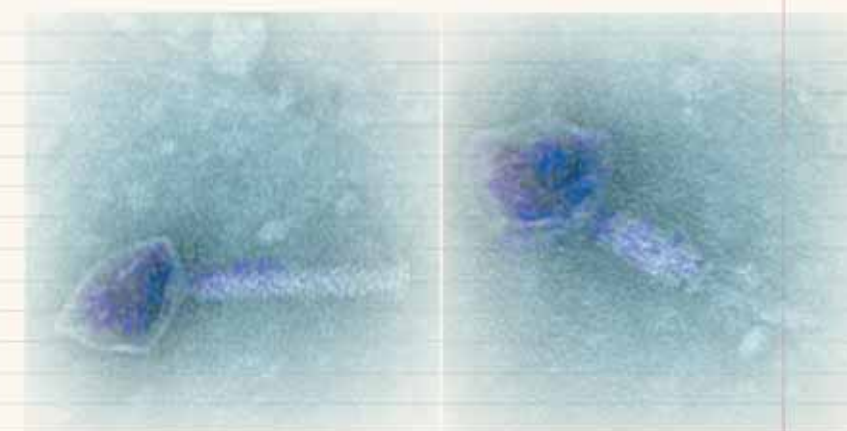


Типичный бактериофаг состоит из «головы», где содержится ДНК или РНК, окруженная белковой или липопротеиновой оболочкой (капсидом), и «хвоста» — белковой трубки, которую вирус использует для «инъекции» генетического материала в бактериальную клетку

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.

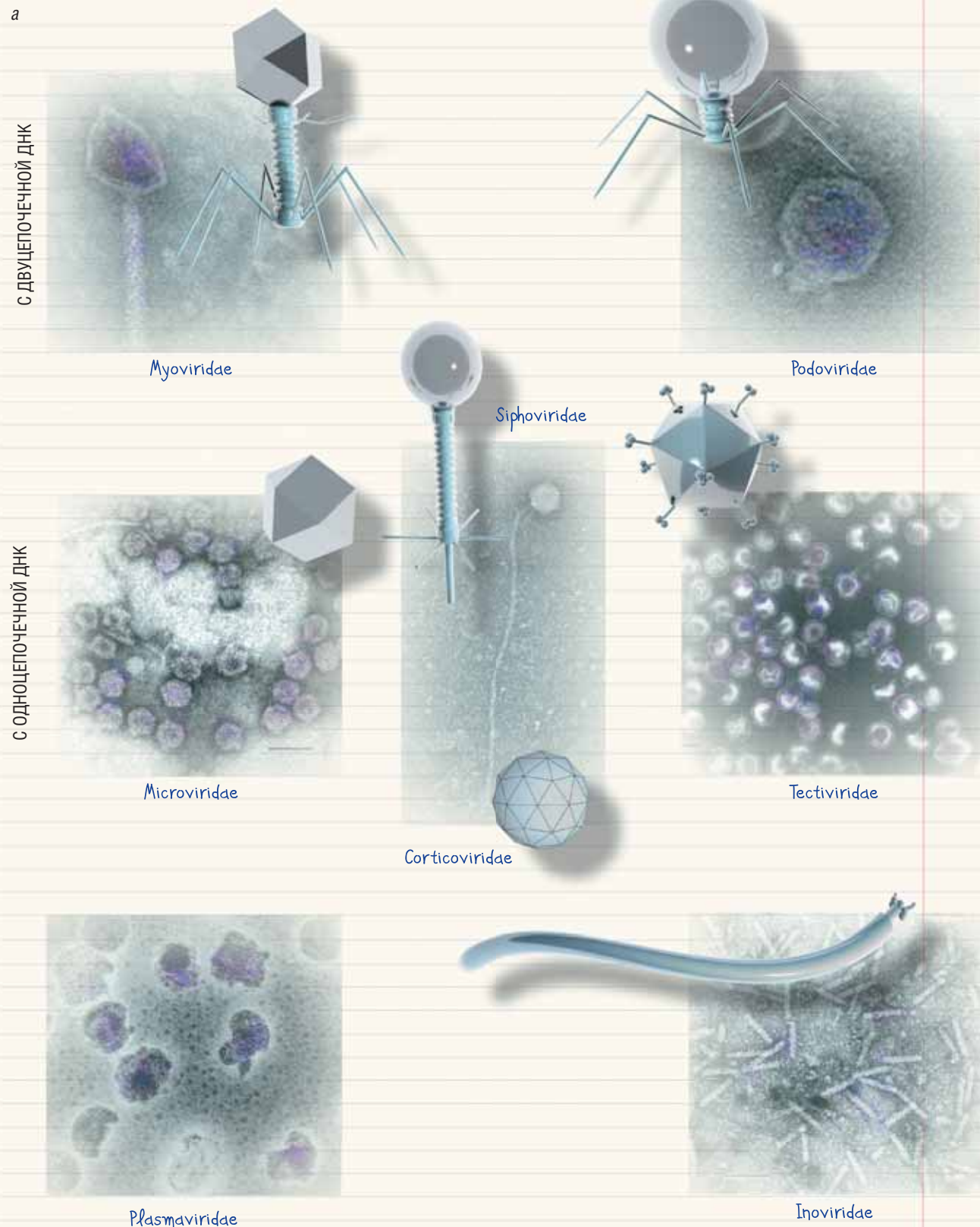
На сегодняшний день с помощью электронной микроскопии описано свыше 6,3 тыс. бактериофагов (Ackerman & Tiekotter, 2012; Ackermann & Prangishvili, 2012). Оказалось, что далеко не у всех бактериофагов можно четко выделить «голову» и «хвост», а что касается их наследственного материала, то наиболее часто 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

Myoviridae

Podoviridae

Siphoviridae

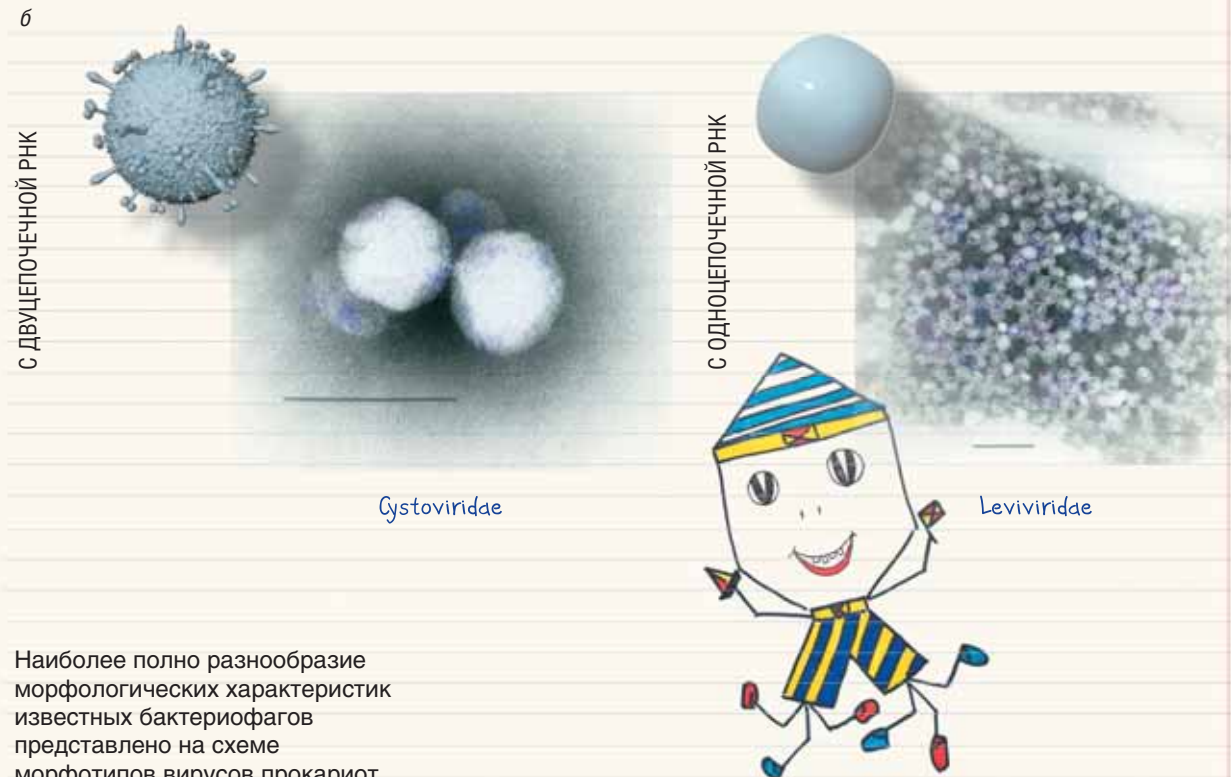
Microviridae

Corticoviridae

Tectiviridae

Plasmaviridae

Inoviridae



с ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК

с ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК

Cystoviridae

Leviviridae

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 имеет 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, каплеобразной 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.

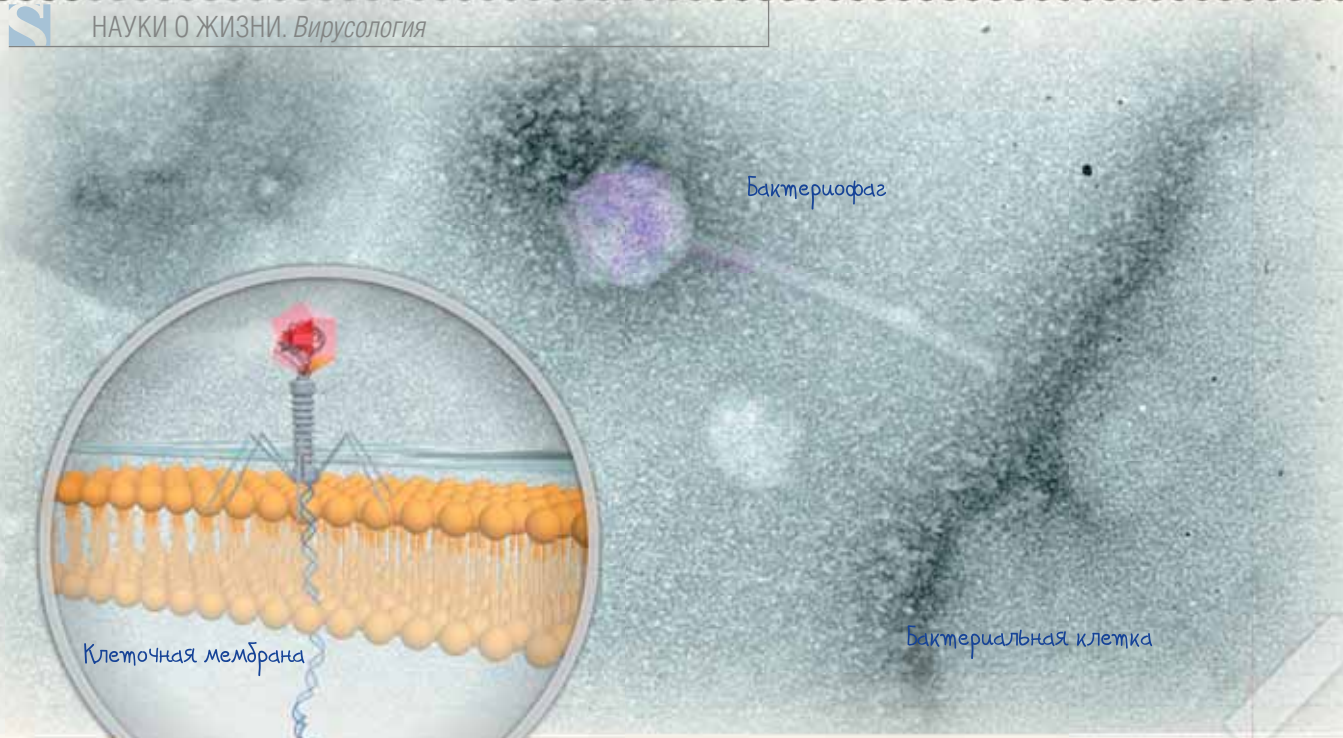
Уникальные характеристики археофагов наряду с существованием трех «клеточных линий» на планете – бактерий, архей и эукариот (ядерных организмов) – свидетельствуют о наличии трех специфических вирусных «доменов», образовавшихся в результате долгой совместной эволюции вирусов и их «хозяев», хотя некоторые 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

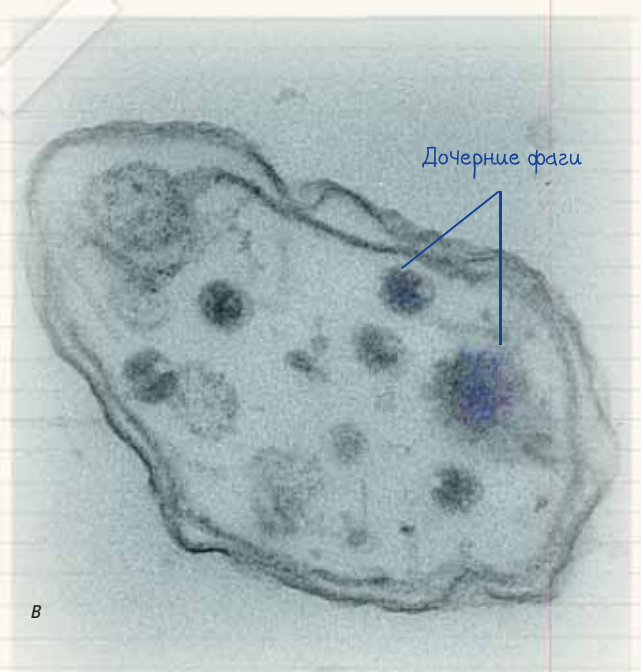
а

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)



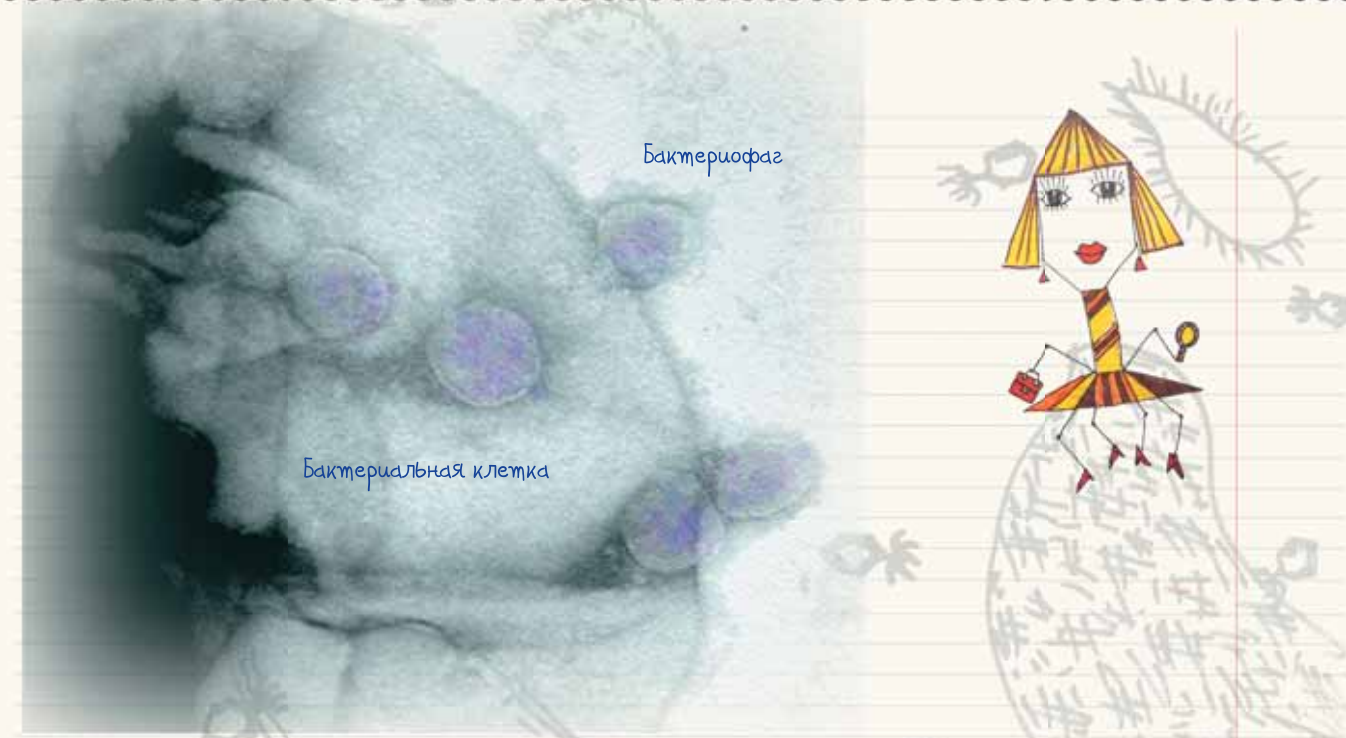
Бактериофаг

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.

**Б**актериофаги, 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.

*Литература*

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., Rashed M., Uchiyama J., et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases // *J. Infect. Chemother*. 2005. N. 11. P. 211–219.

В публикации использованы фото авторов и рисунки Жени Власова