

სტაფილოკოკური Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ანალიზი
და ლეთალური აქტივობის მქონე ფაგოსპეციფიური
რეკომბინანტული კლონების შესწავლა

ეკატერინე თევდორაძე

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
მეცნიერებათა და ხელოვნების ფაკულტეტზე სიცოცხლის შემსწავლელ
მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების
მოთხოვნის შესაბამისად*

სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი:

ლალი შანშიაშვილი - პროფესორი, ბიოლოგიურ მეცნიერებათა დოქტორი

თანახელმძღვანელი:

მზია ქუთათელაძე - ბიოლოგიურ მეცნიერებათა დოქტორი

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი 2013

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის "სტაფილოკოკური Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ანალიზი და ლეთალური აქტივობის მქონე ფაგოსპეციფიური რეკომბინანტული კლონების შესწავლა" ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

ეკატერინე თევდორაძე



20.07.2013

აბსტრაქტი

დღეისათვის, მსოფლიოში მნიშვნელოვან პრობლემას წარმოადგენს მულტირეზისტენტული ბაქტერიების გავრცელება. ახალი თაობის ანტიბიოტიკების უკონტროლო გამოყენებამ მკვეთრად გაზარდა გარემოში რეზისტენტული პათოგენების მომძლავრება.

ანტიბიოტიკორეზისტენტული სტაფილოკოკური შტამების გლობალურად გავრცელებამ მოითხოვა ახალი კლასის ანტიბაქტერიული საშუალებების შექმნის გადაუდებელი საჭიროება. ამ მხრივ, ფაგოთერაპია, როგორც ბაქტერიული ინფექციების წინააღმდეგ ბრძოლის ერთ-ერთი საშუალება, ეფექტური ალტერნატივაა.

ლითიური ბაქტერიოფაგის გენომი აკოდირებს მრავალ გენს, რომელთა პროდუქტები ტოქსიურია ბაქტერიული უჯრედების სასიცოცხლო კომპონენტების მიმართ. ფაგოსპეციფიური ცილებით ბაქტერიული უჯრედების მეტაბოლიზმის დაბლოკვა წარმოაჩენს მათ, როგორც ახალი კლასის ანტიბაქტერიულ აგენტებს მაღალი სამიზნე სპეციფიურობით.

სწორედ ასეთი ფაგოსპეციფიური ფერმენტების ბიოქიმიური თვისებების და უჯრედზე მათი მოქმედების მოლეკულური მექანიზმების დადგენა ქმნის რეალურ საფუძველს ახალი კლასის ანტიბაქტერიული პრეპარატების შესაქმნელად. ამ მიმართულებით ჩატარებული სამეცნიერო კვლევა მეტად აქტუალურია ახალი თაობის ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული ბაქტერიების გლობალური გავრცელების პირობებში.

ჩვენი კვლევის ობიექტია ვირულენტული სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი Sb-1, რომელიც წარმოადგენდა პოლივალენტური თერაპიული პრეპარატის მნიშვნელოვან კომპონენტს და წარმატებულად გამოიყენებოდა *S.aureus*-ით გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ, მათ შორის მეტიცილინ-რეზისტენტული სტაფილოკოკური ინფექციების წინააღმდეგ. ლითიური ბაქტერიოფაგი Sb-1, Twort-მსგავსი ვირუსების გვარის, SPO1-მონათესავე ფაგების *Spounavirinae* ქვეოჯახის კლასიკური წარმომადგენელია.

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი Sb-1-ის გენომში ლეთალური ეფექტის მქონე გენების სკრინინგი; ლეთალური აქტივობის მქონე ფრაგმენტების მომცველი რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების კონსტრუირება და ფაგოსპეციფიური გენების ექსპრესიის პირობებში რეციპიენტი უჯრედებზე რეკომბინანტული ცილის ბაქტერიოციდული მოქმედების ეფექტის და მექანიზმის შესწავლა. დადებითი შედეგი კი, შესაძლოა განგვეხილა, როგორც პოტენციური საფუძველი ახალი კლასის ანტიბაქტერიული საშუალებების შემუშავებისათვის.

ვირულენტული სტაფილოკოკური Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ანალიზის მიხედვით, ფაგის გამიფრულ გენომში განსაზღვრულ იქნა ღია წაკითხვის ჩარჩოების, ადრეული პრომოტორების, ტრანსკრიფციის ტერმინატორების რაოდენობა და ლოკალიზაცია. შესწავლილ იქნა, Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში შერჩეული ერთი ადრეული პრომოტორით (P_{E19}) ინიცირებული ოთხი [113, 114, 115, 116] გენით კოდირებული ცილის ბაქტერიოციდული ეფექტი, რისთვისაც pPW19-*E.coli* DH5 ვექტორულ სისტემაში კონსტრუირებული იქნა რეკომბინანტული პლაზმიდები, როგორც ფაგის ინდივიდუალური, ასევე ორი და ოთხი გენის მომცველი ფრაგმენტით. რეკომბინანტული პლაზმიდების ტრანსფორმაციის მეშვეობით მიღებულია რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონები, პლაზმიდაში ჩასმული ფაგის დნმ-ის ფრაგმენტის ორივე ორიენტაციით (5'-3' და 3'-5' მიმართულებით).

კლონირებული გენის ექსპრესიის პირობებში Sb-1 ბაქტერიოფაგის ადრეული გენების მომცველი რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონები: *E. coli* DH5(pPS1), *E. coli* DH5(pPS2), *E. coli* DH5(pPS3) და *E. coli* DH5(pPS9) იწვევენ რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედების ზრდის მკვეთრ შეფერხებას; რომელთაგანაც ორი [113, 116] და ოთხი [113, 114, 115, 116] ფაგოსპეციფიური გენის მომცველი რეკომბინანტების: *E. coli* DH5(pPS1) და *E. coli* DH5(pPS2) ბაქტერიოციდული აქტივობა 100%-ია; ხოლო ფაგის ინდივიდუალური გენების მომცველი რეკომბინანტული კლონები: *E. coli* DH5(pPS3) და *E. coli* DH5(pPS9) ავლენენ 98-99% ლეთალურ ეფექტს *E. coli* უჯრედების მიმართ.

ფაგოსპეციფიური ცილის უჯრედული სამიზნეების განსაზღვრით ნაჩვენებია, რომ Sb-1 ბაქტერიოფაგის კლონირებული ორი ადრეული გენის (113 და 116)

ექსპრესიის შედეგად სინთეზირებული რეკომბინანტული ცილები იწვევენ რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედების მეტაბოლიზმის დათრგუნვას უჯრედული ცილების სინთეზის დაბლოკვით.

რეკომბინანტული კლონების მაღალი ბაქტერიოციდული აქტივობა, რომელიც გამოვლინდა რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედების მიმართ რეალურ საფუძველს იძლევა ახალი ანტიბაქტერიული საშუალებების შემუშავებისა და განვითარებისათვის.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: ფაგოსპეციფიური გენები, რეკომბინანტული კლონები, ლეთალური აქტივობა, გენის ექსპრესია, ადრეული გენები, ციტოტოქსიური ეფექტი.

Abstract

Multidrug-resistance of bacterial pathogens is a major concern worldwide. Application of new generation antibiotics substantially increased rapid spread of multi-resistant bacterial strains in the environment. Antibiotic resistance of *S. aureus* became a global problem and there is an urgent need for development of new antibiotics. Phage therapy is one of the alternative approach against bacterial infections.

The object of our investigation is a virulent *staphylococcal* bacteriophage Sb-1. This phage has long been an important component of phage preparations that are effective for treatment of various *S. aureus* infections, including Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus (MRSA). As a typical lytic bacteriophage, of the family of SPO1-related bacteriophage, called the *Spounavirinae*; Sb-1 is expected to encode a variety of proteins whose activities are bactericidal because they target essential bacterial functions. Analysis of such bactericidal activities can potentially provide the basis for development of new antibiotics.

The goal of this research was screening of phage-specific lethal genes in Sb-1 phage genome, which encodes synthesis of host lethal proteins; construction of phage-specific recombinant clones and identification of the mechanisms by which this highly virulent Sb-1 phage inhibits host bacterial metabolism.

According to the analyses, in the Sb-1 phage genome have been described open reading frames, early promoters, Transcription terminators and their positions. In current study, we identify four Sb-1 phage specific genes (113, 114, 115, 116), transcripts from the same early promoter (P_{E19}). Constructed recombinant plasmids with each phage gene separately, as well as two genes (113, 114) together, and all four genes together were cloned into plasmid pPW19 and transformed in *E. coli* strain DH5, under control of the IPTG-inducible promoter.

We studied biological activity of recombinant bacterial clones, particularly their inhibitory activity against host bacterial cells. Recombinant bacterial clones with Sb-1 phagespecific two and four early genes: *E.coli* DH5(pPS1) and *E.coli* DH5(pPS2) reveal 100%

inhibitory activity towards host cells after phagespecific gene expression. Clones with single genes: *E.coli* DH5(pPS3) and *E.coli* DH5(pPS9) revealed inhibition of bacterial growth 98-99%, respectively.

We tested the effect of expression of cloned genes on bacterial DNA, RNA, and protein synthesis. Recombinant bacterial clones: *E.coli* DH5(pPS1), *E.coli* DH5(pPS2), *E.coli* DH5(pPS3) and *E.coli* DH5(pPS9) showed substantial inhibition of bacterial protein synthesis when expression of the cloned genes, suggesting that the cellular target of the gene products in this operon is probably some component(s) of the bacterial protein synthesis machinery.

Bacteriophage genes offer a potential resource for development of new antibiotics. In this study we identify 2 genes of *S. aureus* phage Sb-1 that have bactericidal activity when expressed in *E. coli*. Since the natural host is gram-positive, and *E. coli* is gram-negative, it is likely that most bacterial pathogens would be susceptible to each of these bactericidal activities, which therefore might serve as the basis for development of new wide-spectrum antibiotics.

Key words: Phage specific genes, recombinant clones, lethal activity, early genes, phage encoded inhibitory activity, recombinant protein.

მადლობა



ნაშრომის ძირითადი ნაწილი შესრულებულია გ.ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორიაში.

სასიამოვნო მოვალეობად ვთვლი, განსაკუთრებული მადლობა გადავუხადო აღნიშნული ლაბორატორიის ხელმძღვანელს, ბიოლოგიურ მეცნიერებათა დოქტორს, ქალბატონ მზია ქუთათელაძეს, რომლის უშუალო სამეცნიერო ხელმძღვანელობით შესაძლებელი გახდა წინამდებარე კვლევის შესრულება.



მადლობას ვუხდით ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის, მეცნიერებათა და ხელოვნების ფაკულტეტის პროფესორს, განსაკუთრებულად სამეცნიერო ხელმძღვანელს, პროფესორ, ქალბატონ ლალი შანშიაშვილს სადოქტორო ნაშრომის შესრულების დროს მოცემული რჩევებისათვის.



მადლობას ვუხდით, ტეხასის უნივერსიტეტის (Rice University), ბიოქიმიისა და უჯრედული ბიოლოგიის დეპარტამენტის ხელმძღვანელს, პროფესორ, ბატონ ჩარლზ სტიუარტს, მასზედ, რომ საშუალება მოგვცა მისი პირადი ხელმძღვანელობით კვლევის დიდი ნაწილი შეგვესრულებინა აღნიშნულ ლაბორატორიაში.

გულითად მადლობას ვუხდით გ.ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორიის თითოეულ წევრს ჩემი და ჩემი კვლევების მიმართ გამოჩენილი მუდმივი ყურადღებისა და მხარდაჭერისათვის.



კვლევა შესრულდა BTEP 20/ISTC G595 გრანტის ფარგლებში

სარჩევი

აბსტრაქტი.....	ii
Abstract.....	v
მადლობა	vii
სარჩევი	viii
ცხრილების ჩამონათვალი	xi
სურათების ჩამონათვალი.....	xii
გრაფიკების ჩამონათვალი	xiv
აბრევიატურების ჩამონათვალი.....	xv
შესავალი.....	1
ლიტერატურის მიმოხილვა.....	7
თავი 1. ბაქტერიოფაგები.....	7
1.1 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია და ფილოგენეზი.....	7
1.2 ბაქტერიოფაგების ევოლუციური განვითარების განხილვა გენომის დონეზე.....	13
თავი 2. ბაქტერიოფაგების გენომი და პროტეომი	16
2.1 სტაფილოკოკური ფაგების შედარებითი დახასიათება გენომის ზომის მიხედვით.....	17
2.2 SPO1-მსგავსი მიოვირუსების ბიოლოგიური და მოლეკულური მახასიათებლები	26
თავი 3. ბაქტერიული ვირუსების ენდოლიზინები.....	33
3.1 ფერმენტის სტრუქტურა, ფუნქცია და მოქმედების მექანიზმი.....	35
3.2 ლიზინები, როგორც ანტიბაქტერიული აგენტები.....	39
მეთოდოლოგია	47
თავი 1. კვლევებში გამოყენებული მასალები	47
თავი 2. ბაქტერიოფაგის გამრავლება, კონცენტრირება, გაწმენდა	49
2.1 Sb-1 ბაქტერიოფაგის ბიოლოგიური თვისებების განსაზღვრა.....	49
2.2 Sb-1 ბაქტერიოფაგის გამრავლება და კონცენტრირება	49
თავი 3. ბაქტერიოფაგების გენომის კვლევა.....	50
3.1 ბაქტერიოფაგის დნმ-ის გამოყოფა.....	50

3.2 პლაზმიდური დნმ-ის გამოყოფა.....	51
3.3 დნმ-ის დამუშავება რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით.....	52
3.4 ჰორიზონტალური გელ-ელექტროფორეზი.....	52
3.5 ოლიგონუკლეოტიდების (პრაიმერების) დიზაინი	53
3.6 პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია.....	54
თავი 4. Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ფრაგმენტების კლონირება და რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების მიღება.....	55
4.1 pPW19 პლაზმიდა - როგორც ვექტორული სისტემა	55
4.2 კლონირებისათვის გამოყენებული ბაქტერიების კულტივირება.....	57
4.3 ფაგის გენომის პირობით-ლეთალური გენების კლონირება pPW19 ვექტორულ სისტემაში და რეკომბინანტული პლაზმიდების ტრანსფორმაცია E.coli DH5 უჯრედებში.....	57
4.4 რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებში Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ფრაგმენტების იდენტიფიკაცია.....	60
თავი 5. რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების ციტოტოქსიური ეფექტის შესწავლა.....	62
5.1 ფაგის გენომის კლონირებული ფრაგმენტების შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდების ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლა მყარ და თხევად არეზე.....	62
5.2 რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებში უჯრედული ცილების, დნმ-ისა და რნმ-ის სინთეზის სიხშირის განსაზღვრა რადიოაქტიული იზოტოპებით მონიშვნის მეთოდით.....	63
შედეგები	66
თავი 1. სტაფილოკოკური Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის დასახასიათება.....	66
1.1 ღია წაკითხვის ჩარჩოების (ORF) იდენტიფიკაცია	66
1.2 ადრეული პრომოტორების და ტრანსკრიფციის ტერმინაციის კოდონების იდენტიფიკაცია	67
თავი 2. Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში ფაგოსპეციფიური პირობით-ლეთალური გენების იდენტიფიცირება და რეკომბინანტული პლაზმიდების შემცველი ბაქტერიული კლონების დიზაინი	70
2.1 ადრეული პრომოტორით ინიცირებული გენების იდენტიფიცირება.....	70

2.2	ოლიგონუკლეოტიდების დიზაინი.....	71
2.3	პირობით-ლეთალური გენების ამპლიფიკაცია (პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია).....	74
2.4	ფაგის გენომის პირობით-ლეთალური გენების კლონირება pPW19 ვექტორულ სისტემაში და ტრანსფორმაცია E.coli DH5 უჯრედებში (რეკომბინანტული პლაზმიდების შემცველი ბაქტერიული კლონების მიღება).....	77
2.5	რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებში Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ფრაგმენტების იდენტიფიკაცია.....	81
თავი 3.	რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლა.....	94
3.1	რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების ბაქტერიოციდული აქტივობის განსაზღვრა მყარ არეზე.....	94
3.2	რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების ბაქტერიოციდული აქტივობის განსაზღვრა თხევად არეში	95
თავი 4.	რეკომბინანტულ კლონებში ფაგოსპეციფიური ცილის უჯრედული სამიზნეების (დნმ, რნმ, ცილები) განსაზღვრა რადიოაქტიული იზოტოპების გამოყენებით.....	101
4.1.	რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებში უჯრედული დნმ-ის და რნმ-ის სინთეზირების სიხშირის განსაზღვრა $[^3H]$ - თიმიდინით და $5[^3H]$ - ურიდინით.....	101
4.2	რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებში უჯრედული ცილების სინთეზირების სიხშირის განსაზღვრა $[^3H]$ -ლეიცინით.....	104
	შედეგების განხილვა.....	110
	დასკვნები.....	124
	გამოყენებული ლიტერატურა.....	126
	პუბლიკაციები.....	143

ცხრილების ჩამონათვალი

ცხრილი 1: ბაქტერიოფაგების ძირითადი ჯგუფები - ვირუსების ტაქსონომიის საერთაშორისო კომიტეტის კლასიფიკაციის მიხედვით	9
ცხრილი 2: 27 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის გენომის მონაცემები	20
ცხრილი 3: სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგების გენომების შედარებითი ანალიზი ბიოტექნოლოგიური ინფორმაციის ნაციონალური ცენტრის (NCBI) მონაცემთა ბაზის მიხედვით	24
ცხრილი 4: C4 სინთეზური არის ამინომჟავების ჯგუფები	48
ცხრილი 5: ტრანსკრიფციის ტერმინაციის კოდონები Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში	68
ცხრილი 6: Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომი (orf-ღია წაკითხვის ჩარჩო; T-ტრანსკრიფციის ტერმინატორი; PE- ადრეული პრომოტორი)	69
ცხრილი 7: PE ₁₉ ადრეული ოპერონით ინიცირებული გენები	70
ცხრილი 8: Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის კლონირებისათვის შერჩეული ფრაგმენტები	72
ცხრილი 9: ოლიგონუკლეოტიდების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა	73
ცხრილი 10: პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციის სარეაქციო პირობები	74
ცხრილი 11: რეკომბინანტული პლაზმიდის დნმ-ის რესტრიქციის შედეგად მოსალოდნელი ფრაგმენტების ზომები	82
ცხრილი 12: რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონები	91
ცხრილი 13: Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ფრაგმენტების შემცველი რეკომბინანტული კლონების ბაქტერიოციდული აქტივობა	95
ცხრილი 14: Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის PE ₁₉ ადრეული პრომოტორით ინიცირებული გენებით კოდირებული ცილები	122

სურათების ჩამონათვალი

სურათი 1: pPW19 პლაზმიდა ვექტორის სქემატური გამოსახულება	56
სურათი 2: სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი Sb-1	66
სურათი 3: ადრეული პრომოტორი P _{E19} -ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა ...	71
სურათი 4: Sb-1 ბაქტერიოფაგის ინდივიდუალური გენების PCR ამპლიკონები ..	75
სურათი 5: Sb-1 ბაქტერიოფაგის ორი და ოთხი გენის მომცველი PCR ამპლიკონები	76
სურათი 6: pPW19 პლაზმიდაში Sb-1 ფაგის ინდივიდუალური გენების 113 და114-ის მომცველი ფრაგმენტების ლიგირების მონიტორინგი	78
სურათი 7: pPW19 პლაზმიდაში Sb-1 ფაგის ინდივიდუალური გენების 115 და116-ის მომცველი ფრაგმენტების ლიგირების მონიტორინგი	79
სურათი 8: pPW19 პლაზმიდაში Sb-1 ფაგის ორი (113, 114) და ოთხი გენის (113, 114, 115, 116) მომცველი ფრაგმენტების ლიგირების მონიტორინგი	80
სურათი 9: გენი 113-ის შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი Hind III ენდონუკლეაზით	83
სურათი 10: <i>E. coli</i> DH5 (pPS3) და <i>coli</i> DH5 (pPS4) რეკომბინანტული პლაზმიდების სქემატური გამოსახულება.....	84
სურათი 11: ორი გენის (113-114) შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი Hind III ენდონუკლეაზით	86
სურათი 12: ორი გენის (113-114) შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი სამი ენდონუკლეაზით	86
სურათი 13: <i>E. coli</i> DH5 (pPS1) რეკომბინანტული პლაზმიდის სქემატური გამოსახულება	86
სურათი 14: ოთხი გენის (113-114) შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი Hind III ენდონუკლეაზით	87
სურათი 15: <i>E. coli</i> DH5 (pPS2) რეკომბინანტული პლაზმიდის სქემატური გამოსახულება	88

სურათი 16: გენი 114-ის შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი EcoR V ენდონუკლეაზით	89
სურათი 17: გენი 115-ის შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი EcoR V ენდონუკლეაზით	90
სურათი 18: გენი 116-ის შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი Kpn I ენდონუკლეაზით	91
სურათი 19: რეკომბინანტული პლაზმიდის სეკვენირების დიაგრამა	93

გრაფიკების ჩამონათვალი

გრაფიკი 1: <i>E. coli</i> DH5(pPS3) რეკომბინანტული კლონის ბაქტერიოციდული აქტივობა თხევად არეში	97
გრაფიკი 2: <i>E. coli</i> DH5(pPS4) რეკომბინანტული კლონის ბაქტერიოციდული აქტივობა თხევად არეში	98
გრაფიკი 3: <i>E. coli</i> DH5(pPS9) რეკომბინანტული კლონის ბაქტერიოციდული აქტივობა თხევად არეში	99
გრაფიკი 4: <i>E. coli</i> DH5(pPS10) რეკომბინანტული კლონის ბაქტერიოციდული აქტივობა თხევად არეში	99
გრაფიკი 5: <i>E. coli</i> DH5(pPS1) რეკომბინანტული კლონის ბაქტერიოციდული აქტივობა თხევად არეში	100
გრაფიკი 6: <i>E. coli</i> DH5(pPS2) რეკომბინანტული კლონის ბაქტერიოციდული აქტივობა თხევად არეში	100
გრაფიკი 7: რეკომბინანტული კლონების კლონირებული გენის ექსპრესიის გავლენა <i>E. coli</i> უჯრედებში დნმ-ის სინთეზზე	103
გრაფიკი 8: რეკომბინანტული კლონების კლონირებული გენის ექსპრესიის გავლენა <i>E. coli</i> უჯრედებში რნმ-ის სინთეზზე	104
გრაფიკი 9: DH5(pPS1) კლონის ფაგის გენის ექსპრესიის გავლენა ცილების სინთეზის სიხშირეზე <i>E. coli</i> -ს უჯრედებში	105
გრაფიკი 10: DH5(pPS2) კლონის ფაგის გენის ექსპრესიის გავლენა ცილების სინთეზის სიხშირეზე <i>E. coli</i> -ს უჯრედებში	105
გრაფიკი 11: DH5(pPS3) კლონის ფაგის გენის ექსპრესიის გავლენა ცილების სინთეზის სიხშირეზე <i>E. coli</i> -ს უჯრედებში	106
გრაფიკი 12: DH5(pPS4) კლონის ფაგის გენის ექსპრესიის გავლენა ცილების სინთეზის სიხშირეზე <i>E. coli</i> -ს უჯრედებში	107
გრაფიკი 13: DH5(pPS9) კლონის ფაგის გენის ექსპრესიის გავლენა ცილების სინთეზის სიხშირეზე <i>E. coli</i> -ს უჯრედებში	108
გრაფიკი 14: DH5(pPS10) კლონის ფაგის გენის ექსპრესიის გავლენა ცილების სინთეზის სიხშირეზე <i>E. coli</i> -ს უჯრედებში	108

აბრევიატურების ჩამონათვალი

- ICTV**, ვირუსების ტაქსონომიის საერთაშორისო კომიტეტი (International Committee on Taxonomy of Viruses);
- bp**, ნუკლეოტიდურ ფუძეთა წყვილი (base pair);
- Ci**, რადიოაქტივობის საზომი ერთეული (Curie)³;
- cpm**, რაოდენობა წუთში (count per minute);
- cfu/ml**, უჯრედების რაოდენობა მილილიტრში (Cell forming unit per ml);
- DNase**, დნმ-აზა;
- dsDNA**, ორჯაჭვიანი დნმ (double stranded DNA);
- EDTA**, ეთილენდიამინოტეტრაამარმჟავა (Ethylenediaminetetraacetic acid);
- Fp**, დაღმავალი 5'-3' პრაიმერი (Forward primer);
- IPTG**, იზოპროპილ-β-D-თიოგალაქტოპირანოზიდი (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside);
- kbp**, ათასი წყვილი ნუკლეოტიდი (Kilo base pair);
- NCBI**, ბიოტექნოლოგიური ინფორმაციის ნაციონალური ცენტრი (National center for Biotechnology information);
- ORF**, ღია წაკითხვის ჩარჩო - გენი (ღწჩ) (Open reading frame);
- PCR**, პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია (Polymerase Chain Reaction);
- pfu/ml**, ფაგური ნაწილაკის რაოდენობა მილილიტრში (Particle forming unit per ml);
- P_E**, ადრეული პრომოტორი (early promoter);
- Rp**, აღმავალი 3'-5' პრაიმერი (Revers primer);
- RNase**, რნმ-აზა;
- SM**, სპიზინის არე (Spizizen salts medium);
- SNPs**, თითოეული ნუკლეოტიდის პოლიმორფიზმი (Single nucleotide polymorphism);
- ssDNA**, ერთჯაჭვიანი დნმ (single stranded DNA);
- TSA**, ტრიპტიკაზა სოიოს აგარი (Trypticase Soy Agar);
- TC-plates**, ქლორამფენიკოლის შემცველი ტრიპტიკაზა სოიოს აგარიანი ფინჯნები, (Trypticase Soy Agar with Choramphenicol);

TCI-plates, ქლორამფენიკოლისა და იზოპროპილ- β -D-თიოგალაქტოპირანოზიდის
შემცველი ტრიპტიკაზა სოოს აგარიანი ფინჯნები (Trypticase Soy Agar with
Choramphenicol and IPTG);

TBE, ტრისი-ბორის მჟავა-ეთილენდიამინოტეტრამმარმჟავა, (Tris-base, Boric acid,
EDTA)

შესავალი

მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის სტატისტიკური მონაცემების მიხედვით დღეისათვის ანტიბიოტიკორეზისტენტობა წარმოადგენს სერიოზულ საფრთხეს ადამიანის ჯანმრთელობისათვის. ინფექციური დაავადებების გამომწვევთა შორის განსაკუთრებული ადგილი უკავიათ სტაფილოკოკურ შტამებს. მათ შორის *Staphylococcus aureus* წარმოადგენს ძირითად ნოზოკომიალურ პათოგენს, რომელიც იწვევს სხვადასხვა სახის მძიმე ინფექციურ დაავადებას.

მსოფლიოში რეგისტრირებული სტაფილოკოკური ინფექციების რიცხვი დღესაც მატულობს, რაც ძირითადად განპირობებულია ანტიბიოტიკორეზისტენტული შტამების რაოდენობის ზრდით და სწრაფი გავრცელებით.

ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიული შტამების გლობალურად გავრცელებამ და თანამედროვე ანტიბაქტერიული საშუალებებით მასთან ბრძოლის სირთულემ განაახლა ინტერესი ფაგოთერაპიის მიმართ.

ბაქტერიოფაგების თერაპიული თვალსაზრისით გამოყენებას ხანგრძლივი ისტორია გააჩნია. მრავალი წელია ფაგური პრეპარატები წარმატებულად გამოიყენება სხვადასხვა მიკროორგანიზმით გამოწვეული ინფექციური დაავადებების პროფილაქტიკისა და მკურნალობისათვის.

დღეისათვის, ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიული შტამების მზარდი გავრცელების გამო, სპეციფიური, ფართო სპექტრის მქონე ვირულენტული ბაქტერიოფაგების სამკურნალო მიზნით გამოყენება განსაკუთრებულ აქტუალობას იძენს. აქედან გამომდინარე, მნიშვნელოვანია აღნიშნული ფაგების ბიო-სამედიცინო კუთხით შესწავლა.

თანამედროვე კვლევების თანახმად, ფაგური პრეპარატები და ფაგოსპეციფიური ცილები, წარმოადგენენ ერთერთ ალტერნატიულ და პერსპექტიულ ანტიბაქტერიულ საშუალებებს, რომელთაც გარკვეული უპირატესობა აქვთ ანტიბიოტიკებთან შედარებით. ფაგის - ბაქტერიული ვირუსის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი უპირატესობა თვით-რეპლიკაციისა და თვით-ელიმინაციის უნარია. ბაქტერიოფაგის სამიზნეს ადამიანის ორგანიზმში წარმოადგენს სპეციფიური

პათოგენური ბაქტერია, რომელსაც ვირულენტური ფაგი ანადგურებს, ხოლო ბაქტერიის არარსებობის შემთხვევაში ფაგები თავადვე ელიმინირდებიან ორგანიზმიდან. აღნიშნულ ორივე შემთხვევაში შენარჩუნებულია ნორმალური მიკროფლორის ბალანსი.

თერაპიული პრეპარატების შექმნისათვის, მათი ხარისხისა და ეფექტურობის გასაზრდელად მნიშვნელოვანია ბაქტერიული ვირუსების მოლეკულურ დონეზე დახასიათება. სამკურნალო-პროფილაქტიკური მიზნით ბაქტერიოფაგების გამოყენების ერთ-ერთ ძირითად პირობას წარმოადგენს ფაგი-ბაქტერიის ურთიერთქმედების მექანიზმების დადგენა. ფაგური ინფექცია გახლავთ მაღალორგანიზებული პროცესი, რომლის განხორციელებაში მონაწილეობას ღებულობენ როგორც ბაქტერიული, ასევე ფაგოსპეციფიური ფერმენტები.

აღსანიშნავია Sb-1 ფაგისა და მისი მსგავსი სტაფილოკოკური დიდი გენომის მქონე მიოვირუსები, რომელთა გენომის მოდულარული სტრუქტურა შესწავლილია და ნაჩვენებია თერაპიაში მათი გამოყენების საიმედო პოტენციალი. მოვიყვანთ მხოლოდ რამოდენიმე მაგალითს: შესწავლილია სტაფილოკოკური ფაგი K-ს ბიოფილმებზე ეფექტური მოქმედება, რაც გამოიხატება მათი წარმოქმნის პრევენციით ან დაშლით [77]; ნაჩვენებია კისტოზური ფიბროზით დაავადებულ პაციენტებში სტაფილოკოკური კოლონიზაციის წინააღმდეგ Sb-1 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის წარმატებული გამოყენება [87]; შესწავლილია, ISP სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის ეფექტური გამოყენება დამწვრობების წინააღმდეგ [116, 159].

ლითიური ბაქტერიოფაგის გენომი აკოდირებს მრავალ გენს, რომელთა პროდუქტები ტოქსიურია ბაქტერიული უჯრედების სასიცოცხლო კომპონენტების მიმართ. ფაგოსპეციფიური ცილებით ბაქტერიული უჯრედების მეტაბოლიზმის დაბლოკვა წარმოაჩენს მათ, როგორც ახალი კლასის ანტიბაქტერიულ აგენტებს მაღალი სამიზნე სპეციფიურობით.

ვირულენტული ფაგების გამრავლების პროცესში განსაკუთრებით აღსანიშნავია ფაგის გენომით კოდირებული ნუკლეოზური ფერმენტები (ცილები), რომლებიც ცნობილია, როგორც ლიზინები ან ენდოლიზინები. ისინი ხასიათდებიან ბაქტერიული უჯრედის პეპტიდოგლიკანის შრის ან ნუკლეინის მჟავას სწრაფად

დახლეჩვის უნარით. ლითიური ფაგის გენომით კოდირებულ ერთერთ უმნიშვნელოვანეს ციტოტოქსიურ ცილას წარმოადგენს ჰოლინი.

ფაგოსპეციფიური ფერმენტების ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა და უჯრედზე მათი მოქმედების მოლეკულური მექანიზმების დადგენა ქმნის რეალურ საფუძველს ახალი კლასის ანტიბაქტერიული პრეპარატების შესაქმნელად. ამ მიმართულებით ჩატარებული სამეცნიერო კვლევა მეტად აქტუალურია ახალი თაობის ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული ბაქტერიების გლობალური გავრცელების პირობებში.

თანამედროვე კვლევების მიხედვით დადგენილია, რომ რეციპიენტ ბაქტერიულ უჯრედებში ფაგოსპეციფიური გენების ექსპრესია უჯრედის მიმართ ავლენს ბაქტერიოციდულ ეფექტს. ყველა ასეთი ფაგოსპეციფიური გენის პროდუქტი შესაძლოა განხილული იქნას, როგორც ახალი ანტიბიოტიკის მოქმედების მექანიზმის პოტენციური საფუძველი.

მიუხედავად იმისა, რომ მრავალი ფაგოსპეციფიური ლითიური ენზიმი, როგორც ანტიბაქტერიული საშუალება, უკვე წარმატებულად იქნა გამოყენებული, ჯერ კიდევ შეუსწავლელია მრავალი ფაგოსპეციფიური გენის ციტოტოქსიური მოქმედების მექანიზმი.

კვლევის ობიექტი - ლითიური ბაქტერიოფაგი Sb-1, Twort-მსგავსი ვირუსების გვარის, SPO1-მონათესავე ფაგების *Spounavirinae* ქვეოჯახის კლასიკური წარმომადგენელია. Sb-1 ფაგის გენომის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა - HQ163896 საიდენტიფიკაციო ნომრით, განთავსებულია გენომის საერთაშორისო მონაცემთა ბაზაში. სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი Sb-1 ისტორიულად წარმოადგენდა პოლივალენტური თერაპიული პრეპარატის მნიშვნელოვან კომპონენტს, რომელიც წარმატებულად გამოიყენებოდა *S.aureus*-ით გამოწვეული ინფექციების წინააღმდეგ, მათ შორის მეტიცილინ-რეზისტენტული სტაფილოკოკური ინფექციების წინააღმდეგ.

წინამდებარე ნაშრომის კვლევის მიზანს წარმოადგენდა სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი Sb-1-ის გენომში ლეთალური ეფექტის მქონე გენების სკრინინგი და ფაგოსპეციფიური გენების ექსპრესიის პირობებში რეციპიენტ უჯრედებზე რეკომბინანტული ცილის ბაქტერიოციდული მოქმედების ეფექტის და მექანიზმის

შესწავლა. აღნიშნული კვლევების დადებითი შედეგი კი, შესაძლოა განგვეხილა, როგორც პოტენციური საფუძველი ახალი კლასის ანტიბაქტერიული საშუალებების შემუშავებისათვის.

დასახული მიზნის ფარგლებში დასმული იქნა კონკრეტული ამოცანები:

1. Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობაში (127,188 ნწ) ღია წაკითხვის ჩარჩოების (ლწჩ-ORF) საერთო რაოდენობის განსაზღვრა, ადრეული გენების ფუნქციის მარეგულირებელი, ადრეული პრომოტორების და ტრანსკრიფციის ტერმინატორების რაოდენობის და ლოკალიზაციის განსაზღვრა;
2. Sb-1 ფაგის გენომში ბაქტერიული უჯრედების მეტაბოლიზმის დამთრგუნველი ცილების მაკოდირებელი, ფაგოსპეციფიური პირობით-ლეთალური ადრეული გენების სკრინინგი;
3. Sb-1 ფაგის გენომის ფაგოსპეციფიური პირობით-ლეთალური ადრეული გენის/ან გენების მომცველი ფრაგმენტების კლონირება/ტრანსფორმაცია pPW19-*E.coli* DH5 ვექტორულ სისტემაში;
4. რეკომბინანტულ პლაზმიდებში ჩასმული ფაგოსპეციფიური, ადრეული გენის/ან გენების მომცველი ფრაგმენტების ორიენტაციის განსაზღვრა;
5. რეკომბინანტულ ბაქტერიულ შტამებში, კლონირებული Sb-1 ფაგის ადრეული ლეთალური გენის ექსპრესიით გამოწვეული ციტოტოქსიური ეფექტის შესწავლა;
6. რეციპიენტ ბაქტერიულ უჯრედებში ფაგოსპეციფიური რეკომბინანტული ცილის უჯრედული სამიზნეების (დნმ, რნმ, ცილები) იდენტიფიცირება;

ნაშრომის სამეცნიერო სიახლე და პრაქტიკული ღირებულება

დიდი მნიშვნელობა ენიჭება Sb-1 ფაგის, როგორც ეფექტური სამკურნალო საშუალების დეტალურ შესწავლას, კერძოდ იმ მექანიზმების კვლევას, რომლებიც იწვევენ პატრონი სტაფილოკოკური ბაქტერიების დათრგუნვას.

ვირულენტული სტაფილოკოკური Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში ჩვენს მიერ პირველად იქნა განსაზღვრული ღია წაკითხვის ჩარჩოების, ადრეული პრომოტორების, ტრანსკრიფციის ტერმინატორების რაოდენობა და ლოკალიზაცია;

Sb-1 ბაქტერიოფაგის დნმ-ის ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობაში მიზანმიმართულად მოხდა ფაგოსპეციფიური პირობით-ლეთალური ადრეული გენების სკრინინგი. შესაბამისად, შესწავლილი იქნა ერთი ადრეული პრომოტორით (PE19) ინიცირებული ოთხი გენით კოდირებული ცილის ბაქტერიოციდული ეფექტი, რისთვისაც კონტრუირებული იქნა რეკომბინანტული პლაზმიდები. რეკომბინანტული პლაზმიდებით მიღებულია რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონები, პლაზმიდაში ჩასმული ფაგის დნმ-ის ფრაგმენტის ორივე ორიენტაციით (5'-3' და 3'-5' მიმართულებით).

დადგენილია, რომ Sb-1 ბაქტერიოფაგის კლონირებული ფაგოსპეციფიური გენით/ან გენებით კოდირებული ცილები ავლენენ რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედების ზრდის პრაქტიკულად 100%-ით ინჰიბირებას;

განსაზღვრულია ფაგოსპეციფიური ცილის უჯრედული სამიზნეები, ანუ მოქმედების ის მექანიზმები, რის ხარჯზეც ხდება რეკომბინანტული ბაქტერიული უჯრედების მეტაბოლიზმის დათრგუნვა. დადასტურებულია, რომ Sb-1 ფაგის კლონირებული გენების ექსპრესია იწვევს რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედების მეტაბოლიზმის დათრგუნვას უჯრედული ცილების სინთეზირების დაბლოკვით.

წარმოდგენილი კვლევის შედეგებს აქვთ როგორც თეორიული, ისე პრაქტიკული მნიშვნელობა. ცნობილია, რომ მრავალი ფაგოსპეციფიური ლითიური ენზიმი (ლიზინი) უკვე წარმატებულად იქნა გამოყენებული, როგორც ანტიბაქტერიული საშუალება. რეკომბინანტული ფაგოსპეციფიური ცილის ციტოტოქსიური ეფექტი, რომელიც გამოვლენილი იქნა Sb-1 ფაგის კლონირებული გენების ექსპრესიის პირობებში, შესაძლოა რეალურ საფუძველს წარმოადგენდეს ახალი ანტიბაქტერიული საშუალებების შემუშავებისა და განვითარებისათვის.

ლიტერატურის მიმოხილვა

თავი 1. ბაქტერიოფაგები

1.1 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია და ფილოგენეზი

ბაქტერიული ვირუსები ანუ ბაქტერიოფაგები ვირუსების ყველაზე ფართო ჯგუფს (1031) შეადგენენ ცოცხალ სამყაროში. მათი გავრცელების არეალი ფართოა: ჰაერი, ნიადაგი, წყალი, განსაკუთრებით ჩამდინარე წყლები. ასევე გვხვდება ადამიანისა და ცხოველების სხეულის სხვადასხვა ღრუებში და ნაწლავებში.

ბაქტერიული ვირუსები - ბაქტერიოფაგები მე-20 საუკუნის დასაწყისში აღმოჩენილი იქნა ორჯერ. პირველად, 1915 წელს ბრიტანელი მეცნიერის ფ. ტუორტის მიერ, ხოლო მეორედ, 1917 წელს კანადური წარმოშობის ფრანგი მეცნიერის ფ. დერელის მიერ (პასტერის ინსტიტუტი, პარიზი). თუმცა, მსგავსი - ბაქტერიების დამშლელი აქტივობის მქონე ბიოლოგიური ელემენტების მიმართ სხვა მეცნიერებმაც იჩენდნენ ინტერესს: 1869 წელს Hankin; 1895 წელს Kruse და Pansisni; 1897 წელს Emerich და Low. აღსანიშნავია, რომ ქართველმა მეცნიერმა გიორგი ელიავამ მდინარე მტკვრის წყალში ვიბრიონის აღმოჩენასთან ერთად აღწერა ბაქტერიოფაგის ფენომენი [24, 88].

ბაქტერიული ვირუსების შესწავლის ისტორია მჭიდროდ არის დაკავშირებული მათი სისტემატიკის შექმნის მცდელობასთან. ბაქტერიოფაგები ვირიონის მარტივი აგებულების გამო წარმოადგენენ უნიკალურ მოდელოვანი სისტემებს მოლეკულური ბიოლოგიის დარგში. მრავალი წლის განმავლობაში მეცნიერები ცდილობდნენ ფაგების კლასიფიკაციას სხვადასხვა ნიშნის მიხედვით.

ბაქტერიოფაგების პირველად კლასიფიკაციას, 1948 წელს, Holmes-ის მიერ საფუძვლად დაედო პატრონი ბაქტერიული უჯრედების წრე და მათ მიერ გამოწვეული დაავადებების სიმპტომები, მოგვიანებით კი ბაქტერიოფაგები

განალაგეს ჯგუფებში ფაგის ვირიონის მორფოლოგიური თვისებებისა და ნუკლეინის მჟავას ტიპის მიხედვით.




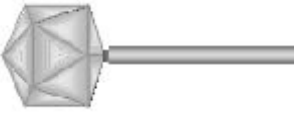











1967 წელს Bredley-მ შემოგვთავაზა ფაგების კლასიფიკაცია, სადაც ფაგები დაყო 6 ჯგუფად: ფაგები კუმშვადი წანაზარდით, მოკლე წანაზარდიანი ფაგები, კუბური ფორმის, ერთძაფიანი დნმ-ის შემცველი, რნმ-ის შემცველი და ძაფისებრი (ფილამენტური) ფაგები.

1983 წელს, Ackermann-მა ბაქტერიოფაგები განალაგა 190 ტაქსონომიურ ერთეულში, რომელიც მოიცავდა 2000 ფაგს [4, 7]. ეს კლასიფიკაცია არ იყო სრული, რადგან ცალკეული ფაგები თუ ფაგების ჯგუფები, მხოლოდ ძალიან მარტივი მახასიათებლის მიხედვით იქნა ჩათვლილი სახეობებად.

ბოლო წლებში დიდი ყურადღება ექცევა ბაქტერიოფაგების ულტრასტრუქტურის შესწავლას. ბაქტერიული ვირუსების სუბსტრუქტურის მორფოლოგიური თვისებებების გამოვლენა და იდენტიფიცირება საფუძვლად დაედო ბაქტერიოფაგების რამოდენიმე თანამედროვე კლასიფიკაციას.

1992 წელს ვირუსების ტაქსონომიის საერთაშორისო კომიტეტის (ICTV) მიერ მიღებულია ფაგების კლასიფიკაციის ახალი ვარიანტი. ამ სქემის მიხედვით, ბაქტერიოფაგები გაერთიანებულია *Caudovirales* კლასის 13 ოჯახში და 31 გვარში. კლასიფიკაციის მნიშვნელოვან კრიტერიუმს წარმოადგენს ნუკლეინის მჟავას ტიპი და მოლეკულური მასა; ვირიონის ულტრასტრუქტურა: ბინალური სიმეტრია (წანაზარდიანი), კუბური, ჰელიკალური (სპირალური), ფილამენტური ან პლეიომორფული; ანტიგენური თვისებები; პატრონი უჯრედების წრე და მოთხოვნები გამრავლების პირობების მიმართ.

ცხრილი 1. ბაქტერიოფაგების ძირითადი ჯგუფები - ვირუსების ტაქსონომიის საერთაშორისო კომიტეტის კლასიფიკაციის მიხედვით [48]

ოჯახი	გენომი	მასპინძელი	მორფოლოგია
<i>Corticoviridae</i>	ორჯაჭვიანი დნმ	ბაქტერია	
<i>Tectiviridae</i>	ორჯაჭვიანი დნმ	ბაქტერია	
<i>Podoviridae</i>	ორჯაჭვიანი დნმ	ბაქტერია	
<i>Myoviridae</i>	ორჯაჭვიანი დნმ	ბაქტერია არქეა	
<i>Siphoviridae</i>	ორჯაჭვიანი დნმ	ბაქტერია არქეა	
<i>Fuselloviridae</i>	ორჯაჭვიანი დნმ	არქეა	
<i>Guttaviridae</i>	ორჯაჭვიანი დნმ	არქეა	
<i>Salterprovirus</i>	ორჯაჭვიანი დნმ	არქეა	
<i>Lipothrixviridae</i>	ორჯაჭვიანი დნმ	არქეა	
<i>Rudiviridae</i>	ორჯაჭვიანი დნმ	არქეა	
<i>Plasmaviridae</i>	ორჯაჭვიანი დნმ	მიკოპლაზმა	
<i>Microviridae</i>	ერთჯაჭვიანი დნმ	ბაქტერია სპიროპლაზმა	
<i>Inoviridae</i>	ერთჯაჭვიანი დნმ	ბაქტერია მიკოპლაზმა	
<i>Cystoviridae</i>	ორჯაჭვიანი რნმ	ბაქტერია	
<i>Leviviridae</i>	ერთჯაჭვიანი რნმ	ბაქტერია	

1959 წლის შემდეგ, ელექტრონული მიკროსკოპით გამოკვლეული იქნა 5100 ბაქტერიოფაგი, საიდანაც 4950 (96%) მოდის წანაზარდიან ფაგებზე, ისინი მიეკუთვნებიან *Caudovirales* და მორფოლოგიური ნიშნების მიხედვით ერთიანდებიან სამ დიდ ფილოგენეტიკურად დაკავშირებულ ოჯახში [6, 88]:

1. *Myoviridae* – ფაგები გრძელი კუმშვადი წანაზარდით (წანაზარდიანი ფაგების 25%).
2. *Siphoviridae* – ფაგები გრძელი, მოქნილი კუდით, რომლის შალითას არ გააჩნია შეკუმშვის უნარი. ამოჯახში გაერთიანებულია კუდიანი ფაგების 61% [5, 88]. ტიპური წარმომადგენლებია: T1, T5, L5, λ ფაგები და სხვა. ოჯახი მოიცავს 6 გვარს.
3. *Podoviridae* - წანაზარდიანი ფაგების 14%-ს წარმოადგენენ, მათთვის დამახასიათებელია მოკლე კუდი. ტიპური წარმომადგენლები არიან: P22, T7 ფაგები და სხვა. ამ ოჯახში გაერთიანებულია 3 გვარი.

წანაზარდიან ფაგებს გააჩნიათ იკოსაედრის ან ოქტაედრის ფორმის თავი. წანაზარდიანი (კუდიანი) ფაგის კაფსიდი არის იკოსაედრა (ოც-წახნაგა) ან მისი დერივატი. ფაგი შედგება თავის, კუდის და ფაკულტატური სტრუქტურებისგან, როგორცაა თავის ან კუდის ფიბრილები, საყელო, ბაზალური ფირფიტა, ტერმინალური სპიკები. კაფსიდში სუპერსპირალურად მოთავსებულია ორმაფიანი დნმ. გენეტიკური რუქა კომპლექსურია. წანაზარდიანი ფაგები შეძლება იყოს როგორც ვირულენტური, ასევე ზომიერი. მათ 50%-ს ზომიერი ფაგები წარმოადგენენ [5, 7, 24,].

ამ სამი ოჯახიდან კაფსიდის ყველაზე დიდი ზომით და დნმ-ის მაღალი შემცველობით ხასიათდება *Myoviridae*, ხოლო *Podoviridae* და *Siphoviridae*, ამ მახასიათებლით ერთმანეთთან უფრო ახლო მსგავსებას ავლენენ [24].

ოჯახი *Myoviridae* წარმოდგენილია ფაგების მრავალფეროვანი ჯგუფით, რომლის ძირითადი მორფოლოგიური მახასიათებელია კუმშვადი წანაზარდი. აღნიშნული ოჯახის წარმომადგენლებს უნარი აქვთ დააინფიცირონ როგორც გრამ-დადებითი, ასევე გრამ-უარყოფითი ბაქტერიები და არქეაბაქტერიები. ვირუსების ტაქსონომიის საერთაშორისო კომიტეტის კლასიფიკაციის მიხედვით, წანაზარდიანი ფაგების სამივე ოჯახი აერთიანებს 15 გვარს, აქედან *Myoviridae*-ს ოჯახი დაყოფილია

შემდეგ გვარებად: T4-მსგავსი ვირუსები, P1-მსგავსი ვირუსები, P2-მსგავსი ვირუსები, Mu-მსგავსი ვირუსები, SPO1-მსგავსი ვირუსები, PBS1-მსგავსი ვირუსები, H-მსგავსი ვირუსები [7]. აღნიშნული გვარები მკვეთრად განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან სასიცოცხლო ციკლის და გენომის სტრუქტურით. მაგ.: P1 ჯგუფი ლიზოგენურ ფაგებს აერთიანებს, Mu- ტრანსპოზონებს წარმოადგენს და არ ექვემდებარება P2-ის მსგავსად საიტსპეციფიკურ რეკომბინაციებს, ხოლო T4 ლითიური ბაქტერიული ვირუსია. მათი გენომის ზომები ვარიირებს 30,000 ნწყ-დან 170,000 ნწყ-მდე. *Myoviridae*-ს ოჯახში ფაგები ძირითადად გაერთიანებულია მორფოლოგიური ნიშნების მიხედვით [161].

დღეისათვის ყველაზე სრულყოფილად შესწავლილია T4 ბაქტერიოფაგი, როგორც მოდელი *Myoviridae*-ს ოჯახისა. T4-ის მსგავსი ფაგებისათვის დამახასიათებელია წაგრძელებული იკოსაედრის ფორმის თავი (111-78 ნმ), კუშვადი წანაზარდი (113-16 ნმ), საყელო, ბაზალური ფირფიტა და წანაზარდის 6 გრზელი და მოკლე ფიბრილა. ვირიონის ამგვარი მორფოლოგია ახასიათებს დაახლოებით 150 ბაქტერიოფაგს. აღნიშნულ ფაგებს მნიშვნელოვანი ჰეტეროგენულობა ახასიათებთ, განსხვავდებიან სეროლოგიური თვისებებით, დნმ-ში ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობებით, წანაზარდის ფიბრილების შემადგენლობით. დნმ განლაგებულია ბაქტერიოფაგების თავში. ფაგის გენომის გენეტიკური რუკა საკმაოდ რთულია; T4 ფაგის გენომის ზომა შეესაბამება 166,8 ათას ნუკლეოტიდურ წყვილს და მოიცავს დაახლოებით 300 გენს. დღეისათვის დადგენილია რომ მხოლოდ 69 გენი წარმოადგენს არსებითი მნიშვნელობის გენს, ხოლო დაახლოებით 140 გენის სპეციფიური ფუნქციები დადგენილი არ არის.

ბაქტერიოფაგების ევოლუციის შესწავლისათვის მდიდარ და მრავაფეროვან მასალას წარმოადგენენ T4-ის მსგავსი ფაგები. T4-ის ტიპის ვირიონის მორფოლოგიის განსაკუთრებული სტაბილურობა მიუთითებს იმაზე, რომ ევოლუციის პროცესში ფაგის სტრუქტურული ცილების მაკოდირებელი გენების ძირითადი ლოკუსები მნიშვნელოვნად არ შეცვლილა. ამავე დროს, ცალკეული ვირუსული კომპონენტების მიერ სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვანი ფუნქციების შესრულებამ (ცილა-ცილა ურთიერთქმედება, კონფორმაციული ცვილილებები)

ფაგის მორფოგენეზში შესაძლებელია ხელი შეუწყოს ზოგიერთი სტრუქტურული გენის გენეტიკურ ლაბილურობას.

ცნობილია, რომ ფაგების გენომები მონაწილეობენ უჯრედული გენომების ცვლილებებთან დაკავშირებულ სხვადასხვა მექანიზმში, როგორცაა: წერტილოვანი მუტაციები, დელეცია, დუბლიკაცია, ინვერსია, ტრანსპოზიცია, ტრანსდუქცია, რეკომბინაცია. ეჭვგარეშეა, რომ ევოლუციური პროცესის განმავლობაში ხდებოდა ფაგების გენომების „განახლება“ (rearrangement) „ახალი“ გენებით. ასეთი რეკომბინაცია მოიცავდა ნორმალურ და დეფექტურ ფაგებს (გენთა ჰორიზონტალური გაცვლა), აგრეთვე, პლაზმიდებს, ტრანსპოზონებს და ზოგიერთი ეუკარიოტის გენომს. მაგალითად, დადგენილია რომ ბაქტერიული დნმ „გამოყენებულია“ ბევრი ფაგის ჩამოყალიბების პროცესში, რაც განსაკუთრებით აშკარაა ფაგების ისეთი გენებისათვის, რომლებიც აკოდირებენ დნმ ინვერტაზებს, მეთილაზებსა და ლიზოციმს. „უცხო“ წარმოშობა შეინიშნება მნიშვნელოვან ფაგურ ცილებში, რომელთაც გააჩნიათ თავისი ჰომოლოგიები ბაქტერიულ უჯრედებში. მაგალითად, ფაგის დნმ-პოლიმერაზა A და B-ს გააჩნია თავისი ექვივალენტები *E.coli*-ს გენომში [7, 14].

ევოლუციის პროცესში ბაქტერიოფაგების გენომები ჩამოყალიბდნენ სხვადასხვა ფორმით (ერთ-, ორმაფიანი რნმ და დნმ); მათ შეიძინეს გენები პატრონი უჯრედებიდან და განავითარეს ახალი უჯრედების ინფიცირებისა და ვირუსული გენომის პატრონი უჯრედებში რეპლიკაციის სხვადასხვა მოლეკულური მექანიზმი.

ვარაუდობენ, რომ ბაქტერიოფაგები წარმოშობის მიხედვით პოლიფილეტური ბუნებისაა, ანუ მათი წარმოქმნა მოხდა დროის სხვადასხვა მონაკვეთებში. ამას ადასტურებს განსხვავებები ფაგების სტრუქტურულ აგებულებასა და ფუნქციურ მექანიზმებში. ამავე დროს, სავარაუდოა, რომ წანაზარდიანი ფაგები ფილოგენეტიკურად მონათესავეა და ეს ჯგუფი დღეისათვის არსებულ სხვა ფაგებს შორის ყველაზე ხანდაზმულია. ასეთი ბაქტერიული ვირუსების არსებობა ეუბაქტერიებში, ციანობაქტერიებსა და არქეაქტერიებში მიუთითებს იმაზე, რომ ამ ფაგების წარმოშობა მოხდა მათი პატრონი ბაქტერიების დივერგენციამდე (დაახლოებით 3 მლდ. წლის წინ). ცნობილია, რომ ცხოველთა და მცენარეთა ვირუსები წარმოიქმნენ პრეკამბრიულ პერიოდში (დაახლოებით 657-700 მლნ. წლის

წინ). აქედან გამომდინარეობს, რომ წანაზარდიან ფაგებს უფრო დიდი დრო ჰქონდათ მრავალფეროვანი ვირიონების ჩამოყალიბებისათვის, ვიდრე ცხოველთა და მცენარეთა ვირუსებს [2, 161].

წანაზარდიანი ფაგების ზოგიერთი ცილის მსგავსი ცილები ნანახია ბაქტერიების, ეუკარიოტების ვირუსებსა და თვით ეუკარიოტების შემადგენლობაშიც კი. T4 ფაგის დნმ პოლიმერაზა, ტოპოიზომერაზა და ლიგაზა ეუკარიოტებსა და მათი ვირუსების შესაბამისი ცილების მსგავსია. საინტერესოა, რომ ხშირად სხვადასხვა წანაზარდიანი ფაგის ცილები ერთმანეთთან უფრო მცირე ჰომოლოგიას ამჟღავნებენ, ვიდრე მცენარეთა და ცხოველთა ვირუსების ანალოგიურ ცილებთან.

აღსანიშნავია, რომ T4 ფაგის გენომი მთლიანად სეკვენირებულია, გაშიფრულია ასევე *E.coli* ბაქტერიის გენომი. დადგინდა, რომ T4 ფაგის ზოგიერთი გენი ამჟღავნებს მნიშვნელოვან ჰომოლოგიას *E.coli*-ის გენებთან. აღმოჩნდა, რომ ფაგის 42 გენი ავლენს მნიშვნელოვან მსგავსებას გენების ბანკში (GenBank) არსებულ სხვა გენებთან. ამ ჰომოლოგიური გენებიდან 13, სავარაუდოდ წარმოადგენს ე.წ. „მბტუნავ“ გენებს. ისინი ამჟღავნებენ ჰომოლოგიას სხვადასხვა ნუკლეოზიდების მაკოდირებელ გენებთან, რომლებიც კარგად არის შესწავლილი სოკოების ინტრონულ გენებში. როგორც აღმოჩნდა ეს გენები T4 ფაგის გენომში დადგენილი არ არის.

1.2 ბაქტერიოფაგების ევოლუციური განვითარების განხილვა გენომის დონეზე

მოლეკულური ბიოლოგიის თანამედროვე მეთოდების საშუალებით შესაძლებელი გახდა ბაქტერიოფაგების გენომების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის განსაზღვრა, ფაგოსპეციფიური ცილების ამინომჟავური შედგენილობის დადგენა, მათი ნუკლეინის მჟავების რეპლიკაციის რეგულატორული მექანიზმების კვლევა. ცნობილი ბაქტერიული ვირუსის გენომების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მონაცემთა ბანკის შექმნამ შესაძლებელი გახდა ერთიდაიგივე ოჯახის ბაქტერიოფაგებსა და ასევე, ფაგებისა და უჯრედულ ელემენტებს შორის ნათესაობის დადგენა.

როგორც ყველა აღწერილ ბიოლოგიურ სისტემაში, ასევე ბაქტერიოფაგებში გენთა ჰორიზონტალური დრეიფი გავლენას ახდენს გენომის ევოლუციაზე [64]. ფაგების ტაქსონომია ამჟამად დაფუძნებულია ფაგების წანაზარდისა და კაფსიდის მორფოლოგიაზე, გენეტიკური მასალის (გენომის) ქიმიურ ტიპზე და ზოგიერთ ბიოლოგიურ მახასიათებელზე [5, 64]. თუმცადა, ფაგის მკვლევარებს საკამათოდ მიაჩნიათ, რომ ფაგის წანაზარდის მორფოლოგია იყოს პირდაპირი ტაქსონომიური კრიტერიუმი. მრავალი კვლევა იქნა ჩატარებული იმის დასადგენად, თუ როგორ უნდა იყოს ფაგების ტაქსონომია დაფუძნებული გენომის მონაცემებზე.

ერთნი აღწერდნენ ფაგის გენომის დაყოფას ინდივიდუალურ გენეტიკურ მოდულებად და კლასიფიკაცია ინდივიდუალური მოდულებისა მოხდებოდა მათ შორის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის შედარებითი ანალიზით (მსგავსებით) და აღიწერებოდა ფაგების სპეციფიური ალელების (გენთა კლასტერების) მიხედვით ყოველი ინდივიდუალური მოდულისათვის [95]. თუ განსხვავებული ალელების რაოდენობა მოდულის შიგნით იქნებოდა მაღალი, ხოლო ფაგის გენომის შემადგენელი მოდულების რიცხვი მნიშვნელოვანი, მაშინ ტაქსონომიის მისტემა სწრაფადვე ხდებოდა მოუქნელი.

მეორენი რადიკალურად განსხვავებულ მოდელს გვთავაზობენ, რომელიც უარყოფს ფაგის გენომის მოდულარულ სტრუქტურას და ფაგის გენომის ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას გამოითვლის კომპიუტერული პროგრამებით და შექმნის ბაქტერიოფაგების პროტეომიკულ ხეს [133]. მსგავსი მიდგომით უკეთ გამოვლინდება ახლონათესაობა სხვადასხვა გენეტიკურ მოდულებს შორის, რომლითაც წარმოდგენილია ფაგები.

დაბოლოს, ვირუსების ტაქსონომია, რომელიც დაფუძნებულია ფაგების სტრუქტურული გენების, ძირითადად თავის გენების (რომელიც არის ევოლუციურად უძველესი) კლასტერების შედარებით ანალიზზე უზრუნველყოფს ფაგების შედარებით სრულყოფილ ტაქსონომიას [21, 131]. განხილული სამივე ასპექტი დაფუძნებულია ფაგების ევოლუციის ფილოგენეზურ კონცეფციაზე.

ფაგები, ყველა ვირუსის მსგავსად, არ განეკუთვნებიან სიცოცხლის უნივერსალურ ხეს. ჩვენ არ შეგვიძლია ვისარგებლოთ დარვინის ევოლუციური

პრინციპებით, გამომდინარე იქიდან, რომ დაგროვილი ცოდნა ბაქტერიოფაგების გენომების მრავალფეროვნებაზე ჯერ კიდევ ფრაგმენტული და არასრულყოფილია.

ფაქტია, რომ პირველი მეტაგენომური ანალიზი ოკეანის ვირუსების გენომებისა მიუთითებს გარემოში არსებული ვირუსების გენომების მნიშვნელოვან ბიომრავალფეროვნებაზე, რადგან უმრავლესობა გაშიფრული ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობებისა არ ფიქსირდება გენომის მონაცემთა ბაზაში [18]

სტატისტიკურ გამოკვლევებზე დაყრდნობით გამოთქმული იქნა მოსაზრება, რომ გარემოში არსებული ფაგების გენომის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა შესაძლოა წარმოადგენდეს უდიდეს ნაწილს ბიოსფეროს ყველა ცოცხალი ორგანიზმის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობისა [133].

პოსტგენომიკური ერა საჭიროებს ბაქტერიული ვირუსების მოლეკულურ მახასიათებლებზე დაფუძნებულ კლასიფიკაციის ახალ სისტემას. ფაგების მოლეკულური მექანიზმების შესწავლა და ვირუსების გენომებს შორის შედარებითი ანალიზის ჩატარება ცვლის იდეას ერთი ოჯახის ფარგლებში მაღალ ბიომრავალფეროვნებაზე.

ძირითადად სეკვენირებული ბაქტერიოფაგების გენომები ორგანიზებულია მოდულარულ სტრუქტურებად. შესაბამისად, თითოეული მოდული მოიცავს სხვადასხვა ბიოლოგიურ ფუნქციის მატარებელ გენტა ნაკრებს [15, 27]: 1. სტრუქტურული ცილების მკოდირებელი გენების მოდული; 2. ბაქტერიული უჯრედის ლიზისზე პასუხისმგებელი გენების მოდული; 3. რეპლიკაცია-ტრანსკრიფციის მკოდირებელი გენების მოდული.

გენომის მაღალორგანიზებული მოდულარული ორგანიზაცია დამახასიათებელია წანაზარდიან ფაგებისათვის და, შესაძლოა, წარმოადგენდეს უნივერსალურ პარადოგმას ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიაში.

თავი 2. ბაქტერიოფაგების გენომი და პროტეომი

ბაქტერიული ვირუსები ანუ ბაქტერიოფაგები წარმოადგენენ ბიოსფეროში ყველაზე მეტად გავრცელებულ სასიცოცხლო ფორმებს. ბაქტერიული ვირუსები, როგორც ბიოლოგიური სისტემები, მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ მიკროორგანიზმების ეკოლოგიაში, მათ ბიომრავალფეროვნებაში. მასპინძელი ბაქტერიების გენების ტრანსდუქციის უნარის გამო, რითაც დასაბამს აძლევენ ახალ გენეტიკურ ინფორმაციას, ისინი წარმოადგენენ მნიშვნელოვან ძალას მიკრობთა ევოლუციაში.

ბაქტერიული ვირუსების უნარი, მიანიჭონ პატრონ ბაქტერიებს ახალი ბიოქიმიური და ფიზიოლოგიური თვისებები, უზრუნველყოფს არა მხოლოდ მიკრობთა შეგუებას ახალ გარემო პირობებთან, არამედ ზოგ შემთხვევაში მიკროორგანიზმს სძენს ვირულენტურობის ახალ ფაქტორს, რაც პირდაპირ კავშირშია ადამიანის ინფექციურ დაავადების გამოწვევის პათოგენურობასთან.

ბაქტერიოფაგების გლობალურ პოპულაციაში ამ ვირუსების რიცხოვნობა შეესაბამება 10^{31} [21, 171]. პოპულაციის განახლება ხდება ყოველ რამდენიმე კვირაში ერთხელ [2, 17, 24,]. ბაქტერიოფაგები წარმოადგენენ ურიცხვ და უნიკალურ წყაროს ცილების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მრავალფეროვნების თვალსაზრისით. პროტეომიკურ ბიომრავალფეროვნებაზე მიუთითებს შემდეგი - ბოლო წლებში ჩატარებული იქნა *Mycobacterium tuberculosis* ბაქტერიოფაგის გენომის ანალიზი და ნანახი იქნა, რომ ფაგის გენომში იდენტიფიცირებული 50-75% ღია წაკითხვის ჩარჩოთი ინიცირებული ცილები არ ავლენენ ანალოგიას საერთაშორისო გენბანკში რეგისტრირებულ ცილებთან [19, 128].

მეტაგენომური ანალიზის მიხედვით, რომელიც იყენებს არაპარამეტრულ მეთოდს, ნავარაუდევია, რომ, თუკი სინჯად აღებული იქნება გლობალური მეტაგენომის $<0,0002\%$, ამ შემთხვევაში დაახლოებით 2 მილიარდი განსხვავებული ცილის მაკოდირებელი ღია წაკითხვის ჩარჩო დარჩება გასაშიფრი [29]. ყოველივე ეს კი მოუთითებს იმაზე, რომ სისტემატიკური დახასიათება ბაქტერიული ვირუსების განომებისა წარმოადგენს უნიკალურ შესაძლებლობას გაიზარდოს ცოდნა

გლობალური პროტეომისა და გენეტიკური მრავალფეროვნების შესახებ. ასევე, ერთი სახეობის ბაქტერიაზე გამრავლებულ ბაქტერიოფაგებს შორის შედარებითი ანალიზის ჩატარება კარგი შესაძლებლობაა შესწავლილი იქნას პროკარიოტებში გენეტიკური მრავალფეროვნების გამომწვევი მექანიზმები, რომელთა შორისაა გენთა ჰორიზონტალური გადატანა, ჰომოლოგიური და არაჰომოლოგიური რეკომბინაციები [38, 63, 128, 131].

2.1 სტაფილოკოკური ფაგების შედარებითი დახასიათება გენომის ზომის მიხედვით

ამ თავში დეტალურად განვიხილავთ რამოდენიმე ფუნდამენტურ კვლევას, რომლებიც შეიცავენ მნიშვნელოვან ინფორმაციას სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგების გენომების შესახებ.

მეცნიერთა ჯგუფის მიერ, T. Kwan-ის ხელმძღვანელობით შესწავლილი იქნა 27 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის გენომის ნუკლეოტიდების და ფუნქციონალური გენებით ინიცირებული ცილების ამინონჟაგების თანმიმდევრობა [90]. გენომის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გაშიფრვის და სხვადასხვა ბიოინფორმატიკული პროგრამების გამოყენებით იდენტიფიცირებული იქნა ღია წაკითხვის ჩარჩოები, რიბოსომა დამაკავშირებელი საიტები, ტრანსკრიფციის ტერმინატორები და შესაბამისი გენეტიკური მოდულები. შედარებითი ანალიზის საფუძველზე ორჯაჭვიანი დნმ-ის მოლეკულის მქონე 27 სტაფილოფაგი დაყოფილია სამ ძირითად კლასად (ცხრილი 2). პირველ კლასში გაერთიანდნენ ფაგები, რომელთა გენომის ზომა შეესაბამებოდა <20 ათასი ნწ. მეორე კლასში გაერთიანებულია დაახლოებით 40 ათასი ნწ გენომიანი, ხოლო მესამე კლასში >125 ათასი ნწ გენომის მქონე ფაგები.

პირველ კლასში გაერთიანებული ოთხი ფაგიდან სამი - P68, 66, 44AHJD განეკუთვნება C1 მორფოტიპს, მოკლე კუმშვადი წანაზარდით და იზომეტრული თავით [4]. ხოლო PT1028 ფაგის მორფოლოგია დასადგენია.

უმრავლესობა ბაქტერიული ვირუსებისა მეორე კლასიდან (187, 69, 53, 85, 2638A, 77, 37, 96, 71, 55, 29, 52A, 88, 92, X2) განეკუთვნება B1 მორფოტიპს გრძელი კუმშვადი წანაზარდით და იზომეტრული თავით. ამავე ჯგუფში გაერთიანებულია

ფაგები 42e,3A, 47, რომლებიც წარმოადგენენ B2 მორფოტიპს - გრძელი კუმშვადი წანაზარდით და წაგრძელებული თავით, ხოლო ფაგი EW კლასიფიცირდება, როგორც მორფოტიპი A. ფაგი ROSA ჯერ კლასიფიცირებული არ არის.

სამი ბაქტერიოფაგი, რომლებიც ერთიანდებიან მესამე კლასში (Twort, K, G1) მიეკუთვნებიან Myoviridae ოჯახს. ფაგები G1, K და Twort ნათლად ახლონომათესავეა, განსაკუთრებით G1 და K, ამასთანავე ეს ფაგები არ ავლენენ არავითარ ნათესაობას *Myoviridae*-ს სხვა სტაფილოფაგებთან. ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობის დონეზე, ფაგები G1 და K ავლენენ 90% იდენტურობას ერთმანეთთან, მაშინ როცა ნათესაობა Twort-ის, G1-სა და K-ს მიმართ შეესაბამება მხოლოდ 51-52% -იან იდენტურობას [90]. ამ, დიდი ზომის გენომის (178-214 kbp) მქონე ბაქტერიოფაგების კლასში გაერთიანებული ფაგების გენომები იძლევა საოცრად დიდ შესაძლებლობას შევისწავლოთ ბაქტერიული ვირუსების ევოლუციისა და ბიომრავალფეროვნების მოლეკულური მექანიზმები. აღსანიშნავია, რომ ფაგი Twort გახლავთ Twort-ის მიერ 1915 წელს პირველად გამოყოფილი ბაქტერიოფაგი (და რომელიც დერელის პუბლიკაციებში მოიხსენიება, როგორც Twort-D'Herelle ეფექტი).

სტაფილოფაგების გენომური რუკების შედარებითმა ანალიზმა გამოავლინა მნიშვნელოვნად მაღალი გენომური მოზაიციზმი, რაც ნიშნავს, რომ არსებობს ფაგების არაიდენტიფიცირებული გენების დიდი რეზერვუარი [90].

თანმიმდევრობათა შედარებითი ანალიზით მიღებული შედეგები მიუთითებს, რომ ეს 27 ფაგი წარმოადგენენ გენეტიკური მრავალფეროვნების მნიშვნელოვან წყაროს, მოიცავენ რა საერთო ჯამში 2,170 სხვადასხვა ცილის მაკოდირებელ ღია წაკითხვის ჩარჩოს [ORF]. აქედან, 1,402 სტრუქტურის და ფუნქციის მიხედვით დახასიათებული არ არის, ხოლო 522 ღია წაკითხვის ჩარჩო აკოდირებს ცილებს, რომლებიც არ ავლენს მსგავსებას მონაცემთა ბაზაში არსებულ სხვა ფაგებისა და ბაქტერიების ცილების ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობასთან [90].

27 განსხვავებული სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის შედარებითი ანალიზის შედეგებმა აჩვენა, რომ ძირითდად ერთი ზომის გენომის მქონე კლასში გაერთიანებული ფაგები ერთმანეთის მიმართ უფრო ახლომონათესავენი არიან, ვიდრე სხვა კლასის ფაგების მიმართ.

მთლიანობაში იდენტიფიცირებული იქნა 2,170 ცილის მაკოდირებელი გენი, სადაც საშუალოდ გენის კოდირების პოტენციალი შეესაბამებოდა 92%-ს. სტაფილოფაგმა 187 გამოავლინა გენის მაქსიმალური სიმკვრივე - 1,94 გენი ყოველ 1000 ნუკლეოტიდურ წყვილზე, ხოლო ფაგი 2638A ავლენს ყველაზე დაბალ სიმკვრივეს, რაც შეესაბამება 1000 ნუკლეოტიდურ წყვილზე 1,38 გენს. დმოჩნდა, რომ ბაქტერიული ვირუსის გენომში გენების რაოდენობა პირდაპირ დამოკიდებულებაშია გენომის ზომასთან: ფაგი PT1028 (15,603 ნწ) მოიცავს 22 გენს, ხოლო G1 – 214 გენს.

ცხრილი 2. 27 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის გენომის მონაცემები [90]

კლასი	№	ბაქტერიოფაგი	გენომის ზომა (ნწ)	GC (%)	გენები	კოდირების %	ფუნქციური გენები	უფუნქციო გენები	ამინომჟავა აა
I (<20ანწ)	1	PT1028	15,603	31,4	22	77,4	9	13	187
	2	66	18,199	29,3	27	91,8	14	13	216
	3	44AHJD	16,668	29,7	32	93,6	9	23	182
	4	P68	18,221	29,3	29	93,6	13	16	210
	5	187	39,620	34,3	77	93,5	32	45	170
	6	69	42,732	34,3	76	93,0.	26	50	180
	7	53	43,883	34,1	79	93,4	30	49	179
	8	85	44,283	34,6	78	91,8	30	48	180
	9	2638A	41,318	36,9	57	92,7	19	38	224
	10	77	41,708	33,5	69	92,1	25	44	186
II (40ანწ)	11	42e	45,861	33,7	79	93,4	33	46	186
	12	3A	43,095	33,5	67	93,9	27	40	206
	13	47	44,777	33,5	72	94,0.	28	44	199
	14	37	43,681	35,1	77	95,6	31	46	188
	15	EW	45,286	38,0	77	92,0.	30	47	186
	16	96	43,576	35,0	79	92,0.	26	53	179
	17	ROSA	43,155	35,1	74	92,9	31	43	183
	18	71	43,114	35,2	72	94,6	27	45	193
	19	55	41,902	35,7	77	93,4	31	46	180
	20	29	42,802	35,4	75	92,2	29	46	185
III (40ანწ)	21	52A	41,690.	35,5	65	91,6	30	35	202
	22	88	43,231	35,5	72	94,3	34	38	194
	23	92	42,431	35,7	74	95,2	30	44	192
	24	X2	43,440.	36,0	77	92,8	28	49	181
	25	K	127,395	30,6	178	88,7	44	134	213
	26	G1	138,715	30,4	214	88,5	50	164	193
	27	Twort	130,706	30,3	195	88,0.	52	143	200
ტოტალური			1,327,092	-	2,170.	-	768	1,402	-
საშუალო			-	33,7	-	92,1	-	-	192

ბაქტერიების გენბანკში და ფაგების მონაცემთა ბაზაში რეგისტრირებულ ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობებთან მსგავსების დასადგენად, 27-ვე ფაგის ყველა ფუნქციური გენით კოდირებული ცილის შედარებითი ანალიზი იქნა ჩატარებული.

ცილების უმრავლესობა, რომელიც კოდირებულია 1,402 გენით, რაც შეადგენს მთელი პროტეომის 65%-ს არ არის ფუნქციურად შესწავლილი. მხოლოდ 768 (35%) გენით ინიცირებული ცილა დახასიათდა სტრუქტურის და ფუნქციის მიხედვით. 1,053 (49%) ღია წაკითხვის ჩარჩომ გამოავლინა ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მსგავსება სხვა სტაფილოკოკური ფაგების ღია წაკითხვის ჩარჩოსთან. ეს ციფრი გაცილებით მაღალია, ვიდრე მოსალოდმელი იყო (24% მთელი პროტეომისა). მასპინძელი ბაქტერიების გენომიდან 60 გენი აღმოჩნდა ჰომოლოგიური, რაც წარმოადგენს პროტეომის 3%. ეს კი უფრო შეესაბამება გენების გადატანის პროცესს სტაფილოფაგებს შორის, ვიდრე რეკომბინაციებს სტაფილოფაგებს შორის ან არასტაფილოფაგებს შორის, ან სტაფილოფაგებსა და მათ პატრონ ბაქტერიებს შორის. ასევე მნიშვნელოვანია, რომ გენების დიდი წილი - 522 გენი (24% პროტეომისა) არის უნიკალური, რაც ნიშნავს, რომ არ ავლენს არავითარ მსგავსებას ცილების მონაცემთა ბაზაში რეგისტრირებულ პროკარიოტების ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობასთან.

სტაფილოფაგების გენომის ანალიზის საფუძველზე დადგინდა, რომ გენების ტრანსკრიფცია ხდება ერთი ჯაჭვიდან. საპირისპირო ჯაჭვიდან ხდება მხოლოდ გენების მცირე კლასტერი ტრანსკრიფცია. სტაფილოფაგების გენები, ფუნქციის მიხედვით, კლასიფიცირდებიან ექვს კატეგორიად: დნმ-ის რეპლიკაციის, ინტეგრაციის, აწყობის, კაფსიდის, წანაზარდისა და ლიზისის მარეგულირებელ გენებად, რაც წარმოდგენილია გენომის მოდულარულ სტრუქტურად. დიდი გენომის მქონე სამ სტაფილოკოკურ ბაქტერიოფაგს (K, G1, Twort) აქვს დნმ-ის რეპლიკაციის მეორე მოდული, რომელიც ლოკალიზებულია აღმავალ ჯაჭვზე, რაც აორმაგებს ლიზისურ ფუნქციას (ამიდაზა, ჰოლინი) [90]. ეს დამატებითი ფუნქცია უზრუნველყოფს ამ კლასში გართიანებული ზოგიერთი ფაგისათვის ფართო მასპინძელი ბაქტერიების წრის არსებობას და გამოიხატება მათ მიერ როგორც კოაგულაზა-დადებითი, ასევე კოაგულაზა-უარყოფითი სტაფილოკოკების ინიცირების უნარში [5, 21]. უნიკალური ამ სამ ფაგში არის რიბონუკლეოზიდ-დიფოსფატ რედუქტაზის კომლექსის არსებობა, რომელიც პასუხისმგებელია

რიბონუკლეოტიდიდან დეზოქსირიბონუკლეოტიდის სინთეზის კატალიზზე [122]. მესამე კლასის ეს ფაგები აკოდირებენ ასევე: 1. ჰოლინის მსგავს ბაქტერიული დნმ-ის დამაკავშირებელ ცილას; 2. RecA ცილას, რომელიც მონაწილეობს ჰომოლოგიური დნმ-ის რეკომბინაციებში და დნმ-ის რეპარაციაში; 3. დნმ-პრაიმაზას, რომელიც მონაწილეობს დნმ-ის რეპლიკაციაში. აღწერილი ფუნქციები მიუთითებს, რომ დიდი გენომის მქონე ფაგებს დნმ-ის რეპლიკაციის ფუნქციის უმეტესი ნაწილი ევოლუციის პროცესში მიღებული აქვს მასპინძელი ბაქტერიიდან, რასაც ადასტურებს მნიშვნელოვანი ჰომოლოგია ბაქტერიულ ცილებთან და არა ფაგურ ცილებთან. ამასთან, აღსანიშნავია, რომ G1 და K ფაგის არცერთ ინდივიდუალურ გენს არა აქვს ჰომოლოგი ბაქტერიების გენბანკში და ფაგების გენომის მონაცემთა ბაზაში. ფაგებს შორის კარგად გამოხატული მოზაიციზმი მიუთითებს პროკარიოტულ ვირუსებში გენეტიკური ცვლილებების მაღალ სიხშირეზე [62, 64].

სტაფილოკოკური ფაგი 47-ის (მეორე კლასი, B მორფოტიპი) და სხვა სტაფილოკოკური ფაგების გენომების შედარებით ანალიზით გამოვლინდა, რომ მათ შორის იდენტურობა 98%-ზე მაღალია. კაფსიდის, წანაზარდისა და დნმ-ის მაკოდირებელი უბანი ძალიან მაღალი პროცენტით ავლენს მსგავსებას ფაგების 3A და 42e შესაბამის უბანთან, რის მიხედვითაც აღნიშნული ვირუსები გაერთიანდნენ B2 მორფოტიპში. ფაგი 47-ის ლიზისის მოდულმა ასევე აჩვენა თითქმის სრული იდენტურობა 3A, 96, ROSA, 77, 53 ფაგების შესაბამის უბნებთან. ხოლო დნმ-ის რეპლიკაციის მოდულის უდიდესი ნაწილი არის უფრო მეტად ჰომოლოგიური ROSA, 77, 53 და 85-ის შესაბამისი უბნისა. აღწერილი მონაცემები ახდენს იმის ილუსტრირებას, რომ სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგების გენომებს ახასიათებთ კარგად გამოხატული მოზაიციზმი [22, 43, 74, 112, 128]. ასე რომ, ფაგების ტაქსონომიური კლასიფიკაცია, რომელიც დაფუძნებულია ფაგების გენომებს შორის ჰომოლოგიური უბნების არსებობაზე არის არაადეკვატური [63, 95]. ხოლო ალტერნატიულმა მეთოდმა, რომელიც ეფუძნება ვირუსების პროტეომის შედარებით ანალიზს, შესაძლოა უფრო ზუსტად აღწეროს ფაგებს შორის ნათესაობა [133].

ამრიგად, Kwan-ის და თანაბშრონლების მიერ სამ კლასში გაერთიანებული 27 განსხვავებული სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის კვლევის შედეგად გამოიკვეთა, რომ შედარებითი ანალიზი ფაგებს შორის გენომის დონეზე იძლევა დიდძალ მასალას

ბაქტერიული ვირუსების გენომისა და პროტეომის მრავალფეროვნების მექანიზმების უკეთესად შესასწავლად.

მკვლევართა ჯგუფმა, *K. Vandersteegen*-ის ხელმძღვანელობით გამოყო და დაახასიათა ორი ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი Romulus და Remus, რომლებიც ერთიანდება Twort-მსგავსი ვირუსების გვარის, *Spounavirinae* მიოვირუსების ქვეოჯახში [158]. ფაგების აღნიშნული ჯგუფი აერთიანებს 15 კარგად ცნობილ სტაფილოკოკურ ბაქტერიოფაგს: ფაგი K(AY1763) [49], G1(AY954969), Twort(NC_007021) [90], Sb-1(HQ163896) [87], ISP(FR852584) [116,159], A5-W(EU418428), Staph1N(JX080300), Fi200W(JX080303), P4W(JX080305), 676Z(JX080302), A3R(JX080301), MSA6 (JX080304) [91, 98], SA11(JX194239) [79] და GH15(JQ686190) [58]. მათი ორჯაჭვიანი დნმ-ის ზომა ვარირებს 127,188 —140,194 ნწ.; გენომში გუანინისა და ციტოზინის (GC) შემცველობა 30,04-30,60%-ია; ხოლო, ღია წაკითხვის ჩარჩოების რაოდენობა შეესაბამება 183-217-ს.

მკვლევარების მიერ ჩატარებული იქნა ზემოთხსენებული დიდი გენომის შემცველი 15 ბაქტერიოფაგის გენომის შედარებითი ანალიზი ახლადგამოყოფილი ფაგების (Romulus და Remus) გენომებთან [158]. Romulus-ის გენომის ზომა შეესაბამება 131,333 ნწ-ს (JX846613); ხოლო Remus-ის დნმ-ი შედგება 134,643 ნწ-საგან (JX846612).

აღსანიშნავია, რომ ბიოინფორმატიკული ანალიზის მიხედვით Romulus და Remus ფაგების გენომები ერთმანეთის მიმართ ავლენენ 95,9% ჰომოლოგიას ნუკლეოტიდების დონეზე.

ავტორების მიერ შემოთავაზებულ ცხრილში (ცხრილი 3.) წარმოდგენილია 16 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის გენომების შედარებითი ანალიზი, სადაც ფაგების გენომებს შორის მსგავსება პროცენტულადაა გამოსახული.

ცხრილი 3. სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგების გენომების შედარებითი ანალიზი ბიოტექნოლოგიური ინფორმაციის ნაციონალური ცენტრის (NCBI) მონაცემთა ბაზის მიხედვით [158]

ფაგი	K	G1	Twort	ISP	A5-W	Staph1N	Fi200 W	P4W	676Z	A3R	MSA6	Sb-1	GH15	SA1 1	Romulus	Remus
K	100	90.3	56.1	90.6	91.4	91.3	89.2	89.8	89.4	93.5	88.6	96.6	80.0	58.4	57.6	57.9
G1	90.3	100	55.2	99.5	98.4	98.3	97.5	97.0	97.4	92.0	97.0	91.0	84.5	57.8	55.1	55.8
Twort	56.1	55.2	100	55.3	55.4	55.4	55.8	55.9	55.8	56.6	55.4	55.9	55.2	55.8	54.5	54.9
ISP	90.6	99.5	55.3	100	98.7	98.8	97.9	97.4	97.8	92.4	97.3	90.6	84.9	57.8	55.2	55.9
A5-W	91.4	98.4	55.4	98.7	100	99.9	97.3	98.1	97.3	93.2	96.1	90.6	84.5	58.0	55.5	56.2
Staph1N	91.3	98.3	55.4	98.8	99.9	100	97.4	98.2	97.4	93.3	96.2	90.5	84.6	58.0	55.5	56.1
Fi200W	89.2	97.5	55.8	97.9	97.3	97.4	100	99.1	99.6	94.1	95.4	88.9	83.9	57.5	54.9	55.6
P4W	89.8	97.0	55.9	97.4	98.1	98.2	99.1	100	99.0	94.7	94.9	89.2	83.6	57.6	55.1	55.8
676Z	89.4	97.4	55.8	97.8	97.3	97.4	99.6	99.0	100	94.3	95.3	88.8	83.9	57.5	54.9	55.6
A3R	93.5	92.0	56.6	92.4	93.2	93.3	94.1	94.7	94.3	100	90.0	92.5	81.5	58.0	56.4	57.1
MSA6	88.6	97.0	55.4	97.3	96.1	96.2	95.4	94.9	95.3	90.0	100	88.8	82.7	58.7	56.3	56.9
Sb-1	96.6	91.0	55.9	90.6	90.6	90.5	88.9	89.2	88.8	92.5	88.8	100	79.7	58.4	57.7	57.9
GH15	80.0	84.5	55.2	84.9	84.5	84.6	83.9	83.6	83.9	81.5	82.7	79.7	100	57.3	55.4	56.0
SA11	58.4	57.8	55.8	57.8	58.0	58.0	57.5	57.6	57.5	58.0	58.7	58.4	57.3	100	82.1	84.6
Romulus	57.6	55.1	53.2	55.2	55.5	55.5	54.9	55.1	54.9	56.4	56.3	57.7	55.4	82.1	100	95.9
Remus	57.9	55.8	54.9	55.9	56.2	56.1	55.6	55.8	55.6	57.1	56.9	57.9	56.0	84.6	95.9	100

ფაგების გენომების ნუკლეოტიდებს შორის მსგავსება გამოხატულია %-ში.

როგორც ვხედავთ, ახლომონათესავე ფაგების K, G1, Sb-1 და ISP-ის გენომები ავლენენ 90%-იან ჰომოლოგიას ერთმანეთთან, ხოლო მათი მსგავსება ფაგთან Twort, დაახლოებით 55%-ია. ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგების, Romulus და Remus-ის გენომების მსგავსება SPO1-მსგავს ფაგებთან (K, G1, Sb-1 და ISP) საკმაოდ დაბალია და შეადგენს 54,5-57,9%. შედარებით მაღალია იდენტურობის პროცენტი SA11 ფაგის გენომის მიმართ - 82,1-84,6%.

გამომდინარე იქიდან, რომ ჩვენი კვლევის ობიექტს წარმოადგენს სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი Sb-1, აღნიშნულ ნაშრომში ჩვენთვის მეტად საინტერესოა Sb-1 ფაგის გენომის შედარებითი ანალიზი 15 სტაფილოფაგის გენომის მიმართ. ცხრილში შეჯამებული მონაცემებიდან ჩანს, რომ Sb-1 ფაგის გენომი 96,6%-ით იდენტურია ფაგი K-ს გენომისა და 91% ჰომოლოგიურია G1 ფაგის გენომისა. ხოლო, ფაგები: ISP, A5-W და Staph1N ავლენენ 90,5-90,6% იდენტურობას Sb-1 ფაგის გენომთან [158].

მიუხედავად იმისა, რომ Romulus და Remus-ი ავლენენ დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მსგავსების დაბალ პროცენტს K, G1, ISP და Twort ფაგების მიმართ, მათი გენომების მოდულარული სტრუქტურა აბსოლუტურად ერთნაირია. სამი ძირითადი მოდული: ვირიონის ცილების მკოდირებელი მოდული, დნმ-ის სინთეზის და უჯრედის ლიზისზე პასუხისმგებელი მოდული [158].

ვირულენტური სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგები მნიშვნელოვანია, როგორც თერაპიული აგენტები, ინფექციური დაავადებების ადგილობრივი და სისტემური მკურნალობისას. ამ ფაგების დეტალური შესწავლით დადგენილია, რომ მათი გენომის ზოგიერთი გენი აკოდირებს ცილებს, რომელთა სამიზნეს წარმოადგენს პატრონი ბაქტერიული უჯრედის დნმ, რნმ-ის რეპლოკაცია-ტრანსკლიფციის მექანიზმების დაბლოკვა [32, 97].

2.2 SPO1-მსგავსი მიოვირუსების ბიოლოგიური და მოლეკულური მახასიათებლები

SPO1-მსგავსი, *Myoviridae*-ს ოჯახის წარმომადგენელი ვირუსები აინფიცირებენ დაბალი GC შემცველობის გრამ-დადებით ბაქტერიებს [34], მათ აქვთ მკვეთრად გამოხატული ვირულენტური სასიცოცხლო ციკლი, ვირიონის მსგავსი მორფოლოგია, დიდი გენომები ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების მსგავსი უბნებით და სხვადასხვა ზომის ტერმინალური განმეორებადობები. ამ ჯგუფში გაერთიანებული სხვადასხვა პატრონი უჯრედის მქონე ბაქტერიოფაგი, მათ შორისაა სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი K, G1 [123, 159].

ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპით ჩატარებული კვლევებით დადგენილია, რომ A511, P100 და K ფაგები მორფოლოგიურად პრაქტიკულად იდენტურია და განეკუთვნებიან SPO1-მსგავსი ფაგების ჯგუფს *Myoviridae*-ს ოჯახიდან, რომელიც ერთიანდება Twort-მსგავსი ვირუსების გვარში. მორფოლოგიური მსგავსების ფონზე საინტერესოა მათი გენომების ერთმანეთთან და SPO1-მსგავსი ფაგების ჯგუფის სხვა წევრების გენომებთან შედარებითი მოლეკულურ-ბიოლოგიური კვლევის შედეგები. მაგალითად ლაქტობაცილუსის ფაგი LP65 [34, 123].

SPO1-მსგავსი ფაგების ჯგუფის წარმომადგენელი, *Bacillus subtilis* ბაქტერიოფაგი SPO1 დიდი გენომის (133,391 ნწ) მქონე ვირულენტური ბაქტერიული ვირუსია, რომლის დნმ-ის მოლეკულაში თიმინი მთლიანად ჩანაცვლებულია ჰიდროქსილმეთილურაცილით. ფაგის გენომი კონსტრუირებულია ადრეული, საშუალო და გვიანი გენების მომცველ მოდულებად, რაც ეფუძნება ტრანსკრიფციის დაწყების დროს. ადრეული გენების ტრანსკრიფციის რეგულაცია ხდება პატრონი ბაქტერიის რნმ-პოლიმერაზით [61, 129], ხოლო საშუალო და გვიანი გენების თანმიმდევრულ აქტივაციას უზრუნველყოფს ადრეული გენი gp28-ით ინიცირებული საშუალო გენ-სპეციფიური სიგმა ფაქტორი და საშუალო გენებით gp33, 43 კოდირებული გვიანი გენ-სპეციფიური სიგმა ფაქტორი [53, 129]. დნმ-ის რეპლიკაციის ფერმენტების ტრანსკრიფციის ინიციაციის რეგულაცია ხდება საშუალო გენების მოდულით, ხოლო სტრუქტურული ცილების მაკოდირებელი გენები შეესაბამებიან გვიანი გენების მოდულს [149]. ფაგის გენომში

იდენტიფიცირებულია 21 ადრეული პრომოტორი, საიდანაც 12 ადრეული პრომოტორი მაღალი აქტივობით გამოირჩევა.

ვირულენტული სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი K არის SPO1-მსგავსი ფაგების ჯგუფის მეორე წარმომადგენელი [67, 68, 69], რომელიც აქტიურია როგორც კოაგულაზა-დადებითი, ასევე კოაგულაზა-უარყოფითი სტაფილოკოკების მიმართ [135]. მისი არაწებოვანი ბოლოების მქონე სწორხაზოვანი ორჯაჭვიანი დნმ-ის მოლეკულა წარმოდგენილია 127,395 ნუკლეოტიდური წყვილით, რომელშიც არ ფიქსირდება GATC თანმიმდევრობა [123]. ბაქტერიული ვირუსის გენომში იდენტიფიცირებულია 118 ღია წაკითხვის ჩარჩო, orf-ების უმრავლესობა (112) საინიციაციო კოდონად იყენებს AUG ტრიპლეტს, ხუთ შემთხვევაში ტრანსლიაციის ინიციაცია ხდება UUG კოდონით, ხოლო ერთ შემთხვევაში GUG ტრიპლეტით. 118 orf-დან 85 ტრანსკრიბირებს 5'-3' მიმართულებით, ხოლო 33 საპირისპირო მიმართულებით [123]. გენომი ორგანიზებულია მოდულარული სტრუქტურით, რომელიც მოიცავს დნმ-ის რეპლიკაციის, ტრანსკრიფციის რეგულაციის, სტრუქტურული ცილების და ლიზისის მოდულს [123, 124].

ვირიონის მორფოლოგიისა და პატრონი ბაქტერიის მიხედვით, ფაგი A511 ერთიანდება SPO1-მსგავსი ფაგების ჯგუფში. *Listeria monocytogenes* A511 მკვეთრად გამოხატული ვირულენტული ბაქტერიოფაგია, რომელიც განეკუთვნება A1 მორფოტიპს [149]. მას ახასიათებს მასპინძელი ბაქტერიების ინფიცირების ფართო დიაპაზონი (95%) [34, 103, 160]. ფაგი A511 და მისი მონათესავე *Listeria* ფაგი P100 წარმოადგენენ ხელსაყრელ ობიექტებს ამ ჯგუფის ვირუსების შესასწავლად.

A511-ის გენომის ზომაა 137,619 ანწ, GC შემცველობა შეესაბამება 36,1 %, ხოლო ტერმინალური განმეორებადობები 3,125 ნწ [104, 180]. ინფორმატიული გენომი წარმოდგენილია 134,494 ანწ-ით. ფაგის გენომი ორგანიზებულია მოდულარული სტრუქტურით, კერძოდ ორი კლასტერით: 1. სტრუქტურული კომპონენტების მაკოდირებელი კლასტერი და 2. დნმ-ის რეპლიკაციის მარეგულირებელი კლასტერი [81]. გენომში იდენტიფიცირებულია 190 ღია წაკითხვის ჩარჩო, რომელთა უმრავლესობას წინ უსწრებს რიბოსომა დამაკავშირებელი საიტის თანმიმდევრობა AAAGGAGG, რომელიც ლოკალიზებულია 6-10 ნუკლეოტიდური წყვილით ტრანსლაციის საინიციაციო კოდონის წინ [57, 145]. აღნიშნული orf-ებით

კოდირებული ცილების ზომები მერყეობს 3,7 kDa-145,8 kDa შუალედში. ფუნქციური ცილების მაკოდირებელი ღია წაკითხვის ჩარჩოების უმრავლესობა სასტარტო კოდონებად იყენებს ATG ტრიპლეტს [181], დანარჩენი 41, კი GTG და TTG კოდონს [81]. ფაგი A511-ის გენომში გაშიფრულია ლიზისის მაკოდირებელი გენების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა, ასევე გვიანი გენები, რომლებიც უზრუნველყოფენ კაფსიდისა და წანაზარდის სტრუქტურული ცილების სინთეზს [105, 106].

დაბალი GC შემცველობის ბაქტერიების მიოვირუსები, როგორცაა: *Lactobacillus plantarum* ფაგი LP65 [34], *Bacillus subtilis* ფაგი SPO1, *Staphylococcus aureus* ფაგი K [123], *Enterococcus faecalis* ფაგი φEF24C, რომლებიც აინფიცირებენ სხვადასხვა სახეობის ბაქტერიებს, გენომის მიხედვით უნდა განსხვავდებოდნენ ერთმანეთისაგან და A511-საგან.

SPO1, K, LP65, φEF24C და A511 ბაქტერიოფაგების გენომური რუკების შედარებითმა ანალიზმა გამოავლინა მათ შორის ჰომოლოგიური უბნების არსებობა. აღმოჩნდა, რომ სპეციფიურ გენტა კლასტერები, მაგალითად უჯრედის ლიზისის მარეგულირებელი კლასტერი ფაგების A511-ის, K-სი და LP65-ის ლოკალიზებულია მათი გენომის სრულიად სხვადასხვა ხაზობრივ კოორდინატაზე, რაც ნათელს ჰფენს აღნიშნულ ფაგებს შორის მოზაიციზმის ფენომენის არსებობას. გენტა ასეთი ორგანიზება ფაგების გენომების ადრეულ და გვიან გენტა კლასტერებში მიუთითებს მათ მოდულარულ განაწილებაზე და გენეტიკური ელემენტების სინქრონიზაციაზე ბაქტერიული ფირუსების ევოლუციის განვითარების პროცეში [81].

ბაქტერიოფაგი A511-ით უჯრედის ინფიცირებისას ტერმინალური განმეორებადობის გენები საწყის საფეხურზე ექსპრესირდებიან. ეს კი ადასტურებს გამოკვლევას, რომ ისინი ავლენენ ადრეულ ექსპრესიას მასპინძლის გარემოში, მაშინ, როცა გენომის ტრანსკრიფციული და ინდივიდუალური გენები თვისობრივად ახლო კონსესუსში არიან ბაქტერიული პრომოტორის თანმიმდევრობასთან და რიბოსომა დამაკავშირებელ საიტთან. ფაგი SPO1-სთვის კი შესაფერის გენებს შეიძლება წარმოადგენდეს მასპინძლის მეტაბოლიზმის დამბლოკავი მოდული [150], რომლის აქტივაციის შემდგომ ირთვება რეპლიკაციის მექანიზმი. აქვე აღსანიშნავია, რომ A511-ის ტერმინალური განმეორებადობის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა არ

ავლენს ჰომოლოგიას SPO1-ის „მასპინძლის-დამბლოკავი“ მოდულის ცილოვან პროდუქტთან. შესაბამისად, მათი სავარაუდო როლი უჯრედის ინფიცირების საწყის საფეხურზე დასადგენია.

ფაგები A511, P100 და K მორფოლოგიურად აბსოლუტურად იდენტურია, ხოლო სივრცული განზომილებით წანაზარდის კონსტრუქციითა და ბაზალური ფირფიტის სტრუქტურით ეს ფაგები ემსგავსება ბაქტერიოფაგ LP65-ს [34]. ეს კი ხაზს უსვამს SPO1-მსგავსი ფაგების ნათსაობას სხვადასხვა სახეობის პატრონი ბაქტერიების მიუხედავად, რაც ადასტურებს იმას, რომ მორფოლოგიური ნიშნები კარგად კორელირებს სტრუქტურული კომპონენტების მაკოდირებელი გენებისა და მისი პროდუქტების ნათესაურ წარმოშობაზე. ამისგან განსხვავებით, მცირე მსგავსება იქნა ნანახი რეპლიკაციის მაკოდირებელ გენებსა და ჯერ კიდევ დაუდგენელი ფუნქციის მაკოდირებელ გენებს შორის, რაც მიუთითებს ამ ელემენტების მაღალ მასპინძელ-სპეციფიურ ადაპტაციაზე, ვიდრე მოსალოდნელი იყო ვირუს-ბაქტერიის დივერგენციული ევოლუციის პროცესში. ნათელია, რომ რეკომბინაციების მაღალი სიხშირე ფაგებს შორის, რომლებიც აინფიცირებენ სხვადასხვა სახეობის მასპინძელ ბაქტერიებს იკავებენ მსგავს ეკოლოგიურ ნიშას, რაც გახლავთ შედეგი მაღალი ხარისხის მოზაიციზმისა ფაგების ლოკალურ პოპულაციაში.

სხვადასხვა ზომის გენეტიკური მოდულების ჰორიზონტალური გაცვლა ასევე იკავებს ადგილს ბაქტერიული ვირუსების გლობალურ პოპულაციაში, თუმცადა გაცილებით დაბალი სიხშირით [20, 64, 65].

სინამდვილეში ჰომოლოგიური რეკომბინაციები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ გენეტიკური მოდულების გაცვლაში მონათესავე ბაქტერიების დამაინფიცირებელ ბაქტერიულ ვირუსებს შორის. ეს მეტად გავრცელებულია ლიზოგენურ ბაქტერიებში [20, 25].

თანამედროვე მოლეკულურ ბიოლოგიაში გაზრდილია შესაძლებლობა ფაგის დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გაშიფვრის და გენომური რუკების შედგენისა. შესაბამისად ტარდება გენომებს შორის შედარებითი ანალიზი, რომელთა შედეგები მიუთითებს გენეტიკური ინფორმაციის მოზაიკურ გავრცელებაზე ვირულენტულ ფაგებს შორის. მაგალითად SPO1-მსგავსი ფაგების ჯგუფის შიგნით გაერთიანებული მიოვირუსები, რომელთაც აქვთ უნარი გაცვალონ გენეტიკური

მასალა ინფიცირების ადრეულ საფეხურზე. გამომდინარე იქიდან, რომ აღნიშნულ ფაგებს აქვთ უნარი დააინფიცირონ მხოლოდ ერთი გვარის პატრონი ბაქტერიები ან ასევე შესაძლოა ჰქონდეთ პატრონი ბაქტერიების ფართო სპექტრი მხოლოდ ერთი ტაქსონომიური ჯგუფის შიგნით. ფაგებს შორის ნათესაობა დაფუძნებულია ბაქტერიული ვირუსებისა და პატრონი ბაქტერიების შორეული წინაპრებიდან დაწყებულ ტრანსდუქციის მოვლენაზე, რასაც თან სდევს არალეგიტიმური რეკომბინაციები. საინტერესოა, რომ ფაგი A511 ავლენს უფრო ახლო ნათესაობას სტაფილოფაგებთან, ვიდრე *Bacillus subtilis*-ის დამაინფიცირებელ ვირუსებთან. აღსანიშნია, რომ მასპინძელი ბაქტერიების ფილოგენეზი აღწერს განსხვავებულ მდგომარეობას, სადაც ჯერჯერობით საკმაოდ ლიმიტირებულია სეკვენირებული ბაქტერიული თუ ფაგური გენომების რაოდენობა, რაც საჭიროა უფრო ღრმა ფილოგენეზური ანალიზისათვის [81].

ნიშანდობლივია, რომ არცერთი ბაქტერიული ვირუსი SPO1-მსგავსი ფაგების ჯგუფიდან არ აინფიცირებს ერთზე მეტი გვარის ბაქტერიას, უფრო მეტიც, ყველა მათგანის პატრონი ბაქტერია გაერთიანებულია საერთო ჯგუფში *phylum Firmicutes*, რომელიც მეტ-ნაკლებად გენეტიკურად განსაზღვრულია. ყველა ზემოთ აღწერილი ფაგების (K, SPO1, P100, A511, LP65) პატრონი ბაქტერია გაერთიანებულია კლასი *Bacilli* და გვარი *Bacillares* (*Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus*) და *Lactobacillares* (*Lactobacillus*).

გამოვლენილია, რომ ბაქტერიოფაგები ცირკულარული გენომით შესაძლოა გარდაიქმნან გენეტიკურ მარკერებად, მაშინ, როცა ფაგებს, გენომის ხაზოვანი სტრუქტურითა და არავარიანტული დაბოლოებით ეს უნარი არ გააჩნიათ [66, 104, 180]. ფაგი A511-ის გენომის სტრუქტურა კი ხსნის ამ უნარის უქონლობას, მსგავსად SPO1-მსგავსი სხვა ფაგებისა [81].

დადგინდა, რომ ვირულენტური SPO1-მსგავსი ფაგების ჯგუფში გაერთიანებული მიოვირუსები ხასიათდებიან ტერმინალური განმეორებადობების მომცველი დიდი გენომებით [81]. A511, P100, K ფაგების ტერმინალური განმეორებადობები მკვეთრად განსხვავდება ერთმანეთისგან. A511-ის გენომში ეს უბანი წარმოდგენილია 3,1 ათასი ნუკლეოტიდური წყვილით, ფაგი P100-ის ტერმინალური განმეორებადობა შეესაბამება 6 ათას ნუკლეოტიდურ წყვილს. ფაგის

გენომში ტერმინალური განმეორებადობების ზომა ასევე ვარირებს SPO1-მსგავსი ფაგების ჯგუფის სხვა წევრებისათვის, როგორცაა LP65, Twort, SPO1, φEF24C. *Enterococcus faecalis* ფაგი φEF24C გენომის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის A511-ის გენომთან შედარებითი ანალიზით გამოვლინდა 47% ჰომოლოგია, ხოლო ცილების ანალიზის მიხედვით კი 37% მსგავსება. რის მიხედვითაც აღნიშნული ბაქტერიული ვირუსი კლასიფიცირდა, როგორც SPO1-მსგავსი ფაგების ჯგუფის წარმომადგენელი.

შედარებული იქნა A511, K, LP65 ფაგების გენომური რუკები, სადაც ადრეული და გვიანი გენების კლასტერები მეტ-ნაკლებად მსგავსია მცირედ გამოხატული ინვერსია-დელეციებით, ხოლო მეტად გამოხატულია განსხვავება ლიზისის გენის კლასტერებს შორის. A511-ის შემთხვევაში სტრუქტურული ცილების მაკოდირებელი მოდული მაღალი პროცენტით (20-60%) შეესაბამება ფაგების LP65 და K-ს სტრუქტურული გენების მოდულს. ფაგი A511-ის გენომის რეპლიკაციის კლასტერი წარმოდგენილია გენებით, რომელიც აკოდირებენ დნმ-პოლიმერაზას, ჰელიკაზას, პრაიმაზასა და სიგმა ფაქტორს, რაც ასევე მაღალი პროცენტით ჰომოლოგიურია ფაგების K და LP65-ის შესაბამისი მოდულისა [81].

ბაქტერიოფაგი A511-ის გენომის (dot plot) შედარებითმა ანალიზმა P100, K, LP65, SPO1 ფაგების გენომებთან გამოავლინა მათ შორის მნიშვნელოვანი მსგავსებები, კერძოდ, >70% ჰომოლოგია გამოვლინდა A511 და P100-შორის ცილების ამინომჟავური თანმიმდევრობის დონეზე. ასევე A511-ის ყველა სატრანსპორტო რნმ-ის მაკოდირებელი გენი იქნა იდენციფიცირებული P100-ის გენომში. ხოლო 50-60% ჰომოლოგია გამოვლინდა A511 და K-შორის. აღსანიშნავია, რომ LP65 და SPO1 ფაგები dot plot შედარებითი ანალიზით არ ავლენენ მსგავსებას ფაგი A511-თან, რაც მიუთითებს ამ ფაგების გენომების ევოლუციის დივერგენციაზე [81].

კვლევებმა აჩვენა, სავარაუდო მონაცემები იმისა, რომ ლიტერატურაში მოხსენიებული, ჯერ კიდევ დაუხასიათებელი მიოვირუსები, რომლებიც აინფიცირებენ არა მხოლოდ *Listeria*, *Staphylococcus* და *Bacillus*, არამედ სხვა გვარის წარმომადგენლებს, როგორცაა *Enterococcus* და *Bochothrix* [73, 90], შესაძლოა გაერთიანდნენ SPO1-მსგავსი ფაგების ჯგუფში.

უმრავლესობა SPO1-მსგავსი მიოვირუსების გენომის შედარებითი ანალიზი ჩატარებულია, რის საფუძველზეც შესაძლებელია ჩაითვალოს, რომ K წარმოადგენს

ცალკე მდგომ გვარს, რომელიც აინფიცირებს დაბალი G+C შენცველობის გრამ-დადებით ბაქტერიებს.

კონსტრუირებული იქნა გენომის ანალიზზე დაფუძნებული ტაქსონომიური ხე [133]. შესწავლილი იქნა რა 105 ბაქტერიოფაგის გენომით კოდირებული 3,981 ცილა, ნახეს რომ არცერთ ინდივიდუალურ გენს (ცალკე) არ აქვს ფუნქცია, რომელიც შესაძლოა კლასიფიკაციის სისტემის საფუძველს წარმოადგენდეს. ამის სანაცვლოდ კი, ტაქსონომიის სისტემის საფუძველი გახდა ფაგების პროტეომი [27]. გენომის მონაცემთა ბაზა 375 გენომიდან მოიცავს 16,260 გაშიფრულ ცილას. ვირუსების ტანქსონომიის საერთაშორისო კომიტეტის მიერ *Myoviridae* ოჯახის ფაგები დაჯგუფებული იქნა პროტეომიკური სისტემით, რომელშიც არ არის გაერთიანებული T4 და P4 კოლიფაგები, რადგან ესენი წარმოადგენენ ცალკე მდგომ ჯგუფს პროტეომიკურ ხეზე. მსგავსად ამისა, ფაგი K შესაძლოა იყოს ახალი ტაქსონომიური ჯგუფის წარმომადგენელი. გენომური ანალიზის საფუძველზე ფაგების კლასიფიკაციის გადასაგებამ, შესაძლოა აჩვენოს, რომ *Myoviridae*-ს ოჯახი გაცილებით მრავალფეროვანია, ვიდრე აქამდე იყო ჩათვლილი მათი ვიზუალური მახასიათებლის გამო.

თავი 3. ბაქტერიული ვირუსების ენდოლიზინები

როგორც ვიცით, ვირულენტური ბაქტერიოფაგების სასიცოცხლო ციკლის ლითიური გზა სრულდება პატრონი ბაქტერიების ლიზისით. ლიზისი კი არის შედეგი სპეციფიური მალიზირებელი ცილებით ბაქტერიული უჯრედის კედლის დაზიანებისა, რომელიც შესაძლოა, განხორციელდეს ორი გზით: 1. პეპტიდოგლიკანის (იგივე მურეინი) სინთეზის ინჰიბიცია მარტივი ცილებით (ბაქტერიოფაგები ერთჯაჭვიანი დნმ-ის ან რნმ-ის შემცველი გენომით) [10]. 2. პეპტიდოგლიკანის შრის ფერმენტული დახლეჩვა ჰოლინ-ენდოლიზინის სისტემით (ფაგები ორჯაჭვიანი დნმ-ის შემცველი დიდი გენომით) [174, 178].

ბაქტერიოფაგის გენომის ორგანიზაცია გენის ფუნქციის მიხედვით ანუ ტრანსკრიფციის დაწყების დროის მიხედვით ორგანიზდება სამ ჯგუფად - ადრეულ, შუალედურ და გვიან გენებად, სადაც გენების თითოეული ჯგუფი ხასიათდება სხვადასხვა რეგულატორული მექანიზმით. შუალედური გენები აკოდირებენ ფაგური დნმ-ის რეპლიკაციურ სისტემას, გვიანი გენები კი სტრუქტურული და მორფო-გენეტიკური ცილების სინთეზს. ხოლო ადრეული გენები პირდაპირ მონაწილეობენ პატრონი ბაქტერიული უჯრედების სასიცოცხლო სისტემის დაბლოკვაში.

ენდოლიზინები, როგორც ორჯაჭვიანი დნმ-ის მოლეკულის მქონე ბაქტერიოფაგის გენომით კოდირებული ფერმენტები, ფაგის ლითიურ ციკლში ადრეული გენების ექსპრესიის ბოლო საფეხურზე ახდენენ ბაქტერიული უჯრედის კედლის პეპტიდოგლიკანის შრის ჰიდროლიზს [102, 174].

ტერმინი ენდოლიზინი (იგივე ლიზინი) ცნობილია 1958 წლიდან და აღნიშნავს ცილოვან ნივთიერებას, რომელიც სინთეზირდება ინფიცირებულ ბაქტერიულ უჯრედში ფაგის რეპროდუქციის დროს და ახასიათებს უჯრედშიდა მოქმედება პეპტიდოგლიკანის შრეზე [70].

ლიზინი მკვეთრად განსხვავდება იმ ლითიური ფერმენტისაგან, რომელიც ვირიონის მუდმივი კომპონენტია და ბაქტერიაზე ადსორბციის დროს უჯრედის კედლის გარეთა ზედაპირზე აკეთებს ხვრელს, რათა გაატაროს ფაგის გენომი პატრონი უჯრედის შიგთავსისაკენ. ასეთი ფერმენტის კლასიკური მაგალითია T4 ბაქტერიოფაგის წანაზარდის ლიზოციმი [14, 76].

მურალიტიკური-მურეოლიტიკური ფერმენტები ხასიათდებიან ერთნაირი თვისებით - მათ სამიზნეს წარმოადგენს ბაქტერიული უჯრედის კედლის პეპტიდოგლიკანის შრე. ფერმენტების აქტივობის შედეგად ხდება მურეინის შრის დეგრადაცია და ბაქტერიული უჯრედის ლიზისის გზით ახალი ვირიონების გამოთავისუფლება.

მეცნიერთა ინტერესის საგანს წარმოადგენს ენდოლიზინების ევოლუციური განვითარება. ბაქტერიოფაგების ენდოლიზინებსა და მიკროოგანიზმების ლიტიურ ფერმენტებს (აუტოლიზინებს) შორის ფილოგენეზური ნათესაობა დაფუძნებულია მათი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების მნიშვნელოვან მსგავსებაზე [56]. ეს კი, მხარს უჭერს ფუნქციონალურად ქიმერული (ფაგი-ბაქტერია) სტრუქტურის მქონე ცილოვანი ნივთიერების წარმოქმნის თეზას, სადაც ერთი დომენი იქნება ფაგური წარმოშობის, მეორე დომენი - ბაქტერიული, ხოლო ძირითადი სტრუქტურა კი გენშიდა წარმოშობისაა [45, 46, 147]. მისი ნათელი მაგალითია, *Listeria* ფაგი PSA-ს [180] PlyPSA ენდოლიზინის ამიდაზური თვისება, იგი გენშიდა წარმომავლობისაა, რომელიც ძალიან მსგავსია *Bacillus cereus*-ის და *Clostridium perfringens*-ის ფაგების ენდოლიზინებისა. აღნიშნული მსგავსება შესაძლებელია, რადგან ამიდაზას სამიზნე-დამაკავშირებელი რეცეპტორული სისტემა ყველა ბაქტერიაშია, თუმცა სხვაობა არის შიდაპეპტიდურ ჯვარედინ ხიდაკებში და პეპტიდოგლიკანის ტიპში.

ენდოლიზინებსა და აუტოლიზინებს შორის ევოლუციური ნათესაობის ალტერნატიულ პროსტულატად შეიძლება ჩაითვალოს გენთა პორიზონტალური გადატანა ბაქტერიოფაგებსა და პატრონ ბაქტერიებს შორის [60].

ფერმენტის სპეციფიურობიდან გამომდინარე ენდოლიზინები ერთიანდებიან ხუთ ძირითად კლასში: 1. *N*-აცეტილმურამიდაზა (ლიზოციმი). 2. ენდო- β -*N*-აცეტილგლუკოზამინიდაზა. 3. ლიტიური ტრანსგლიკოზილაზა. 4. ენდოპეპტიდაზა. 5. *N*-აცეტილმურამოილ-L-ალანინ ამიდაზა [15, 50, 102].

3.1 ფერმენტის სტრუქტურა, ფუნქცია და მოქმედების მექანიზმი

სხვადასხვა კვლევების მონაცემებმა აჩვენა, რომ ენდოლიზინების უმრავლესობის ტიპური მახასიათებელია მათი მოდულარული სტრუქტურა. მხოლოდ რამდენიმე ცნობილ ენდოლიზინს აქვს სამგანზომილებიანი კრისტალური სტრუქტურა. ამის ყველაზე თვალსაჩინო მაგალითს წარმოადგენს T4 ფაგის ლიზოციმი - კარგად შესწავლილი მურამიდაზის პროტოტიპი, რომელიც ინტენსიურად გამოიყენება ყველა სახის მოლეკულურ და კრისტალოგრაფიულ სწავლებაში [137].

ასევე T7 ფაგის ამიდაზა, რომელიც ერთდომენიანი გლობულარული ცილაა [31], ავლენს ორმაგ ფუნქციას: უჯრედის ლიზისი და რნმ-პოლიმერაზას ინჰიბიცია [174].

დღეისათვის განსაზღვრულია კრისტალური სტრუქტურა PlyPSA ამიდაზისა, რომელიც *Listeria monocytogenes* ფაგი PSA-ს ენდოლიზინია [180]. მისი უჯრედის კედლის დამაკავშირებელი დომენი განიცდის შიდა დუბლიკაციებს-სპეციფიური სტრუქტურის სახით. კრისტალურ კონფორმაციას ასევე გამოიყენებს P1 ფაგის ლიზოციმი, რომლის საშუალებით ხდება დისულფიდური იზომერია, რასაც არააქტიური მდგომარეობიდან აქტიურ მდგომარეობაში გადაყავს ფერმენტი [172].

ენდოლიზინი ახორციელებს ორ ძირითად ფუნქციას: სუბსტრატის ამოცნობა და ფერმენტული ჰიდროლიზი. მოდულარული სტრუქტურის მქონე ენდოლიზინები სტრუქტურულად წარმოდგენილია ორი ფუნქციონალური დომენით (მოდულით): N-ტერმინალური კატალიზური დომენით და უჯრედის კედლის დამაკავშირებელი C-ტერმინალური მოდულით, რომელიც ლოკალიზებულია ფერმენტის C-ტერმინალური მიმართულებით სუბსტრატიდან [50, 102, 110].

N-ტერმინალური ფერმენტულად აქტიური დომენი, იგივე კატალიზური მოდული, განსაზღვრავს ორ განსხვავებულ, საბაზისო ფერმენტულ აქტივობას: გლიკოზიდაზების ჰიდროლიზი, რაც მდგომარეობს ფერმენტული მოქმედების კასკადით და ამიდაზების და პეპტიდაზების დაკავშირება ამიდების ან პეპტიდების ჯაჭვებთან და შიდაპეპტიდურ ხიდაკების დახლეჩვა.

ყველა აღწერილ ენდოლიზინებს შორის, უმრავლესობა წარმოადგენს ამიდაზებს და მურამიდაზებს. L-ალანოილ-D-გლუტამატ პეპტიდაზური აქტივობა აღმოჩენილი

იქნა *Listeria* ფაგში და რამდენიმე შიდაპეპტიდური ხიდაკ-სპეციფიური პეპტიდაზა შეიძლება იყოს პატრონი ბაქტერიის პეპტიდოგლიკან სპეციფიური გვარის ან სახეობის დონეზე. შესწავლილია ფაგის D-ალანოილ-გლიცილ ენდოპეპტიდაზა [119], რომელიც აინფიცირებს *Staphylococcus aureus*, სადაც პეპტიდოგლიკანის უნიკალურ თვისებას წარმოადგენს შიდაპეპტიდური ხიდაკების წარმოქმნა. კატალიზური დომენი უზრუნველყოფს ენდოლიზინის აქტივაციას ანუ დაბალი აქტივობის E-ფორმიდან გადაჰყავს სრული აქტივობის მდგომარეობაში C-ფორმაში [138, 162]. ასეთი კონფორმაციული ცვლილება ფერმენტისა ხდება მისი კრისტალური სტრუქტურის ხაჯზე [134].

ევოლუციური განვითარების გზაზე ენდოლიზინებმა შეიძინეს სუბსტრატ-სპეციფიურობის თვისება, რასაც უზრუნველყოფს C-ტერმინალური უჯრედის კედლის დამაკავშირებელი დომენი. სპეციფიურობა ეფუძნება ფერმენტის მიერ შერჩეულ სამიზნეს - პოტენციურ სუბსტრატს. ფერმენტის N-ტერმინალური დომენი არ არის აქტიური სუბსტრატის მიმართ, რადგან თვითონ არა აქვს საკმარისი სუბსტრატ-შესაბამისობა. ეს კი მიუთითებს, რომ ფერმენტის სპეციფიურობას და მაღალ შესაბამისობას სამიზნის მიმართ უზრუნველყოფს უჯრედის კედლის დამაკავშირებელი დომენი, რომელიც ხშირად ლოკალიზებულია C-ტერმინალზე [110]. ეს უკანასკნელი ამოიცნობს და უკავშირდება პეპტიდოგლიკანთან დაკავშირებულ ფერმენტ-სპეციფიურ ლიგანდს, რაც ზრდის ფერმენტ-სუბსტრატის დაახლოების ეფექტს. აღნიშნული სამიზნე-დამოკიდებული უნარი კი მეტყველებს ენდოლიზინების მაღალი ხარისხის სპეციფიურობაზე.

ამ დამოკიდებულებით გრამ-დადებით ბაქტერიებში ბაქტერიოფაგების ენდოლიზინების უჯრედის კედლის დამაკავშირებელი დომენი შეიძლება დასახიათდეს, როგორც კარბოჰიდრატ-დამაკავშირებელი დომენი, რომელიც მოქმედებს ლექტინის მსგავსად [110].

ტიპურად, ერთი ენდოლიზინი ახორციელებს ერთ განსაზღვრულ ფუნქციას, მაგ.: მურალიტიკური აქტივობა - მურამიდაზა, ტრანსგლიკოზილაზა, გლუკოზამინიდაზა, ენდოპეპტიდაზა ან ამიდაზა. თუმცა აღწერილი და დახასიათებული ბიოფუნქციური ფერმენტები, რომელთაც აქვთ ორი

ურთიერთდამოუკიდებელი ფუნქცია, მაგ.: *Staphylococcus aureus*-ის ფაგი φ11-ის ენდოლიზინი ენდოპეპტიდაზური და ამიდაზური აქტივობით ხასიათდება [30].

ძალზედ მნიშვნელოვანია ენდოლიზინ-განპირობებული ლიზისის მექანიზმი ფაგით ინფიცირებული პატრონი ბაქტერიებისა, რაც ინტენსიური კვლევის საგანს წარმოადგენდა ფაგ λ-ზე და ასევე სხვა კოლიფაგებზე [174].

ძირითადად, ენდოლიზინებს არ გააჩნიათ სეკრეტორული სიგნალები, გამომდინარე აქედან, მათი ხელმისაწვდომობა უჯრედის შიგნიდან პეპტიდოგლიკანის მიმართულებით რეგულირდება პატარა, ჰიდროფობული ცილებით-ჰოლინებით.

ბაქტერიოფაგით ინიცირებული ლიზისის მოდელის შესწავლამ ფაგ λ-ზე, აჩვენა, რომ ჰოლინის და ენდოლიზინის სინთეზი ხდება ბაქტერიული ვირუსის გვიანი გენების ექსპრესიის შედეგად.

უმრავლესობა წანაზარდიანი ფაგებისა ახორციელებენ ბაქტერიული უჯრედის თანმიმდევრულ ლიზისს ორი ძალიზირებელი ცილით - ენდოლიზინით და ჰოლინით. გენეტიკურად განსაზღვრულ მომენტამდე ენდოლიზინის მოლეკულები აკუმულირდებიან ციტოზოლში, ვიდრე ჰოლინის მონომერები სწრაფად გაერთიანდებიან ოლიგომერებად, ჩაჯდებიან ციტოპლაზმურ მემბრანაში და წარმოქმნიან ჰომო-ოლიგომერულ ფორებს მემბრანიდან პერიპლაზმის მიმართულებით, რომლითაც გაატარებენ ენდოლიზინებს [174, 175].

გენეტიკურად პროგრამირებული თანმიმდევრობით და სპეციფიური ჩამრთველი მექანიზმით - ჰოლინის ეფექტორული კონცენტრაცია და მემბრანის ნაწილობრივი დეპოლარიზაციის შედეგად უჯრედშიდა მაღალი ოსმოსური წნევის ხარჯზე ციტოპლაზმური მემბრანა სკდება და პროცესი სწრაფად მთავრდება ბაქტერიული უჯრედის ჰიპოტონიური ლიზისით [50, 51].

ასევე შესაძლებელია ჰოლინის რეგულაცია ინჰიბიტორებით, რომელიც ირთვება აქტიური ჰოლინის შიდამემბრანული კომპლექსით. ინჰიბიტორი ცილის ტრანსკრიფცია ჰოლინის მსგავსად ხდება იგივე ღია წაკითხვის ჩარჩოთი, თუმცა, ტრანსმემბრანული დომენის ფუნქციონალური თვისება დეფექტურია. უფრო მეტიც, ტრანსკრიფცია შესაძლოა მოხდეს ორმაგი AUG კოდონით გენის შიგნით, ხოლო

ინჰიბიტორი ცილის ტრანსლაცია შესაძლოა ინიცირებული იყოს გენ-შიდა, მეორე საინიციაციო კოდონით [165].

უმრავლესობა ცნობილ ენდოლიზინს არა აქვს პეპტიდური თანმიმდევრობის სიგნალი და მთლიანად დამოკიდებულია ჰოლინით ამოცნობაზე, რათა გამოთავისუფლდნენ პეპტიდოგლიკანის მიმართულებით. თუმცა, ბოლო კვლევებმა გამოავლინა პეპტიდური სიგნალის არსებობა *Oenococcus oeni* ფაგებში და *Lactobacillus plantarum* ფაგში Ogle [75, 141]. საინტერესო შემთხვევაა კოლიფაგი P1, რომლის თვისებებაც N-ტერმინალური სიგნალის დაჭერა და ამ სიგნალით ფერმენტი გადაადგილდება მემბრანაზე, სადაც ხდება დისულფიდური იზომერიზაცია. საინტერესოა, რომ P1-ის ჰოლინი აღმოჩენილი იქნა როგორც ჩამრთველი მექანიზმი უჯრედის მემბრანაზე ფერმენტის გააქტივებისა [172]. ლიპიდების შემცველი ბაქტერიული ვირუსები PRD1 წარმოადგენენ სხვა შემთხვევას, სადაც ენდოლიზინი დაკავშირებულია ვირუსულ მემბრანასთან.

უნდა აღინიშნოს, რომ გრამ-დადებით ბაქტერიულ უჯრედებში ბაქტერიულ ვირუსებს შესაძლოა ჰქონდეთ ორმაგი მოქმედება, როგორც ენდოლიზინური, ასევე ეგზოლიზინური (როგორც გაწმენდილი რეკომბინანტული ცილა) პეპტიდოგლიკანის შრის არსებობის გამო. ეს კი შესაძლებელს ხდის, რომ ენდოლიზინი გამოიყენებოდეს როგორც ალტერნატიული ანტიბაქტერიული საშუალება. ენდოლიზინების ეგზოგენური მოქმედება ბაქტერიულ უჯრედებზე (როგორც ანტიბაქტერიული რეკომბინანტული ცილა) ხასიათდება ლითიური აქტივობის ვიწრო სპექტრით. რაც განისაზღვრება სამი ძირითადი ფაქტორით: 1. უნიკალური უნარი, გახლიჩოს უჯრედის კედელი. 2. ფერმენტის აქტივაციის სპეციფიურობა. 3. სუბსტრატის ამოცნობის და უჯრედის კედელთან დაკავშირების მაღალსპეციფიურობა [99, 179].

მოქმედების ასეთი მექანიზმი არ აღინიშნება გრამ-უარყოფით უჯრედებში გარეთა მემბრანის არსებობის გამო, რაც ეფექტურად იცავს უჯრედს ჰიდროფილური ლითიური ფერმენტისაგან. საკმარისია რა, ლიპოპოლისაქარიდული შრე დაირღვეს, უჯრედები სწრაფადვე ხდებიან მგრძობიარენი მურეინით ჰიდროლიზის მიმართ.

ლიზისის სისტემები მცირე ზომის გენომის მქონე ვირუსებში სხვადასხვაგვარია. ფაგები Q β და ϕ X174 არ გამოიყენებენ ენდოლიზინებს კლასიკური

გაგებით, არამედ ასინთეზირებენ ცილებს, რომლებიც ერევა მურეინის ბიოსინთეზში *MraY* და *MurA* დაბლოკვით [11, 12], რომელთაც პირობითად ცილა-ანტიბიოტიკს უწოდებენ.

მნიშვნელოვანია ენდოლიზინები, რომლებიც ბოლო წლებში აღიწერა. ეს გახლავთ პატარა გენომის მქონე სტაფილოფაგების 44AHJD და P68 ამიდაზები [166]. ამ შემთხვევაში ფაგების გენომში ლიზისის გენები ლოკალიზებულია სტრუქტურული გენების სიახლოვეს.

ასევე აღწერილია სხვადასხვა სპეციფიურობის ენდოლიზინები ლაქტოკოკურ ბაქტერიოფაგებში [92]. აღმოჩენილია და შესწავლილია მურამიდაზების და ამიდაზების მაღალსპეციფიურობა ბაქტერიული ვირუსების გარკვეული ჯგუფის მიმართ.

სამიზნე-სპეციფიურობა ერთ-ერთი საინტერესო საკითხია ფაგების კვლევაში. აღსანიშნავია, რომ ფაგების ენდოლიზინებს, რომლებიც აინფიცირებენ გრამ-დადებით ბაქტერიებს, აქვთ ლიზისის ვიწრო დაიპაზონი, რაც შესაძლოა იყოს გვარ-სპეციფიური ან სახეობა-სპეციფიური [44, 130, 179].

3.2 ლიზინები, როგორც ანტიბაქტერიული აგენტები

ენდოლიზინების უნიკალური თვისება, მოახდინონ ბაქტერიული უჯრედის პეპტიდოგლიკანის შრის სწრაფი გახლეჩვა, ანიჭებს ამ ფერმენტს უპირატესობას, როგორც პოტენციურ ანტიბაქტერიულ აგენტებს.

სამიზნე რგოლები, რომლებიც ჰიდროლიზდებიან ენდოლიზინების საშუალებით, ლოკალიზებულნი არიან ბაქტერიული უჯრედის კედელში. ზოგჯერ ერთი წუთიც საკმარისია რეკომბინანტული ფერმენტისათვის, რათა ბაქტერიული სუსპენზიის სწრაფი ლიზისი გამოიწვიოს. თავისთავად არაჩვეულებრივი სუბსტრატ-სპეციფიურობა და მაღალაქტიურობა უზრუნველყოფს ენდოლიზინების სასურველ და წარმატებულ გამოყენებას ბიოტექნოლოგიასა და მედიცინაში.

ენდოლიზინები ავლენენ სინერგისტულ მოქმედებას, მაშინ როცა ორგანიზმ-სპეციფიკური ფერმენტები, რომელთაც აქვთ სხვადასხვა სუბსტრატ-სპეციფიურობა

კომბინირებულად მოქმედებენ [47, 101, 111]. ეს მოვლენა განსაკუთრებულად სასარგებლოა, მაშინ როდესაც სწრაფი ლიზისია სასურველი ან თუ ბაქტერიებს ლიზისის შენელებული კინეტიკა ახასიათებს.

მოქმედების მაღალსპეციფიურობის გამო ენდოლიზინებს აქვთ უნიკალური შესაძლებლობა, გამოყენებულნი იქნან ბიოლოგიური კონტროლის იარაღად არასასურველი ბაქტერიების წინააღმდეგ, ბუნებრივი ფლორის დაუზიანებლად. ყველაზე ნათელი მიდგომა ენდოლიზინების გამოყენებისა, გახლავთ პათოგენების ბიოლოგიური კონტროლი კვების მრეწველობაში, რაც გამოიხატება გასუფთავებული ფერმენტის პირდაპირი დამატებით საკვებ პროდუქტებში (ფიშეტი).

ნაკლებად ძვირი ალტერნატივა ფერმენტაციული ბაქტერიებით სპეციფიური ენდოლიზინების სეკრეციისა არის *Lactococcus lactis* [54] და *Lactobacillus spp.* ამ შემთხვევაში მასპინძელი ბაქტერიის პეპტიდოგლიკანი არამგრძნობიარეა ენდოლიზინის მიმართ.

თუმცა, ზოგიერთი პროდუქტის წარმოებისას მნიშვნელოვანია წარმოებული ფერმენტით უჯრედების თვითდესტრუქცია, რასაც უზრუნველყოფს ბაქტერიული უჯრედების გენომის ენდოლიზინის გენები, ახდენენ რა საკუთარი მურეინის დეგრადაციას. ეს თვისება მნიშვნელოვანია ყველის წარმოებაში, სადაც ხდება სტარტერი შტამების კონტროლირებადი ლიზისი [136, 157].

არანაკლებ საინტერესოა ენდოლიზინების გამოყენება (სოფლის მეურნეობაში) ტრანსგენულ მცენარეებში, სადაც ფაგის ენდოლიზინის გენების ექსპრესია ხდება. ამ მექანიზმის მოქმედების მთავარ მიზანია მცენარეებში ფიტოპათოგენური ბაქტერიების მიმართ რეზისტენტობის გაზრდა. ამის მაგალითია, T4 ფაგის კარტოფილის ლიზოციმი, რომელიც დაავადების გამომწვევის *Erwinia carotovora*-ს დეგრადაციას იწვევს [164].

მეტად მნიშვნელოვანია ენდოლიზინ-განპირობებული ლიზისის მექანიზმის გამოყენება განსაკუთრებულად საშიში პათოგენების, მაგ. *Bacillus anthracis* 119 -ის წინააღმდეგ *B.cereus*-ის ფაგის ფერმენტის გამოყენება [107], რაც შესწავლის საგანს წარმოადგენს.

ენდოლიზინის გაწმენდილი პრეპარატი (რეკომბინანტული ცილა) შესაძლებელია გამოყენებული იქნას, როგორც თერაპიული აგენტი გარეგანი

მოხმარებისათვის, სუფთა სახით ან კომბინირებულად ანტიბიოტიკთან ერთად. პირველადი კლინიკური შესწავლა წარმატებულად განხორციელდა სტრუქტოკოკებში თავების მოდელზე [30, 71, 99, 100, 120].

ასევე აღწერილია ფერმენტები, რომლებიც პოტენციურად სასარგებლოა თერაპიული თვალსაზრისით სხვადასხვა მუკოზური და ინფექციური დაავადებების წინააღმდეგ ცხოველებსა და ადამიანებში, როგორცაა *Enterococcus faecalis* ბაქტერიოფაგის ენდოლიზინი PlyV12 და *C. perfringens* ფაგის [179] ფერმენტი Ply3626. აღსანიშნავია, რომ ლიზოსტაფინი ფართოდ გამოიყენება *S.aureus*-ით გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ.

სტაფილოფაგების ლიზინები [108, 109] დღეისათვის დიდ მნიშვნელობას იძენენ სხვადასხვა ინფექციური დაავადებების წინააღმდეგ საბრძოლველად.

ენდოლიზინების გამოყენებას ბაქტერიული უჯრედების მიზანმიმართული დესტრუქციის გამომწვევებად, რის შედეგადაც ხდება შიდაუჯრედული სტრუქტურის გამოთავისუფლება შესაძლოა სხვადასხვაგვარი გამოყენება ჰქონდეს. მაგ. *Helicobacter* და *E.coli*-ის ცარიელი უჯრედების, როგორც სავაქცინე კანდიდატების წარმოება [59, 125].

ბოლო წლებში გაცილებით ღრმად იქნა შესწავლილი ბაქტერიული ვირუსების ენდოლიზინები ფიზიკო-ქიმიური და ფუნქციონალური თვალსაზრისით: მათი სამიზნე სპეციფიურობა, თვითრეგულაციები, ურთიერთქმედება სხვა უჯრედულ სისტემებთან.

ენდოლიზინების უნიკალური უნარი სწრაფად დახლიჩოს პეპტიდოგლიკანის შრე ფერმენტებს წარმოაჩენს, როგორც ახალი კლასის ანტიბაქტერიულ აგენტს, რაც უზრუნველყოფს ნორმალური მიკროფლორის დაზიანების გარეშე პათოგენური ბაქტერიების სელექციურ და სწრაფ ლიზისს.

გამომდინარე იქიდან, რომ ცოცხალ სამყაროში ბაქტერიოფაგები წარმოადგენენ ყველაზე მეტად გავრცელებულ თვითრეპლიცირებად ერთეულებს და მათი უმრავლესობა არის ენდოლიზინების სინთეზის უნარის მქონე წანაზარდიანი ფაგები - წარმოადგენენ უდიდეს რეზერვუარს იმ იარაღის (რეკომბინანტული ცილა) წარმოებისათვის, რომელიც პოტენციურად მეტად სასარგებლოა სხვადასხვა გამოყენების თვალსაზრისით ბიოტექნოლოგიასა და მედიცინის სფეროში.

დღეისათვის ფართო განხილვის საგანს წარმოადგენს გაწმენდილი რეკომბინანტული ლიზინების პროფიალექტიკური და სამკურნალო მიზნით გამოყენება ბაქტერიული ინფექციების წინააღმდეგ, განსაკუთრებით მათი პოტენციური გამოყენება მედიცინაში.

სამეცნიერო შრომებში აღწერილია ლიზინების წარმატებული გამოყენება თერაპიული თვალსაზრისით. ენდოლიზინების სასტარტო პრეკლინიკური გამოცდის შედეგებმა (*in vitro* და *in vivo* მოდელებში) [50, 71, 100, 144] გამოავლინა რამდენიმე სერიოზული, თეორიულად პოტენციური პრობლემა, ლიზინების ინფექციური დაავადებების სამკურნალოდ გამოყენების წინააღმდეგ. ეს შეეხება ორგანიზმის იმუნოგენურობას, ბაქტერიული ლიზისის შედეგად ანთებადი კომპონენტების გამოთავისუფლებას და რეზისტენტულობის გამომუშავებას.

სამკურნალო მიზნით ენდოლიზინების გამოყენებაში გასათვალისწინებელია ორგანიზმი მიერ ჰუმორალური იმუნური პასუხი, რომელიც შეიძლება, განვითარდეს ლიზინის, როგორც სისტემური, ასევე გარეგანი მოხმარებისას [51]. ამ გარემოებამ შესაძლოა გამოიწვიოს სრული დაბლოკვა ფერმენტის ანტიბაქტერიული მოქმედებისა, განსაკუთრებით ქრონიკული ინფექციების შემთხვევაში განმეორებითი ინექციებისას. მიუხედავად ამისა, გამოკვლევებმა თავებზე აჩვენა, რომ Cp1-1 ენდოლიზინის თერაპიული ეფექტურობა *in vivo* ძალიან უმნიშვნელოდ იზღუდება [100], უფრო მეტიც, განმეორებითი დოზა ფერმენტისა (პირველი დოზის მიღებიდან ათი დღის შემდეგ) იგივე ეფექტურობას ავლენს [71]. აღსანიშნავია, რომ ანტისხეულები, რომლებიც მიღებული იქნა ბოცვრების სტრეპტოკოკული და ციმბირის წყლულის ფაგების ენდოლიზინებით იმუნიზაციის შედეგად არ ანეიტრალებენ გამოყენებული ფერმენტის ანტიბაქტერიულ აქტივობას, შესაბამისად არ ხდება ლიზინის C-ტერმინალური დომენის დაკავშირება გამომუშავებულ ანტისხეულთან. ეს კი ადასტურებს ენდოლიზინების მაღალ შესაბამისობას უჯრედის კედელთან [51, 93].

ყველა შემთხვევაში პირველმა პრეკლინიკურმა გამოკვლევამ აჩვენა, რომ ენდოლიზინებით გამოწვეული იმუნოგენურობა გამოიხატება ანტისხეულების გამომუშავებით, მაგრამ ფაქტია, რომ ეს არ არის ხელმისაწვდომი ფაქტორი სისტემური ბაქტერიული ინფექციების სამკურნალოდ. ასევე აღსანიშნავია, რომ

ლითიური ენზიმების იმუნოგენურობა შესაძლებელია მნიშვნელოვნად შემცირდეს მისი პოლიეთილენგლიკოლთან დაკავშირებით, რაც აღწერილია ლიზოსტაფინის შემთხვევაში.

შესწავლის საგანს წარმოადგენს არსებული თეზა იმის შესახებ, რომ ლიზინის პირველადი დოზის შეყვანის შემდეგ, მათი სწრაფი ლითიური მოქმედების შედეგად, ბაქტერიების ლიზისი ხდება მანამ, ვიდრე გამომუშავდება ანტისხეულები.

თავგებზე ჩატარებულმა გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ უსაფრთხოების თვალსაზრისით ენდოლიზინები წარმოადგენენ უსაფრთხო ანტიბაქტერიულ აგენტებს, როგორც ადგილობრივი, ისე სისტემური მკურნალობისას [99, 100, 120]. ალერგიის ტესტის მიხედვით, ლიზინების ადგილობრივად მოხმარებისას არ აღინიშნება ეპითელური ქსოვილის დესტრუქცია და შესაბამისად, სხვა ჰისტოპათოლოგიური ანომალიები [51, 120]. უფრო მეტიც, ნაზალურად და ინტრავენულად ლიზინის დიდი დოზის მიღებისას თავგებში არ აღინიშნება ტოქსიურობა (გარეგნული ნიშნების, წონის და ქცევის შეფასებით) [100]. გამომდინარე იქიდან, რომ ეუკარიოტულ უჯრედების შმადგენლობაში პეპტიდოგლიკანი არ აღინიშნება, ეს გარკვეულწილად მიუთითებს, რომ ლიზინის გამოყენება სრულიად დასაშვები და უსაფრთხოა ადამიანებში [50, 51]. თუმცადა, აღსანიშნავია, რომ ზოგიერთი ლითიური ფერმენტი, განსაკუთრებით ენდოპეპტიდაზები შესაძლოა მოქმედებდნენ ძუძუმწოვრების ქსოვილებზე, ეს აღწერილია ლიზოსტაფინის შემთხვევაში, რომელიც გლიცინის მაღალი შემცველობის გამო იწვევს ელასტინის დეგრადაციას [126]. ადგილობრივი და სისტემური მკურნალობისას ლიზოსტაფინის სხვა გვერდითი ეფექტი აღწერილი არ არის [35, 37]. ზემოთ ნახსენებმა აღმოჩენამ შესაძლოა განავითაროს ეჭვი, რომ ბაქტერიოფაგების ენდოლიზინებს აქვთ უნარი ადამიანის ზოგიერთი ცილის დეგრადაციისა.

ენდოლიზინების მოხმარების უსაფრთხოებასთან დაკავშირებით ბაქტერიული ლიზისის დროს, მნიშვნელოვანია სხვადასხვა ანთების გამომწვევი კომპონენტების გამოთვისუფლების საკითხი. ეს შესაძლოა იყოს ენდოტოქსინები, თეიხოს ან ლიპოთეიხოსის მჟავები, პეპტიდოგლიკანი, რომელთა მასიურად გამოთავისუფლებამ შესაძლოა ისეთი სერიოზული გართულებები გამოიწვიოს როგორცაა, სეპტიური

შოკი, ან სხვადასხვა ორგანოს უკმარისობა [118]. თუმცა, საგულისხმოა, რომ ენდოლიზინებისა და ბაქტერიოფაგების არცერთ კვლევაში არ აღწერილა ბაქტერიულ ლიზისთან დაკავშირებული გვერდითი ეფექტები [71, 100]. ვირულენტური ფაგებით მკურნალობის დროს ასევე ხდება ბაქტერიული ლიზისი, მაგრამ ისინი აბსოლუტურად უსაფრთხო ანტიბაქტერიულ საშუალებებს წარმოადგენენ [153].

აღსანიშნავია, რომ ჯერჯერობით აღწერილი არ ყოფილა ლიზინების მიმართ რეზისტენტობის განვითარების არცერთი შემთხვევა. ეს ფერმენტები აუცილებელია ფაგების შემდგომი გენერაციის გამოთავისუფლებისათვის და ამისათვის ისინი უკავშირდებიან უჯრედის კედელში არსებულ სამიზნეებს, რომლებიც აუცილებელია ბაქტერიის სიცოცხლისუნარიანობისათვის [50, 51, 99]. აღნიშნულ თეორიას ამაგრებს ის, რომ პნევმოკოკური ფაგის ლიზინის რეცეპტორი არის ქოლინი, რომელიც აუცილებელია პნევმოკოკის სიცოცხლისუნარიანობისათვის. ენდოლიზინები ძირითადად თერმოსტაბილურ ცილებს წარმოადგენენ. მაგ.: Cp1-1 სტაბილურია 6 თვეზე მეტი 40 C-ზე, 3 კვირა 370 C-ზე და 30 წუთი 450 C-ზე [100]. ოპტიმალური pH შეესაბამება 4,0-6,0 [30, 100, 130, 163, 173]. ზოგიერთი ლიზინი კი ინარჩუნებს ანტიბაქტერიულ აქტივობას სისხლში, სადაც pH=7,4 [50, 71, 100].

დღეისათვის ძალიან მწვავედ დგას ანტიბიოტიკოთერაპიის კრიზისის საკითხი, რაც არის სამი ძირითადი ფაქტორის შედეგი: 1. ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიების რიცხოვნობის დრამატული ზრდა. 2. ახალი კლასის ანტიბიოტიკების დეფიციტი. 3. ფარმაკონდუსტრიიდან ახალი ანტიბიოტიკების შექმნის და განვითარების შეზღუდვა [9, 127, 146]. აქედან გამომდინარე ძალზედ აქტუალურია ახალი ანტიბაქტერიული აგენტების აღმოჩენა, რომელთაც ექნებათ ბაქტერიულ უჯრედებში მოქმედების ახალი სამიზნეები [127, 146]. ამ კუთხით ენდოლიზინები ძალზედ საიმედოდ გამოიყურებიან, რადგან მათი რეცეპტორები და მოქმედების მექანიზმი სრულიად განსხვავდება ტრადიციული ანტიბიოტიკების სამიზნეებისგან.

ლიზინებმა ასევე ეფექტურად გამოავლინეს ანტიბაქტერიული აქტივობა ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიების წინააღმდეგ: მათ შორის პენიცილინ-რეზისტენტული *S.pneumoniae* [71, 86, 99], MRSA [124] და ვანკომიცინ-რეზისტენტული *E.faecalis* და *E.faecium* [173] შტამების წინააღმდეგ.

ენდოლიზინების კიდევ ერთი მნიშვნელოვანი თვისება, რაც ნათლად განასხვავებს მათ ანტიბიოტიკებისაგან - ეს არის მათი ანტიბაქტერიული სპექტრი. ლიზინებში ანტიბაქტერიული სპექტრი არის ვიწრო, რადგან ეს ფერმენტი ფაგის მიერ გამომუშავდება კონკრეტული პატრონი სახეობის წინააღმდეგ. მაშინ როდესაც, ანტიბიოტიკებს აქვთ გაცილებით ფართო დიაპაზონი ანტიბაქტერიული აქტივობისა. ენდოლიზინებს არ ახასიათებთ არაპათოგენური ბაქტერიული მიკროფლორისა და მეორადი ინფექციების განვითარების წონასწორობის დარღვევა, როგორც ეს ხდება ანტიბიოტიკების შემთხვევაში. მიუხედავად ამისა, ცნობილია, რომ ერთ-ერთი ძირითადი ფაქტორი, რომელიც არეგულირებს მიკროფლორის წონასწორობას არის შიდასახეობრივი შეჯიბრი, რაც გულისხმობს ერთი სახეობის ბაქტერიის მიერ სხვა სახეობის ბაქტერიის ზრდის ინჰიბირებას [13]. ხოლო სამიზნე-სპეციფიური ლიზინი ბაქტერიების ლიზისით აღადგენს დარღვეულ წონასწორობას მიკროფლორაში.

ენდოლიზინები, როგორც ფაგო-სპეციფიური ფერმენტები ცნობილია უკვე 40 წელზე მეტია და პირველად, როგორც გარეგანი მოხმარების ანტიბაქტერიული აგენტები გამოყენებული იქნა 2001 წელს [49], რის შემდეგაც დადასტურებული იქნა მათი მაღალეფექტურობა. მას შემდეგ მრავალმა სამეცნიერო კვლევამ გამოავლინა ლიზინების პოზიტიური პოტენციალი გარეგანი და სისტემური მოხმარებისათვის.

მკვლევართა მონაცემების მიხედვით დღეისათვის წარმოდგენილია ენდოლიზინების აღმავლობის ნათელი სურათი, რაც წარმოაჩენს მათ, როგორც ახალი კლასის ანტიბაქტერიულ საშუალებებს, რომლებიც ფლობენ რამდენიმე ტიპურ თვისებას:

1. ძალიან სწრაფი *in vitro* და *in vivo* ანტიბაქტერიული მოქმედება, განსაკუთრებით გრამ-დადებით ბაქტერიებში.
2. მოქმედების სრულიად ახალი მექანიზმი - პეპტიდოგლიკანის შრის ფერმენტული გახლეჩვა.
3. ეფექტური ანტიბაქტერიული აქტივობა, მიუხედავად ბაქტერიების ანტიბიოტიკომგრძობელობისა.
4. ვიწრო ანტიბაქტერიული სპექტრი.
5. უსაფრთხოება მოხმარებისას.

ყველა ეს თვისება ანიჭებს ენდოლიზინებს საიმედო პოტენციალს, როგორც ანტიბაქტერიულ აგენტებს და იძლევა მათი განვითარების გარანტიებს. თეორიულად მათი იმუნოგენურობა და ბაქტერიული ლიზისის დროს ანთების გამომწვევი კომპონენტების გამოთავისუფლების უნარი უზრუნველყოფს მათ წარმატებულ გამოყენებას სხვადასხვა ინფექციური დაავადების სამკურნალოდ, ასევე უკუჩვენების მონაცემთა ნაკლებობა მიუთითებს მათი გამოყენების შეუზღუდველობაზე.

ლიზინების პოტენციური თერაპიული გამოყენება აღწერილი იქნა სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი K-ს ენდოლიზინ LyaK-ზე, რომელიც ხასიათდება ფართო სპექტრის ლითიური აქტივობით სტაფილოკოკური ინფექციების გამომწვევების მიმართ, მათ შორის MRSA შტამების წინააღმდეგ [124].

ასევე ნაჩვენებია იქნა, რომ ენდოლიზინების მოქმედების ეფექტურობა *in vitro* და *in vivo*, იზრდება ორი განმსხვავებული სპეციფიურობის მქონე ლიზინის კომბინირებული მოქმედებით. ამგვარი კომბინირებული მოქმედება სინერგისტულ მოქმედებას ავლენენ ბაქტერიული უჯრედის კედელზე [71, 101].

მნიშვნელოვანია, ისიც რომ ზოგიერთ შემთხვევაში ენდოლიზინები სინერგისტულ მოქმედებას ავლენენ ანტიბიოტიკებთან [47]. *In vitro* Cp1-1 ენდოლიზინმა აჩვენა სინერგიზმი პენიცილინთან ერთად, პენიცილინ-რეზისტენტული *S.pneumoniae* შტამების წინააღმდეგ. მაშინ როცა პენიცილინ-მგრძობიარე შტამების შემთხვევაში სინერგიზმი დაფიქსირებული არ იყო.

დღეისათვის არსებობს ახალი ანტიბაქტერიული საშუალებების აღმოჩენის გადაუდებელი საჭიროება. უნდა აღინიშნოს, რომ ბაქტერიოფაგები ეს არის დედამიწაზე ბიოლოგიურ ერთეულებს შორის ყველაზე მეტად გავრცელებული ჯგუფი [33, 169] და შესაბამისად, მათი ლიზისური ცილები წარმოადგენენ პოტენციური ანტიბაქტერიული აგენტების ძალიან მდიდარ და მრავალფეროვან ბუნებრივ წყაროს.

მეთოდოლოგია

თავი 1. კვლევებში გამოყენებული მასალები

წარმოდგენილი კვლევის შესასრულებლად გამოყენებულია ვირულენტური სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი Sb-1, რომელიც შერჩეულ იქნა გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორიის კოლექციიდან. ამავე კოლექციიდანაა Sb-1 ბაქტერიოფაგის უჯრედ-მეპატრონე, კერძოდ კლინიკური შტამი - *Staphylococcus aureus* 164.

კვლევაში გამოყენებულია სხვადასხვა მწარმოებლის მიერ მოწოდებული საკვები არეები და რეაქტივები:

1. Brain Heart Infusion ბულიონი/აგარი (Difco);
2. ტრიფტიკაზა სოიოს ბულიონი/აგარი (Becton Dickinson);
3. NY- საკვები ბულიონი; საფუარის ექსტრაქტი (Difco);
4. სინთეზური არეები: სპიზიზენის არე (SM) (Sigma);
5. C4-სპიზიზენის არე სხვადასხვა ამინომჟავების გჯუფებთან ერთად (ცხრილი 4);
6. რესტრიქციული ენდონუკლეაზები: Bgl II, EcoR I, EcoR V, Hind III, Pst I, Sca I, Cla I, Hpa II; დნმ-ლიგაზა, დნმ-აზა, რნმ-აზა.
7. პროტეინაზა K (NEB BioLabs);
8. სტანდარტული დნმ მარკერები: Lambda DNA-BstE II Digest, Lambda DNA-Hind III Digest, PCR Marker, 100 bp DNA Ladder (NEB BioLabs);
9. აგაროზა - ტიპი I (Sigma);
10. ბუფერი (x5 TBE) - Tris-HCl, Boric acid, EDTA;
11. ეთიდიუმის ბრომიდი (Sigma);
12. მემბრანული ფილტრები, ფორების ზომით 0,45 μ და 0,22 μ (Millipore);

13. პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციის რეაგენტები: Taq-პოლიმერაზა, Pfu-პოლიმერაზა, dNTP - თავისუფალი დეზოქსინუკლეოტიდების ნარევი (NEB BioLabs);
14. პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციის (PCR) პრამერები (Integrated DNA Technologies, Inc.)
15. ფაგის დნმ-ის გამოსაყოფი ნაკრები-High Pure Viral Nucleic Acid Qiagen Kit (QIAGEN, GmbH, Germany);
16. PCR პროდუქტის გასასუფთავებელი ნაკრები - QIAquick PCR Purification Kit; QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, GmbH, Germany);
17. პლაზმიდური დნმ-ის გამოსაყოფი ნაკრები - QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, GmbH, Germany);
18. ანტიბიოტიკი - ქლორამფენიკოლი, ამპიცილინი (Sigma);
19. ინდუქტორი - იზოპროპილ-β-D-თიოგალაქტოპირანოზიდი(IPTG) (Sigma);
20. წყალბადის რადიოაქტიული იზოტოპები: [³H]-ლეიცილი, 5[³H]-ურიდილი, [³H]-თიმიდილი;

ცხრილი 4. C4 სინთეზური არის ამინომჟავების ჯგუფები

ჯგუფი	ამინომჟავები			
I	არგინინი (Arg)	მეთიონინი (Met)	ცისტეინი (Cys)	ლიზინი (Lys)
II	ლეიცილი (Leu)	იზოლეიცილი (Ile)	ვალინი (Val)	
III	ტრიპტოფანი (Trp)	ფენილალანინი (Phe)	თიროზინი (Tyr)	
IV	თრეონინი (Thr)	ჰისტიდინი (His)	პროლინი (Pro)	გლუტამინი (Gln)
V	სერინი (Ser)	ალანინი (Ala)	გლიცინი (Gly)	

Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ანოტაციისათვის გამოყენებულია დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა, რომელიც ამჟამად ხელმისაწვდომია გენომის მონაცემთა ბაზაში საიდენტიფიკაციო ნომრით HQ163896.1.

Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ნუკლეოტიდური და ამინომჟავური თანმიმდევრობის ანალიზისათვის გამოყენებული იქნა სხვადასხვა კომპიუტერული პროგრამა: DNASTAR Lasergene 11.0, DNA Straidler™ 1,2., DNAMAN, Biology WorkBench 3.2 (LALIGN), GCG (Genetic Computer group), Finch TV 4.0., NCBI ვებგვერდით ხელმოსაწვდომი პროგრამები (ORF finder, BLASTn, BLASTp, tBLAST).

ნაშრომში გამოყენებული ვექტორული სისტემა pPW19-*E.coli* DH5 თავაზიანად იქნა მოწოდებული ბატონი ჩ. სტიუარტის მიერ (Rice University, ჰიუსტონი, ტეხასი).

თავი 2. ბაქტერიოფაგის გამრავლება, კონცენტრირება, გაწმენდა

2.1 *Sb-1* ბაქტერიოფაგის ბიოლოგიური თვისებების განსაზღვრა

Sb-1 ვირულენტური სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის პატრონ ბაქტერიულ უჯრედებზე (*Staphylococcus aureus* 164) გამრავლების ერთჯერადი ციკლის პარამეტრები (ადსორბციის ხარისხი, ლატენტური პერიოდის ხანგრძლივობა, ვირუსული ნაწილაკების გამოსავალი ერთი ინფიცირებული უჯრედის ლიზირებისას) შესწავლილია სტანდარტული მეთოდების გამოყენებით [89, 139]. რამდენადაც, Sb-1 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი არსებულ რეალობაშიც წარმოადგენს კომერციულ პრეპარატს, უწყვეტ რეჟიმში მიმდინარეობს მისი ბიოლოგიური აქტივობის მონიტორინგი და პასირება/ადაპტაცია ახლადგამოყოფილ კლინიკურ შტამებზე.

2.2 *Sb-1* ბაქტერიოფაგის გამრავლება და კონცენტრირება

Sb-1 ბაქტერიოფაგის მასპინძელს წარმოადგენს კლინიკური შტამი *Staphylococcus aureus* 164. მასპინძელ უჯრედებზე ფაგის გასამრავლებლად გამოყენებულია Brain-Heart infusion საკვები ნიადაგი (Difco). ოპტიმალური

ტემპერატურა შეადგენს 37°C. ფაგის კონცენტრატის მისაღებად გამოყენებულია როგორც ორშრიანი აგარის მეთოდი [139], ისე თხევადი არეში კულტივირება. Sb-1 ფაგის სუსპენზიის დიდი მოცულობით მისაღებად კულტივირება ხდებოდა (10 ლიტრიან) მინის ფერმენტორში, სინთეტურ თხევად არეში [139], 0,1% კაზეინის ჰიდროლიზატის და 0,1% საფუარის ავტოლიზატის დამატებით. *S.aureus* 164 უჯრედები აერირებით იზრდებოდა 5×10^8 უჯრედი/მლ კონცენტრაციამდე (ოპტიკური სიმკვრივე 590 ნმ-0.9-1.0) და 0.1 სიხშირით ინფიცირდებოდა Sb-1 ბაქტერიოფაგით; კულტივირება გრძელდებოდა 4-5 საათი. ფაგოლიზატის პირველადი გაწმენდა-კონცენტრირება ხორციელდებოდა იონმცვლელ DEAE-ცელულოზის სვეტში ქრომატოგრაფირებით და შემდგომი დიფერენციული ცენტრიფუგირებით (5000g, 18000g). ფაგის ვირიონები სუსპენდირდებოდა 1xSSC ბუფერულ ხსნარში (0.15mM NaCl, 0.015mM Na-ის ციტრატი, pH-7.0). Sb-1 ფაგის სუფთა პრეპარატის მისაღებად ვირიონები იწმინდებოდა CsCl-ის სიმკვრივის გრადიენტში ცენტრიფუგირებით.

თავი 3. ბაქტერიოფაგების გენომის კვლევა

3.1 ბაქტერიოფაგის დნმ-ის გამოყოფა

Sb-1 ბაქტერიოფაგის დნმ-ის პრეპარატის მიღებას ვახდენდით კლასიკური ფენოლ/ქლოროფორმით დეპროტეინიზაციის მეთოდით [139]. დნმ-ის გამოსაყოფად სუსპენზიის მინიმალური კონცენტრაცია შეესაბამება 10^8 - 10^9 ფაგური ნაწილაკი/მლ. თავდაპირველად ფაგის სუსპენზია მუშავდება (1მკგ/მლ) DNA-ზე, RNA-ზე-თი ერთი საათის განმავლობაში 37°C-ზე. ინკუბაციის შემდეგ სუსპენზიას ერევა საწყისი მოცულობის 1/10 ლიზისური ბუფერი (1% SDS, 10mM EDTA), ნარევეს ვაყოვნებით ოთახის ტემპერატურაზე 10 წუთის განმავლობაში. შემდეგ ვახდენთ სამეტაპიან დეპროტეინიზაციას ფენოლ/ქლოროფორმით:

1. ნარევს ემატება 1/1 მოცულობის ფენოლი. 10 წუთი ინტენსიური შენჯღრევის შემდეგ ნარევი 10წ 10.000გ-ზე ცენტრიფუგირდება.
2. სუპერნატანტს ემატება ფენოლ/ქლოროფორმი/იზოამილის სპირტის ნარევი (25:24:1). 10 წუთიანი ინტენსიური შენჯღრევის შემდეგ ცენტრიფუგირდება 10.000გ-ზე.
3. სუპერნატანტს თანაბარი მოცულობით ემატება ქლოროფორმი/იზოამილის სპირტი (24:1), ინჯღრევა და ცენტრიფუგირდება 10წ 10.000გ-ზე.

სუპერნატანტს ემატება 0,5 წილი ნატრიუმის აცეტატი (3/1 თანაფარდობით ძმარმჟავა/3M ნატრიუმის აცეტატი) და 0,2 წილი იზოპროპანოლი. დნმ გამოილექება ძაფისებური სახით, რის შემდეგაც ნარევი თავსდება -20°C-ზე მაქსიმალური პრეციპიტაციისათვის. შემდეგ ხდება მისი ცენტრიფუგირება 10წ 10.000გ-ზე. მიღებული ნალექის ირეცხება 70%-იანი ეთანოლით და ბოლო ეტაპზე ცენტრიფუგირების (10წ 10.000გ) შემდეგ ნალექის გაშრობა მიმდინარეობდა ოთახის ტემპერატურაზე, ეთანოლის აორთქლებამდე. გამშრალი დნმ იხსნება TE ბუფერში (10mM Tris-HCl, pH7,4; 1mM EDTA, pH8,0) .

ფაგის დნმ-ის გამოყოფა ასევე ხდებოდა მაღალი სისუფთავის ვირუსული ნუკლეინის ნჟავის გამოსაყოფი ნაკრებით (QIAGEN, GmbH, Germany);

მიღებულ პრეპარატში დნმ-ის კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით ვიზუალიზაციის გზით (გელ-ელექტროფორეზით) ან სპექტროფოტომეტრიულად (შთანთქმა 260 ნმ-ზე).

3.2 პლაზმიდური დნმ-ის გამოყოფა

pPW19 ვექტორული და რეკომბინანტული პლაზმიდის დნმ-ის პრეპარატს ვიღებდით როგორც კლასიკური მეთოდით [139], ასევე პლაზმიდური დნმ-ის გამოსაყოფი ნაკრებით (QIAGEN, GmbH, Germany);

ვახდენდით მიღებული პრეპარატის დამატებით გასუფთავებას სპეციალური დნმ-ის გასასუფთავებელი ნაკრების (QIAGEN, GmbH, Germany) გამოყენებით.

მიღებულ პრეპარატში დნმ-ის კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით ვიზუალიზაციის გზით (გელ-ელექტროფორეზით) ან სპექტროფოტომეტრიულად (შთანთქმა 260 ნმ-ზე).

3.3 დნმ-ის დამუშავება რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით

რესტრიქციული ანალიზისათვის გამოყენებული იქნა სხვადასხვა რესტრიქციული ენდონუკლეაზები - Bgl II, EcoR I, EcoR V, Hind III, Pst I, Sca I, Cla I, Hpa II.

დნმ-ის პრეპარატის დამუშავებას რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით ვახდენდით ფერმენტის მწარმოებელი ფირმის (New England Biolabs) მიერ მითითებულ სარეაქციო არეში. ექსპერიმენტის ხასიათიდან გამომდინარე ვახდენდით დნმ-ის მოლეკულის სრულ ან არასრულ ფრაგმენტაციას. საინკუბაციო ნარევის მოცულობა შეადგენდა (20-50მკლ), რომელიც შეიცავდა 1-5 მკგ დნმ-ს და 1-10 ერთეული აქტივობის ფერმენტს. ინკუბაცია მიმდინარეობდა 25-37°C ტემპერატურაზე 2-4 სთ ხანგრძლივობით. დნმ-ის არასრული ჰიდროლიზის დროს რეაქციას ვაჩერებდით სინჯის გადატანით დაბალ ტემპერატურაზე 0°C-მდე 0,1mM EDTA-ს დამატებით [139]. დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზის შედეგად მიღებული ფრაგმენტების ზომების შესაფასებლად ვიყენებდით გელ-ელექტროფორეზის მეთოდს და დნმ-ის სტანდარტულ მარკერებს: Lambda DNA-BstE II Digest, Lambda DNA-Hind III Digest, PCR Marker, 100 bp DNA Ladder (NEB BioLabs);

3.4 ჰორიზონტალური გელ-ელექტროფორეზი

ჰიდროლიზის შედეგად მიღებული დნმ-ის ფრაგმენტების ანალიზი ხდებოდა ჰორიზონტალური გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით. ვიყენებდით 0,8-1,2%-იან

აგაროზას (ტიპი I) გელს, x1 TBE (Tris-HCl; ბორის მჟავა; EDTA) ბუფერს [139]. ფორეზი მიმდინარეობდა ოთახის ტემპერატურაზე 3-6 სთ-ის განმავლობაში (120ამპ. 80-100 ვოლტი). გამოყენებული იქნა BIO-RAD მწარმოებლის აპარატი (SUB-CELL® GT). ფორეზის დასრულების შემდეგ გელს ვლენდით ეთიდიუმის ბრომიდის (0,1მკგ/მლ) წყალხსნარში, 20წთ-ის განმავლობაში. ვახდენდით აგაროზას გელის ფოტოგრაფირებას ულტრაიისფერი სხივების არეში წითელი შუქფილტრით (Kodak-Gel Logic112).

3.5 ოლიგონუკლეოტიდების (პრაიმერების) დიზაინი

ოლიგონუკლეოტიდების კონსტრუირებას ვახდენდით Sb-1 ბაქტერიოფაგის მატრიცული დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მიხედვით. ფაგის გენომში შერჩეული ფრაგმენტი სასურველი გენით ან გენებით მოიცავს რიბოსომა დამაკავშირებელ საიტს AAAGGAGG, რომელიც ლოკალიზებულია ადრეულ პრომოტორამდე 7-9 ნუკლეოტიდით ტრანსლიაციის ინიციაციის კოდონის წინ. გასათვალისწინებელია, რომ აღნიშნულ თანმიმდევრობაში არ შედიოდეს წინამდებარე გენის ტრანსკრიფციის ტერმინატორი, ხოლო დადმავალი თანმიმდევრობის დაბოლოება არ მოიცავდეს შემდეგ პრომოტორს. პრაიმერის 5'-ბოლოს ემატება კლონირებისათვის შერჩეული პლაზმიდის პოლილინკერის რესტრიქციული ენდონუკლეაზას საიტი, რომელსაც წინ უსწრებს ექვსი დამატებითი ნუკლეოტიდი თავისუფალი მოქმედებისათვის: 5' NNNNNNAGATCTXXXXXX, სადაც N შეესაბამება დამატებით ნუკლეოტიდებს, AGATCT შერჩეული ენდონუკლეაზას საიტს, ხოლო, XXXX... მატრიცული დნმ-ის ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას [140, 150, 168].

პრაიმერის დიზაინის დროს მკაცრად არის გასათვალისწინებელი, რომ კლონირებისათვის შერჩეული გენომის ფრაგმენტი არ შეიცავდეს კლონირებისათვის შერჩეული ენდონუკლეაზას საიტს, რადგან ფრაგმენტის მომზადება კლონირების პროცედურებისათვის გულისხმობს ფრაგმენტის დამუშავებას აღნიშნული ენდონუკლეაზით რათა მოხდეს მისი ლიგირება ვექტორული პლაზმიდის გენომში.

წინააღმდეგ შენთხვევაში, თუ დასაკლონირებელი ფრაგმენტი შეიცავს კლონირების ენდონუკლეაზას საიტს, მაშინ გამოვიწვევთ ფრაგმენტის არასასურველ ფრაგმენტირებას. ოლიგონუკლეოტიდის თანმიმდევრობაში ნუკლეოტიდებს შორის GC/AT თანაფარდობა დაცული უნდა იყოს და შეესაბამებოდეს თანაფარდობას 1/1, თუმცა დასაშვებია 40-60% GC შემცველობა, მაღალი პროცენტი ზრდის უფუნქციო საიტის ამოცნობის რისკ-ფაქტორს. აღნიშნული თანმიმდევრობა ასევე არ უნდა მოიცავდეს თვით-კომპლემენტარულ ნუკლეოტიდებს, რათა მაქსიმალურად შემცილებული იქნას მარყუქების წარმოქმნის სიხშირე. რადგან პოლიმერაზა ჯაჭვურ რეაქციაში გამოიყენება წყვილი პრაიმერი, ამიტომ წყვილ პრაიმერს არ უნდა ჰქონდეს ერთმანეთის მიმართ კომპლემენტარული ნუკლეოტიდები, რათა არ მოხდეს მათ შორის ჰიბრიდიზაცია [140]. ჩვენს მიერ კონსტრუირებული ოლიგონუკლეოტიდების ტესტირებისათვის გამოყენებული იქნა კომპიუტერული პროგრამა DNA Strider™ 1.2. კონსტრუირებული ოლიგონუკლეოტიდების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის ელექტრონული ვერსია იგზავნებოდა ავტომატური სეკვენირების ლაბორატორიაში (Integrated DNA Technologies, Inc.-IDT®), საიდანაც ვღებულობდით მზა ოლიგონუკლეოტიდებს ლიოფილიზირებული სახით. პრაიმერის ანოტაციის მიხედვით ვახდენდით კონცენტრაციის გადათვლას სამუშაო კონცენტრაციამდე.

3.6 პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია

ბაქტერიოფაგის გენომში შერჩეული გენის/ან გენების მომცველი ფრაგმენტების ამპლიფიკაციისათვის გამოყენებული იქნა პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია (PCR) [139]. პოლიმერაზა ჯაჭვურ რეაქციაში გამოყენებული იქნა Sb-1 ბაქტერიოფაგის დნმ (როგორც მატრიცული დნმ), Taq-დნმ პოლიმერაზა, თავისუფალი ნუკლეოტიდების ნარევი (dNTPmix-dATP/dCTP/dGTP/dTTP 10mM თითოეულის კონცენტრაცია), Sb-1 ბაქტერიოფაგის მატრიცული დნმ-ის თანმიმდევრობის მიხედვით შერჩეული წყვილი ოლიგონუკლეოტიდი.

ამპლიფიკაციის პროცესი განხორციელდა თერმული ციკლერის (MWGAG-BIOTECH) გამოყენებით. ამპლიფიკაციის პროცესი შედგებოდა ტემპერატურული დენატურაციის ორი განმეორებადი ციკლის შემდეგი თანმიმდევრობით:

1. ძირითადი თერმული დენატურაცია - 94°C, 30 წმ;
2. 5 ციკლი [თითოეული სამ სეგმენტად] - 94°C 30 წმ, 44°C 30 წმ, 72°C, 4 წთ;
3. 30 ციკლი [თითოეული სამ სეგმენტად] – 94°C 30 წმ, 50°C 30 წმ, 72°C, 2 წთ;
4. სრული ელონგაციისათვის ვახდენდით ელონგაციას 72°C 10წუთის განმავლობაში.

მიღებული ამპლიკონების გასუფთავებას ვახდენდით PCR პროდუქტის გასასუფთავებელი ნაკრებით (QIAquick-PCR purification Kit) ან აგაროზას გელიდან ამპლიკონის ამოჭრის შემდეგ გასასუფთავებელი ნაკრებით (QIAquick Gel Extraction Kit). პროცედურა სრულდებოდა მწარმოებლის მიერ მოწოდებული ანოტაციის მიხედვით. PCR პროდუქტის ანალიზს ვახდენდით 1-1.2% აგაროზას გელ-ელექტროფორეზით. ამპლიფიცირებული დნმ-ის ზომებს ვსაზღვრავდით სტანდარტული დნმ მარკერების გამოყენებით (Lambla DNA-BstE II Digest, PCR Marker, 100 bp DNA Ladder (NEB BioLabs));

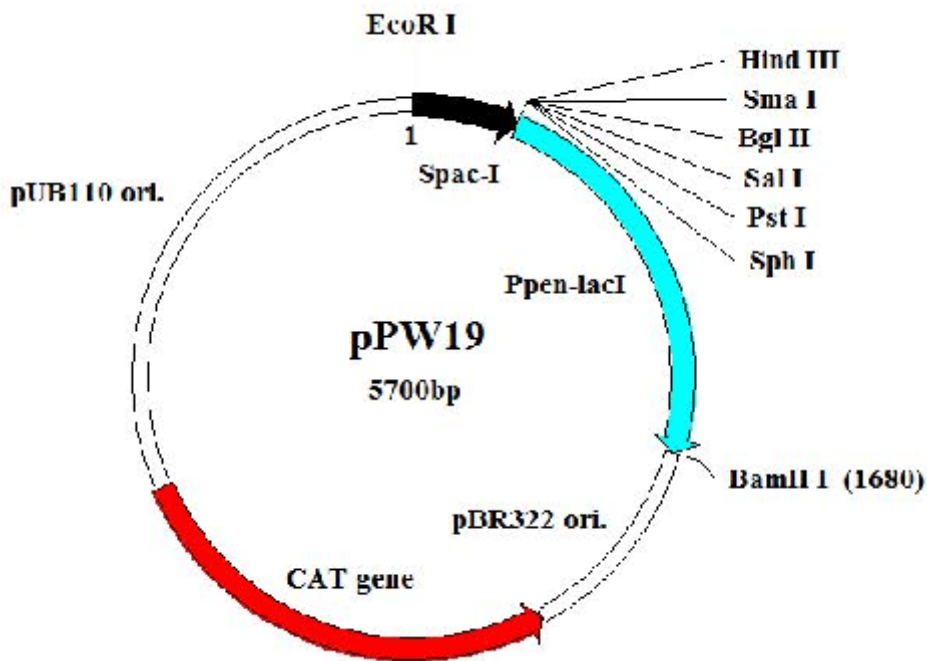
თავი 4. Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ფრაგმენტების კლონირება და რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების მიღება

4.1 pPW19 პლაზმიდა - როგორც ვექტორული სისტემა

Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომიდან პირობით-ლეთალური გენების კლონირებისათვის გამოყენებულია pPW19 – *E.coli* DH5 ვექტორული სისტემა, სადაც ვექტორულ პლაზმიდაში კლონირებული ფაგის დნმ-ის ფრაგმენტების შესაბამისი

ცილის სინთეზირებისათვის აუცილებელია არემი სპეციალური ინდუქტორის, იზოპროპილ-β-D-თიოგალაქტოპირანოზიდის (IPTG) თანაობა.

E.coli-B.subtilis ექსპრესიის ვექტორი pPW19 კონსტრუირებული იქნა Spac-I პოლილინკერის ინტეგრირებით pSI-1 პლაზმიდაში. Spac-I პოლილინკერი მოიცავს Spac-I პრომოტორს, რომლის ინიცირება ხორციელდება სპეციალური ინდუქტორის იზოპროპილ-β-D-თიოგალაქტოპირანოზიდის (IPTG) საშუალებით. Spac-I პრომოტორი წარმოადგენს SPO1 ფაგის PE5 ადრეული პრომოტორისა და *E. coli* ლაქტოზა (*lac*) ოპერატორის ჰიბრიდს, რომელიც წინ უსწრებს პოლილინკერს. პლაზმიდა ასევე მოიცავს *E.coli* LacI გენს, რომლის ინიცირებაც ექვემდებარება პრომოტორს და *Bacillus licheniformis* პენიცილინაზა გენის რიბოსომა დამაკავშირებელ საიტს. რეპლიკაციის დაწყება pBR322 და pUB110-დან ზღუდავს *E. coli* და *B. subtilis*-ის რეპლიკაციას. pPW19 პლაზმიდა შეიცავს ქლორამფენიკოლ-აცეტილტრანსფერეზას გენს (CAT gene) pC194-დან, რომელიც უზრუნველყოფს ანტიბიოტიკ ქლორამფენიკოლის მიმართ რეზისტენტულობას (სურათი 1) [140, 168].



სურათი 1. pPW19 პლაზმიდა ვექტორის სქემატური გამოხულება [140].

4.2 კლონირებისათვის გამოყენებული ბაქტერიების კულტივირება

კლონირებისათვის გამოყენებული ბაქტერიული შტამი *E.coli* DH5 იზრდებოდა ტრიფტიკაზა სოიოს მყარ და თხევად ნიადაგზე (Becton Dickinson). რეკომბინანტული პლაზმიდის შემცველი უჯრედების (რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების) სელექციისათვის ნიადაგს ემატებოდა ანტიბიოტიკი ქლორამფენიკოლი, საბოლოო კონცენტრაციით 10 მკგ/მლ. რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების ბაქტერიოციდული ეფექტის შეფასებისათვის ტრიფტიკაზა სოიოს აგარს ქლორამფენიკოლთან ერთად ემატებოდა გენის ექსპრესიისათვის აუცილებელი ინდუქტორი იზოპროპილ-β-D-თიოგალაქტოპირანოზიდი (IPTG) 0,1 mM კონცენტრაციით [139, 168].

უჯრედის სასიცოცხლო კომპონენტზე (დნმ, რნმ, ცილები) რეკომბინანტული ცილის მოქმედების მექანიზმის შესასწავლად რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების შემცველი შტამები იზრდებოდა შენელებული ზრდის რეჟიმით სხვადასხვა სინთეზურ არეებში: სპიზიზენის არე (SM) (Sigma), C4-სპიზიზენის არე (I-IV) ამინომჟავების გჯუფებთან ერთად, NY/C4 - საკვები ბულიონი და C4-სპიზიზენის არე 1:10 თანაფარდობით [140, 168].

4.3 ფაგის გენომის პირობით-ლეთალური გენების კლონირება pPW19 ვექტორულ სისტემაში და რეკომბინანტული პლაზმიდების ტრანსფორმაცია *E.coli* DH5 უჯრედებში

Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომიდან პირობით-ლეთალური გენის ან გენების მომცველი დნმ-ის ფრაგენტების კლონირებისათვის გამოყენებულია pPW19 – *E.coli* DH5 ვექტორული სისტემა.

პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციით ვახდენდით შერჩეული ფრაგმენტების ამპლიფიკაციას. მიღებული ამპლიკონების დეფოსფორიზაციისა და გაწმენდისათვის ვიყენებდით სპეციფიურ ნაკრებს (QIAquick PCR Purification Kit; QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, GmbH, Germany), რათა ფაგის გენომის ფრაგმენტი

გამოგვეყენებინა კლონირებისათვის. ამპლიფიცირებული ფრაგმენტის დამუშავებას ვახდენდით რესტრიქციული ენდონუკლეაზა Bgl II -ით. როგორც ზემოთ ავლინებთ (მეთოდები თავი 3., 3.5) ყველა გამოყენებული პრაიმერის 5'-დაბოლოებას წინასწარ გამიზნულად ემატებოდა კლონირებისათვის შერჩეული პლაზმიდის პოლილინკერის რესტრიქციული ენდონუკლეაზა Bgl II-ის საიტი (ATAGCT). რესტრიქციული ენდონუკლეაზა Bgl II -ით ამპლიკონის დამუშავების შედეგად მისი საიტის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა, როგორც ადაპტორი, უკავშირდება დნმ-ის ფრაგმენტის ორივე დაბოლოებას [140, 151, 167]. შემდეგ ვახდენდით ადაპტორი საიტებით აღჭურვილი დნმ-ის მომზადებას ლიგირებისათვის, რაც გულისხმობს დნმ-ის ფრაგმენტების დეფოსფორიზაციას და განმეორებით გაწმენდას.

ადაპტორი ფერმენტის Bgl II-ის შერჩევა, როგორც ავლინებთ მოხდა გამიზნულად, რადგან აღნიშნული ენდონუკლეაზას საიტი შედის მობილური (shuttle) ვექტორის pPW19-ის პოლილინკერში. შესაბამისად მოვახდინეთ pPW19 პლაზმიდის დნმ-ის დამუშავება იგივე რესტრიქციული ენდონუკლეაზა Bgl II-ით, დეფოსფორიზაცია, გაწმენდა. შემდგომ მომზადებული პლაზმიდის პოლილინკერის Bgl II ფერმენტის საიტთან მოვახდინეთ მომზადებული ფაგის გენომის ფრაგმენტების ლიგირება. ლიგირებისა და კლონირების პროცედურების მონიტორინგს ვახდენდით გელ-ელექტროფორეზით ვიზუალიზაციის საშუალებით, რათა დავრწმუნებულიყავით აღნიშნული პროცედურების წარმატებულად მიმდინარეობაში. მიღებული რეკომბინანტული პლაზმიდები ტრანსფორმირებული იქნა *E.coli* DH5 კომპეტენტურ უჯრედებში.

ლიგირების, კლონირების, ტრანსფორმაციის ექსპერიმენტებისათვის გამოყენებულ იქნა მოლეკულური ბიოლოგიის სტანდარტული მეთოდები [139].

ტრანსფორმაციის პროცედურის ბოლო საფეხურის (ინკუბაცია 37°C, 18სთ) შემდეგ ტრანსფორმანტების სხვადასხვა მოცულობა (0,1მლ, 0,15მლ, 0,2მლ) გადაგვქონდა ქლორამფენიკოლის 10მკგ/მლ შემცველ მყარ საკვებ არეზე (TC). ექსპერიმენტში ასევე ვიყენებდით დადებით და უარყოფით კონტროლებს. უარყოფით კონტროლად ვიყენებდით თვით-ლიგირებული პლაზმიდის (ფრაგმენტის გარეშე) ტრანსფორმანტებს. 18სთ ინკუბირების შემდეგ ვახდენდით 24-24 შესაძლო რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონის (ტრანსფორმანტების) დნმ-ის

ანალიზს, რათა რამოდენიმე კრიტერიუმით შეგვეფასებინა ტრანსფორმაციის შედეგი: პლაზმიდაში ფრაგმენტის ინტეგრირების მიმართულება 5'-3' თუ 3'-5' ან საერთოდ განხორციელდა თუ არა.

დადებითი შედეგის შემთხვევაში, რეკომბინანტული პლაზმიდების მატარებელი ბაქტერიული უჯრედებს ვამოწმებდით ლეთალური ეფექტის გამოვლენაზე. კერძოდ, კლონირებული ფაგის დნმ-ის ფრაგმენტების შესაბამისი ცილის სინთეზირებისათვის აუცილებელია არეში სპეციალური ინდუქტორის, იზოპროპილ-β-D-თიოგალაქტოპირანოზიდის (IPTG) დამატება, რომელიც იწვევს კლონირებული გენის ექსპრესიას და შესაბამისად, ციტოტოქსიური ცილის სინთეზირების შემთხვევაში ხდება კოლონიების წარმოქმნის ინჰიბირება.

ასევე ვიყენებდით ტრანსფორმანტების კვლევის ალტერნატიულ კლასიკურ გზას: ლეთალური აქტივობის მქონე რეკომბინანტული პლაზმიდების მატარებელი ბაქტერიული კლონების იდენტიფიცირებისათვის, ქლორამფენიკოლის (10მკგ/მლ) შემცველ არეზე (TC) გაზრდილი შესაძლო რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების კოლონიები პარალელური გათესვის რეჟიმით (replica plating) გადაგვექონდა როგორც ინდუქტორის (0,1 mM IPTG) შემცველ (TCI), ასევე უინდუქტორო მყარ ნიადაგზე (TC) [139]. შემდგომი კვლევებისათვის ვახდენდით მხოლოდ იმ კოლონიების სელექციას, რომლებიც პარალელური გათესვის დროს სიცოცხლისუნარიანობას ავლენდნენ უინდუქტორო არეზე და ვერ წარმოქმნიდნენ კოლონიებს ინდუქტორის (IPTG) თანაობისას. პირველ გენერაციაში შევარჩევდით რა კოლონიებს, რომელთა ზრდის ინჰიბირება ხდებოდა ინდუქტორის თანაობისას, ვახდენდით მათ საკონტროლო გადატანას უკვე მეორე გენერაციად, რადგან დაგვედასტურებინა ტრანსფორმაციის სტაბილურობა. დადებითი შედეგის შემთხვევაში ვახდენდით ტრანსფორმანტებიდან პლაზმიდური დნმ-ის პრეპარატების მიღებას და პლაზმიდაში ინტეგრირებული ფაგის ფრაგმენტის ორიენტაციის განსაზღვრას.

4.4 რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებში Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ფრაგმენტების იდენტიფიკაცია

4.4.1. რეკომბინანტული პლაზმიდების რესტრიქციული ანალიზი

რეკომბინანტულ პლაზმიდაში ინტეგრირებული ფაგის ფრაგმენტის იდენტიფიკაციას ვახდენდით რესტრიქციული ანალიზით. კერძოდ, განხორციელდა თუ არა ფაგის ფრაგმენტის ჩასმა პლაზმიდაში, როგორი მიმართულებით მოხდა ფრაგმენტის ინტეგრირება 5'-3' თუ საწინააღმდეგო (რევერსი) მიმართულებით, ან საერთოდ განხორციელდა თუ არა.

რადგან ჩვენთვის წინასწარ ცნობილი იყო პლაზმიდაში ჩასასმელი ფრაგმენტების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა, ეს საშუალებას იძლეოდა შეგვეჩია რესტრიქციული ენდონუკლეაზები Sb-1 ფაგის გენომის დასაკლონირებელი ფრაგმენტის ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობაში არსებული რესტრიქციული საიტების მიხედვით. აუცილებელ პირობას წარმოადგენდა ფაგის გენომის ფრაგმენტში ფერმენტის საიტის ლოკალიზაციის ასიმეტრიულობა, რათა წინასწარ მოგვეხდინა რეკომბინანტული პლაზმიდის დნმ-ის რესტრიქციის შედეგად მიღებული ფრაგმენტების ზომების გამოთვლა, როგორც 5'-3' მიმართულებით ჩასმის, ასევე საპირისპირო 3'-5' მიმართულების შემთხვევაში. პლაზმიდაში ინტეგრირებული ფრაგმენტის ორიენტაციის განსაზღვრა მნიშვნელოვან კრიტერიუმს წარმოადგენდა, რათა შემდგომი კვლევებისათვის შეგვეჩია სწორად კონსტრუირებული რეკომბინანტული პლაზმიდები, რითაც ვცდილობდით მინიმალურ დონეზე დაგვეყვანა საბოლოო შედეგების ცდომილების გადახრა.

4.4.2. რეკომბინანტული პლაზმიდის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გაშიფრვა (სეკვენირება)

რეკომბინანტული პლაზმიდების სწორად კონსტრუირების დასადასტურებლად ვახდენდით რეკომბინანტული პლაზმიდური დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გაშიფრვას, რათა მაქსიმალურად გამოგვეჩია მუტაციების არსებობა, რაც შესაძლებელია საფუძველი ყოფილიყო ციტოტოქსიური ეფექტის გამოვლენისა.

რეკომბინანტულ პლაზმიდაში კლონირებული ფრაგმენტის ზომიდან გამომდინარე ვახდენდით რეკომბინანტული პლაზმიდის დნმ-ის (primer walking sequencing) ფრაგმენტულ სეკვენირებას. აღნიშნული სეკვენირების დაწყება ხდებოდა pPW19 ვექტორი-პლაზმიდის ერთეული პრაიმერის საშუალებით (sequencing by single primer). საკვლევი დნმ-ის სეკვენირება მიმდინარეობდა ერთდროულად ორივე დაბოლოებიდან: დაღმავალი (Fp- u277; 5'-3') და აღმავალი (Rp- d238; 3'-5') პრაიმერის გამოყენებით, რათა საბოლოოდ გვენახა ორივე მიმართულებიდან გაშიფრული თანმიმდევრობების გადაფარვის ზონა. სეკვენირების ერთი საფეხური გულისხმობდა 500-700 ნუკლეოტიდის გაშიფვრა, შესაბამისად, ყოველ შემდეგ საფეხურზე მატრიცული დნმ-ის თანმიმდევრობის მიხედვით ვახდენდით მომდევნო 500-700 ნუკლეოტიდიანი ფრაგმენტისათვის საჭირო პრაიმერის დიზაინს. ეს პროცესი მიმდინარეობდა იმდენ საფეხურად, ვიდრე სრულად არ დაიფარებოდა რეკომბინანტული პლაზმიდის სრული გენომი.

სეკვენსის ანალიზს ვახდენდით კომპიუტერული პროგრამებით: DNA straidier™ 1,2 და Biology WorkBench 3,2. ანალიზი გულისხმობდა ემპირიულად მიღებული რეკომბინანტული პლაზმიდის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის ზუსტ შედარებას მატრიცული დნმ-ის (ხელოვნურად კონსტრუირებული რეკომბინანტული პლაზმიდის) ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობასთან.

რეკომბინანტული პლაზმიდების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის სეკვენირებას ვახდენდით ტეხასის უნივერსიტეტის (Rice University, ჰიუსტონი, ტეხასი) გენომის ცენტრში (Lone star Labs).

თავი 5. რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების ციტოტოქსიური ეფექტის შესწავლა

5.1 ფაგის გენომის კლონირებული ფრაგმენტების შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდების ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლა მყარ და თხევად არეზე

რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებში კლონირებული გენის ექსპრესიით გამოწვეულ ცვლილებებს ვსწავლობდით, როგორც მყარ ასევე თხევად პირობებში. კერძოდ, რეკომბინანტული ბაქტერიულ შტამს ვზრდიდით ქლორამფენიკოლის შემცველ (10მკგ/მლ) ფრიფტიკაზა სოიოს თხევად არეში, 18სთ, 37°C-ზე. კლონის სუსპენზია სერ იული განზავების მეთოდით (0, 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶) პარალელურად გადაგვქონდა როგორც ქლორამფენიკოლის (10მლგ/მლ) შემცველ უინდუქტორო მყარ არეზე (TC); ასევე ქლორამფენიკოლისა და ინდუქტორის 0,1 mM IPTG (IPTG-გენის ექსპრესიის მედიატორი) შემცველ მყარ არეზე (TCI) [139, 140, 150]. ორივე არეზე წარმოქმნილი კოლონიების რაოდენობის შეფასებით, კერძოდ, ინდუქტორიან არეზე წარმოქმნილი კოლონიების რაოდენობის განაყოფით უინდუქტორო არეზე წარმოქმნილი კოლონიების რაოდენობაზე (კოლონიები [+]*IPTG*/კოლონიები [-]*IPTG*) ვაფასებდით რეციპიენტი უჯრედების წარმოქმნის ეფექტურობას. ექსპერიმენტებში უარყოფით კონტროლად გამოყენებული იქნა *E. Coli* DH5 უჯრედები ცარიელი pPW19 ვექტორით (ინტეგრირებული ფრაგმენტის გარეშე) და ასევე რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონები 3'-5' ორიენტაციით ჩასმული ფაგის ფრაგმენტით (ანუ კლონები სადაც გენის ექსპრესია არ ხდება).

რეკომბინანტული პლაზმიდების ბიოლოგიურ აქტივობას ვსწავლობდით ასევე თხევად არეში. ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონის ზრდის პროცესში ინდუქციისას, მოხდებოდა რა გენის ექსპრესია, განაგრძობდა თუ არა ბაქტერიული კლონი ზრდას.

რეკომბინანტული ბაქტერიები იზრდებოდნენ ქლორამფენიკოლის შემცველ (10მკგ/მლ) ტრიფტიკაზა სოიოს ბულიონში 37°C-ზე. ადრეული ექსპონენციალური ფაზის კულტურას (ოპტიკური სიმკვრივე OD₆₀₀=0,8-0,9მ) ვყოფდით ორ ალიკვოტად,

სადაც ერთ დუბლიკატს ემატებოდა კლონირებული გენის ექსპრესიის ინდუქტორი, იზოპროპილ- β -D-თიოგალაქტოპირანოზიდი (IPTG), საბოლოო კონცენტრაციით 0,1 mM. ინდუქტორის დამატება მიჩნეული იყო გენის ექსპრესიის ნულოვან წერტილად. ნულოვანი წერტილიდან ანუ ინდუქტორის დამატებიდან სამი საათის განმავლობაში 30 წუთიანი ინტერვალით ვახდენდით ბაქტერიების ზრდის მონიტორინგს ოპტიკური სიმკვრივის განსაზღვრის მეთოდით. ექსპერიმენტში ვიკვლევდით რეკომბინანტული კლონების ბიოლოგიურ აქტივობას ინდუქტორის დამატებამდე (ნულოვანი წერტილი) და ინდუქტორის დამატებიდან 3 და 24 საათის განმავლობაში. ამისათვის საკვლევი სინჯები, როგორც ინდუქტორიანი ალიკვოტი ასევე უინდუქტორო ალიკვოტი დროის რამოდენიმე წერტილზე: 0, 3 და 24 სთ-ში გადაგვქონდა უინდუქტორო მყარ არეზე (TC), რათა შეგვეფასებინა სითხეში ინდუქციის შედეგად გადარჩენილი სიცოცხლისუნარიანი ბაქტერიების რაოდენობა [140, 167, 168].

სითხეში ინდუქციის შედეგად გადარჩენილი-სიცოცხლისუნარიანი ბაქტერიების შეფასებას ვახდენდით ინდუქციიდან სამი და 24 საათის შემდეგ სიცოცხლისუნარიანი ბაქტერიების რაოდენობის განაყოფით ინდუქციამდე ბაქტერიების რაოდენობაზე (ნულოვანი წერტილი).

5.2 რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებში უჯრედული ცილების, დნმ-ისა და რნმ-ის სინთეზის სიხშირის განსაზღვრა რადიოაქტიული იზოტოპებით მონიშვნის მეთოდით

რეკომბინანტული ბაქტერიული უჯრედების გამრავლების უნარის შეფასებას ვახდენდით რადიოაქტიული იზოტოპებით მონიშვნის მეთოდით. კერძოდ, რეკომბინანტული ბაქტერიების უჯრედული ცილების, დნმ-ისა და რნმ-ის სინთეზირების სიხშირის გაზომვას ვახდენდით თხევად არეში (C4/NY), წყალბადის რადიოაქტიული იზოტოპებით. აღნიშნული მეთოდი გულისხმობს ზრდის ექსპონენციალური ფაზის ბაქტერიული უჯრედებისა და რადიოაქტიული იზოტოპების ნარევის ინკუბაციას დროის განსაზღვრული პერიოდით [140, 167, 168].

თიმიდინი, როგორც დნმ-ის სინთეზის პრეკურსორი უკავშირდება დნმ-ის სინთეზირებულ მოლეკულას, შესაბამისად, რაც მეტი დნმ სინთეზირდება უჯრედში, მით მეტი თიმიდინის ჩართვა ხდება მის მოლეკულაში. დნმ-ის მოლეკულასთან დაკავშირებული თიმიდინის რაოდენობის განსაზღვრით ხდება უჯრედში დნმ-ის სინთეზირების სიხშირის შეფასება. ამისათვის გამოყენებული იქნა თიმიდინი, რომლის მოლეკულაში წყალბადის ატომები ჩანაცვლებულია წყალბადის რადიოაქტიური იზოტოპი ტრიტიუმით - [³H].

ექსპონენციალური ფაზის ბაქტერიული სუსპენზიისა (ოპტიკური სიმკვრივე OD₆₀₀=0,8-0,9ნმ) და [³H]-თიმიდინის ნარევის სამი წუთით ინკუბაციის შედეგად [³H]-თიმიდინის მაქსიმალური რაოდენობა უკავშირდება ამ დროში სინთეზირებული დნმ-ის მოლეკულას.

უჯრედული ცილებისა და რნმ-ის სინთეზირების სიხშირის გაზომვას ვახდენდით იგივე პროცედურით, მხოლოდ უჯრედული ცილების მოსანიშნად გამოიყენებოდა [³H]-ლეიცინი, რნმ-ისათვის კი 5[³H]-ურიდინი.

საკვლევი დნმ-ის მოლეკულასთან დაკავშირებული [³H]-თიმიდინის რაოდენობის განსაზღვრისათვის ვახდენდით სინჯში დნმ-ის სეპარაციას [³H]-თიმიდინის დაუკავშირებელი მოლეკულებისაგან. ამისათვის ვიყენებდით 10% TCA (C₂HCl₃O₂).

რადიოაქტიური იზოტოპით სამწუთიანი მონიშვნის პროცედურის აღწერა:

პროცედურის დაწყებამდე წინასწარ ვამზადებდით რადიოაქტიური იზოტოპის სამუშაო კონცენტრაციის ხსნარს, რომელსაც ვათავსებდით ყინულის აბაზანაში და საკვლევი სინჯის შეტანამდე 5-10 წუთით ადრე გადაგვქონდა 37°C-ზე.

რეკომბინანტულ ბაქტერიულ შტამს ვზრდიდით ქლორამფენიკოლის შემცველ (10მკგ/მლ) C4/NY თხევად არეში, აერაციის პირობებში (100rpm), 37°C-ზე, სადაც თითოეული საკვლევი სინჯი იყოფოდა ორ ალიკვოტად. ბაქტერიული სუსპენზიის ოპტიკური სიმკვრივის განსაზღვრას ვახდენდით 30 წუთიანი ინტერვალით, მიაღწევდნენ რა ბაქტერიები ზრდის ექსპონენციალურ ფაზას (ოპტიკური სიმკვრივე OD₆₀₀=0,8-0,9ნმ), სინჯის ორივე ალიკვოტიდან საკვლევი მოცულობა გადაგვქონდა

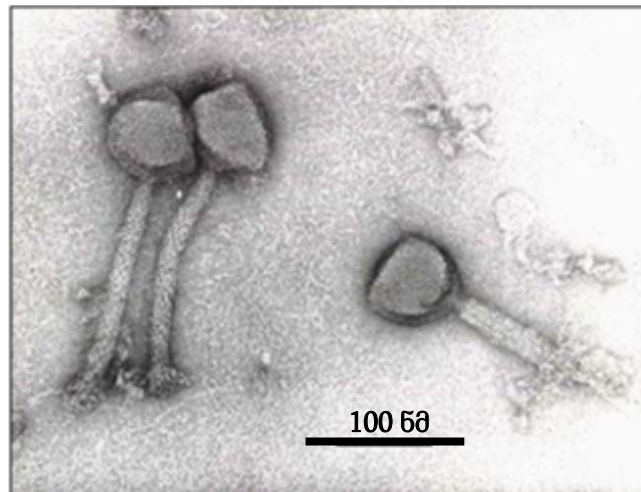
წინასწარ მომზადებულ შესაბამისი რადიოაქტიული იზოტოპის არეში, ამავდროულად ცდის ერთ დუბლიკატში სწრაფად შეგვექონდა კლონირებული გენის ექსპრესიის ინდუქტორი, იზოპროპილ- β -D-თიოგალაქტოპირანოზიდი (IPTG), საბოლოო კონცენტრაციით 0,1 mM. ვაგრძელებდით ინკუბაციას და რადიოაქტიული იზოტოპით მონიშვნის პროცედურა სინჯს უტარდებოდა ინდუქტორის შეტანიდან დროის რამოდენიმე ინტერვალში: 30, 60, 120, 180 წთ.

მაკრომოლეკულების მონიშვნის პროცედურა მიმდინარეობდა აერაციის პირობებში 37°C-ზე სამი წუთის განმავლობაში. შემდეგ რეაქციის შესაჩერებლად სინჯი გადაგვექონდა 0°C-ზე არაუმეტეს 2 საათის ხანგრძლივობით. მონიშნული დნმ-ის მოლეკულების პრეციპიტაციას ვახდენდით ცივი 10% TCA ($C_2HCl_3O_2$)-ის დამატებით. შემდეგ სინჯი იფილტრებოდა 0,45 μ m (Millipore) ნიტროცელულოზის ფილტრში წნევის ქვეშ. ფილტრის ჩარეცხვას ვახდენდით 0,3% TCA, რომელიც მომზადებული იყო ნატრიუმის ციტრატის ბუფერში (0,015M NaCl; 0,0015M NaCitate). სინჯიან ფილტრებს გაშრობის შემდეგ ვათავსებდით ცელულოზის სპეციალურ ჩანთებში, სადაც ემატებოდა სასცინტილაციო სითხე, ვახდენდით აირის ბუშტების გამოდევნას და ჩანთის ჰერმენტიზაციას, რომელსაც საბოლოოდ ვათავსებდით სცინტილაციური მთვლელის (LS 3801 Beckman) ფლაკონებში.

შედეგები

თავი 1. სტაფილოკოკური Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის დასახასიათება

ვირულენტული სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი Sb-1 გაერთიანებულია Twort-მსგავსი ვირუსების გვარის, *Spounavirinae* ქვეოჯახად წოდებულ, SPO-1-მონათესავე ბაქტერიოფაგების დიდი გენომის მქონე მიოვირუსების ჯგუფში. Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის გაშიფრული ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა (127,188 ნწ) საიდენტიფიკაციო ნომრით - ID-HQ163896.1 განთავსებულია გენომის საერთაშორისო მონაცემთა ბაზაში [1, 87, 89].



სურათი 2. სტაფილიკოკური ბაქტერიოფაგი Sb-1 (ელექტრონული მიკროგრაფია)

1.1 ღია წაკითხვის ჩარჩოების (ORF) იდენტიფიკაცია

Sb-1 ბაქტერიოფაგის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის ანალიზისათვის გამოყენებული იქნა სხვადასხვა კომპიუტერული პროგრამები. DNA Straider™ 1,2., და NCBI ვებ-გვერდით ხელმოსაწვდომი პროგრამებით (ORF finder, BLASTn, BLASTp, tBLAST) მოვახდინეთ გენომში ღია წაკითხვის ჩარჩოების (ღწჩ) რაოდენობის განსაზღვრა.

Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის სრული ორჯაჭვიანი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა, რომელიც შეესაბამება 127,188 ნუკლეოტიდურ წყვილს გადატანილი იქნა რესტრიქციულ რუკაზე, რომელზეც მონიშნული იქნა ყველა სავარაუდო ღია წაკითხვის ჩარჩოს ინიციაციისა (ATG, GTG, TTG) და ტერმინაციის (TAG, TGA, TAA) კოდონის პოზიციები, ორივე 5' 3'-და საწინააღმდეგო მიმართულებით. კვლევის შედეგად იდენტიფიცირებულ იქნა 801 ღწჩ. აქედან დაღმავალი (5'-3') მიმართულებით განღაგებულია 404, ხოლო საპირისპირო (3'-5') მიმართულებით 397 (ღწჩ). თითოეული ღია წაკითხვის ჩარჩოს გაშიფრვას ვახდენდით ზომისა და ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის სტრუქტურის მიხედვით, რის შედეგადღაც 801 ღია წაკითხვის ჩარჩოს შორის იდენტიფიცირებული იქნა 183 პოტენციურად ცილის მაკოდირებელი ღია წაკითხვის ჩარჩო, რომელთაგანღაც 123 განღაგებულია 5'-3' მიმართულებით, ხოლო 60 კი აღმავალი მიმართულებით; ასევე აღნიშნულ 183 ღია წაკითხვის ჩარჩოს შორის შერჩეული იქნა რიბოსომა დამაკავშირებელი საიტით აღჭურვილი 59 ღია წაკითხვის ჩარჩო; მათ შორის 48-ს ახასიათებს ზუსტად გამოხატული რიბოსომა დამაკავშირებელი საიტი. ეს საიტი შეესაბამება 6-10 ნუკლეოტიდით ტრანსლიაციის საინიციაციო კოდონის (ATG, TTG, GTG) წინ შაინ-დაღგარნოს კონსენსუს თანმიმდევრობას **AAAGGAGG**. სწორედ ამ საიტს უკავშირდება რიბოსომა ინფორმაციულ რნმ-ზე. მსგავსი სტრუქტურის გენი (3'-5') მიმართულებით იდენტიფიცირებული იქნა მხოლოდ ერთი.

1.2 ადრეული პრომოტორების და ტრანსკრიფციის ტერმინაციის კოდონების იდენტიფიკაცია

როგორც ავღნიშნეთ, Sb-1 ბაქტერიოფაგი გაერთიანებულია SPO1-მსგავსი მიოვირუსების ოჯახში, შესაბამისად, ადრეული პრომოტორების საიდენტიფიკაციოდ Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობაში ვახდენდით SPO1 ბაქტერიოფაგის ადრეული პრომოტორების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის ჰომოლოგიური თანმიმდევრობების სკრინინგს

[85, 86, 150, 151]. კერძოდ, SPO1 ბაქტერიოფაგის ადრეული პრომოტორების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა შეესაბამება თანმიმდევრობას: TTGACW (N18) ATAAT, სადაც W-ს ანაცვლებს ადენინი ან თიმინი. შედეგად, Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში იდენტიფიცირებული იქნა 27 მსგავსი თანმიმდევრობა ზუსტად იმ პოზიციაზე, სადაც მოიაზრებოდა ადრეული პრომოტორის არსებობა: ტრანსკრიფციის ტერმინატორის სიგნალსა და მომდევნო გენის რიბოსომა დამაკავშირებელ საიტს შორის, ან ერთი გენის ტერმინაციის კოდონსა და მომდევნო გენის რიბოსომა დამაკავშირებელ საიტს შორის (ცხრილი 6). აღწერილი მეთოდით მოვახდინეთ ადრეული პრომოტორების იდენტიფიცირება, ხოლო გენები, რომელთა ინიციაციას ახდენდნენ ადრეული პრომოტორები ყოველ მომდევნო ტერმინაციის სიგნალამდე წარმოადგენენ ე.წ. ადრეულ გენებს. აღნიშნული კრიტერიუმით ადრეულ გენებად იდენტიფიცირებული იქნა გენები, რომლებიც უშუალოდ მოსდევნენ ადრეულ პრომოტორს, რომელიც სრულად აკმაყოფილებს ადრეული პრომოტორის კონსესუს ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას [150, 151].

ფაგის გენომის ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობაში ტრანსკრიფციის ტერმინატორების რაოდენობის განსაზღვრისათვის, გამოვიყენეთ კომპიუტერული პროგრამა GCG (Genetic computer group), კვლევის შედეგად იდენტიფიცირებული იქნა 10 ტრანსკრიფციის ტერმინატორი (ცხრილი 5).

ცხრილი 5. ტრანსკრიფციის ტერმინაციის კოდონები Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში

ტერმინაციის კოდონი	პოზიცია ფაგის გენომში
1	695..703
2	10104..10133
3	27010..27040
4	39909..39937
5	42436..42469
6	52069..52098
7	54572..54604
8	64640..64664
9	78920..78950
10	106940..106969

თავი 2. Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში ფაგოსპეციფიური პირობით- ლეთალური გენების იდენტიფიცირება და რეკომბინანტული პლაზმიდების შემცველი ბაქტერიული კლონების დიზაინი

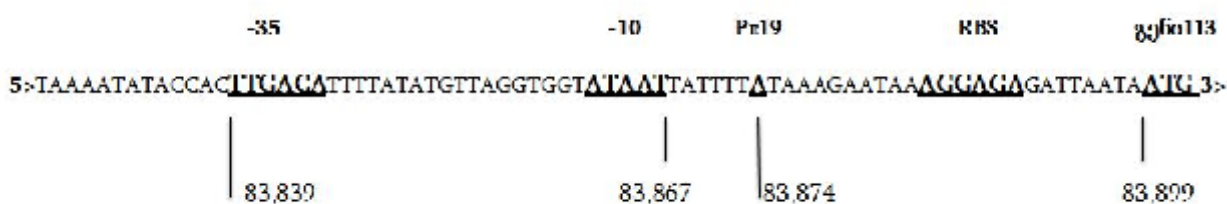
2.1 ადრეული პრომოტორით ინიცირებული გენების იდენტიფიცირება

კვლევის მიზნებიდან გამომდინარე მოვახდინეთ Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში იდენტიფიცირებული ყველა ადრეული პრომოტორით ინიცირებული გენების სკრინინგი. კერძოდ, ვახდენდით იმ ადრეული პრომოტორების სელექციას, რომელთა მიერ კოდირებულ გენებს შორის არ იყო გადაფარვა. ანუ ერთი გენის ტერმინაციულ კოდონს მოსდევდა შემდეგი გენის სასტარტო კოდონი. შედეგად, Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში შერჩეული იქნა ოთხი გენი: 113, 114, 115, 116, რომელთა ინიცირება ხდება ერთი ადრეული პრომოტორით (PE19). გენი 113-ის ინიციაციის კოდონის (ATG) პოზიცია Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში შეესაბამება 83,899-ს, ხოლო ტერმინაციის ტრიპლეტის (TAA) პოზიციაა 84,936. შემდეგი მომდევნო გენი 114-ის სასტარტო კოდონი იწყება ზუსტად 84,936 პოზიციაზე, ანუ გენი 114-ის საინიციაციო კოდონის პირველი ნუკლეოტიდი ადენინი წარმოადგენს გენი 113-ის ტერმინაციის კოდონის მესამე ნუკლეოტიდს (ცხრილი 7). მსგავსი სიზუსტით არის წარმოდგენილი მე-19 ადრეული ოპერონით ინიცირებული დანარჩენი ორი გენი: 115 და 116 (ცხრილი 7) [150, 168]. შესაბამისად, აღნიშნული გენები არ მოიცავენ ერთმანეთის გადამფარავ ფრაგმენტებს და მათი რეგულაცია აბსოლუტურად ინდივიდუალურია, რაც თავისთავად გამორიცხავს ქიმერული ცილების სინთეზს.

ცხრილი 7. PE19 ადრეული ოპერონით ინიცირებული გენები

გენი	პოზიცია გენომში	ფაგის	ინიციაციისა და ტერმინაციის კოდონები	ზომა (ნწ)
გენი 113	83899-84936		ATG-TAA	1038
გენი 114	84936-85313		ATG-TAA	378
გენი 115	85313-87232		ATG-TAA	1920
გენი 116	87232-87828		ATG-TAG	597

აღნიშნული გენები (113, 114, 115 და 116) დაუყონებლივ მოსდევენ PE19 ადრეულ პრომოტორს, რომელიც სრულად აკმაყოფილებს ადრეული პრომოტორის შეთანხმებულ ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას [-35 TTGACA (N15-17) -10 TATAAT]. შერჩეული ადრეული პრომოტორი (PE19) ხასიათდება აქტიური რიბოსომა დამაკავშირებელი საიტით AAAGGAGA, რომელიც ლოკალიზებულია პირველი გენის სასტარტო კოდონის წინ 8 ნუკლეოტიდით (სურათი 3).



სურათი 3. ადრეული პრომოტორი PE19-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა

2.2 ოლიგონუკლეოტიდების დიზაინი

Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში შერჩეული ადრეული პრომოტორი PE19-ით ინიცირებული პირობით-ლეთალური გენის (ან გენების) მომცველი ფრაგმენტების ამპლიფიკაციისათვის საჭირო წყვილი ოლიგონუკლეოტიდის დიზაინი მოვახდინეთ კომპიუტერული პროგრამის DNA Straider™ 1,2 საშუალებით. ამპლიფიკაციისათვის შევარჩიეთ როგორც ცალ-ცალკე თითოეული ინდივიდუალური გენის (113, 114, 115, 116) მომცველი ფრაგმენტი, ასევე კომბინირებულად ორი გენის (113, 114) და ოთხივე გენის ერთდროულად მომცველი ფრაგმენტები (ცხრილი 8).

ცხრილი 8. Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის კლონირებისათვის შერჩეული ფრაგმენტები

გენომის ფრაგმენტი	ფრაგმენტის ზომა (ნწყ)	პოზიცია ფაგის გენომში
გენი:113,114	1434	83880 – 85313
გენი:113,114,115,116	3959	83880 – 87838
გენი:113	1057	83880 – 84936
გენი:114	403	84911 – 85313
გენი:115	1941	85292 – 87232
გენი:116	632	87207 – 87838

გენომში შერჩეული ფრაგმენტებისათვის პრაიმერების კონსტრუირებას ვახდენდით Sb-1 ბაქტერიოფაგის, როგორც მატრიცული დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მიხედვით (მეთოდები თავი 3., 3.5) (ცხრილი 9). თითოეული ფრაგმენტისათვის მოვახდინეთ წყვილი პრაიმერების დიზაინი. ექსპერიმენტის მიზნებიდან გამომდინარე ყოველი ოლიგონუკლეოტიდის 5'-დაბოლოებას დავამატეთ რესტრიქციული ენდონუკლეაზა Bgl II-ის რესტრიქციული საიტი (ATAGCT), რათა შემდგომში ამპლიფიცირებული ფრაგმენტის ლიგირება/კლონირება განგვეხორციელებინა პლაზმიდის პოლილინკერში არსებული იგივე ენდონუკლეაზის საიტთან.

ცხრილი 9. ოლიგონუკლეოტიდების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა

გენი	პოზიცია გენომში	პრაიმერი	პრაიმერის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა (5'-3')	პრაიმერის სიგრძე (ნწ)	GC/TA თანაფარდობა
113-114	83880	1-Fp	CGCATGAGATCTGAATAAAAGGAGAGATTAATAATGAAATTTG	30	7/23
	85313	1-Rp	CAGTACAGATCTTTACTTATCCCCTTTCGTAACTCTAAAG	26	11/15
113, 114, 115, 116	83880	2-Fp	CGCATGAGATCTGAATAAAAGGAGAGATTAATAATGAAATTTG	30	7/23
	87838	2-Rp	CCATGCAGATCTCCTTCCTTACTATTTACTAATTTTTTTT	27	6/21
113	83880	3-Fp	CGCATGAGATCTGAATAAAAGGAGAGATTAATAATGAAATTTG	30	7/23
	84936	3-Rp	ACGTTCAGATCTTTATAAAAACCTCCTTCAAACACTCAAGTATTT	32	10/14
114	84911	4-Fp	CAGTTAAGATCTCTTGAGTGTTTGAAGGAGGTTTTATAATG	29	10/19
	85313	4-Rp	CAGTACAGATCTTTACTTATCCCCTTTCGTAACTCTAAAG	27	10/15
115	85292	5-Fp	CAGCTAAGATCTGAGTTACGAAAGGGGATAAGTAATGG	26	11/15
	87232	5-Rp	CATGGCAGATCTTTATTTTTCTCCAGTTTTGATACTCC	29	9/17
116	87207	6-Fp	ATCGTCAGATCTGGAGTATCAAAACTGGAGGAAAAATAATG	29	10/19
	87838	6-Rp	CCATGCAGATCTCCTTCCTTACTATTTACTAATTTTTTTT	27	6/21
pPW19	u227	Fp	CAAGGTGTGGCATAATGTGTGGAATTGTGAGC	32	15/17
	d328	Rp	GATGACCTCGTTTCCACCGAATTAGCTTGC	30	15/15

გასმული ხაზით გამოყოფილია Bgl II რესტრიქციული ენდონუკლეაზას საიტი -ATAGCT; მუქი შრიფტით აღნიშნულია გენების ინიციალისა და ტერმინაციის კოდონები.

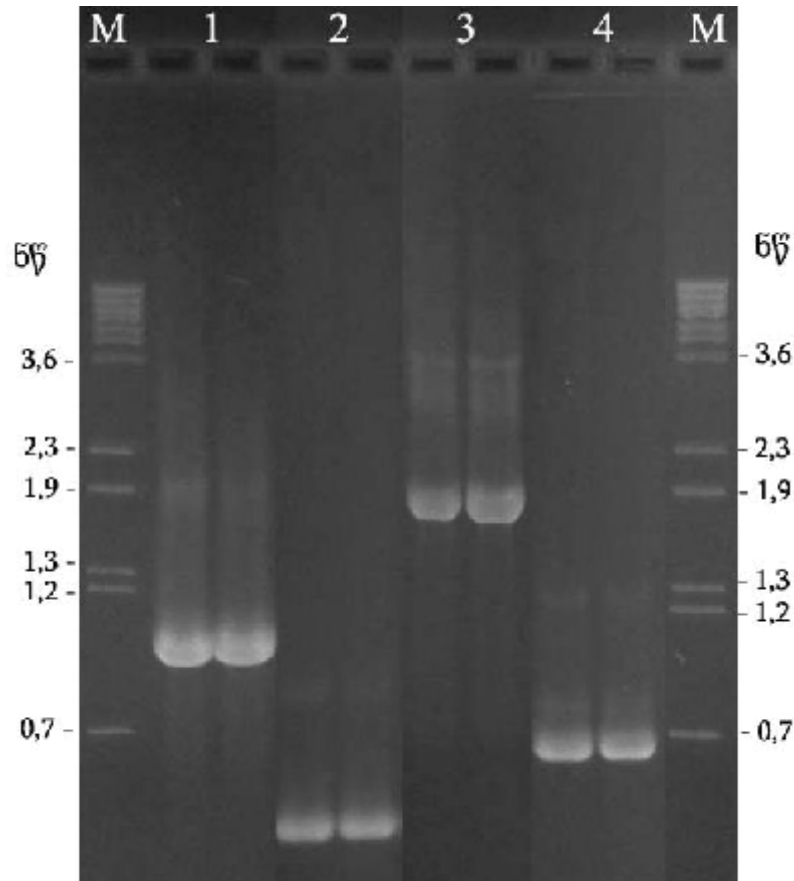
2.3 პირობით-ლეთალური გენების ამპლიფიკაცია (პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია)

Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში იდენტიფიცირებული ერთი ადრეული პრომოტორით (PE19) ინიცირებული ოთხი პირობით-ლეთალური გენის (113, 114, 115, 116) ამპლიფიკაციისათვის გამოვიყენეთ პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია (PCR). მოვახდინეთ ფაგის, როგორც ცალკეული ინდივიდუალური გენის, ასევე კომბინირებულად ორი გენის (113, 114) და ოთხივე გენის მომცველი ფრაგმენტების ამპლიფიკაცია. პოლიმერაზა ჯაჭვურ რეაქციაში თითოეული დასაამპლიფიცირებელი ფრაგმენტისათვის გამოყენებული იქნა პრაიმერების წყვილი (ცხრილი 9); ხოლო, მატრიცული დნმ-ად გამოყენებული იქნა Sb-1 ბაქტერიოფაგის დნმ (ცხრილი 10).

ცხრილი 10. პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციის სარეაქციო პირობები

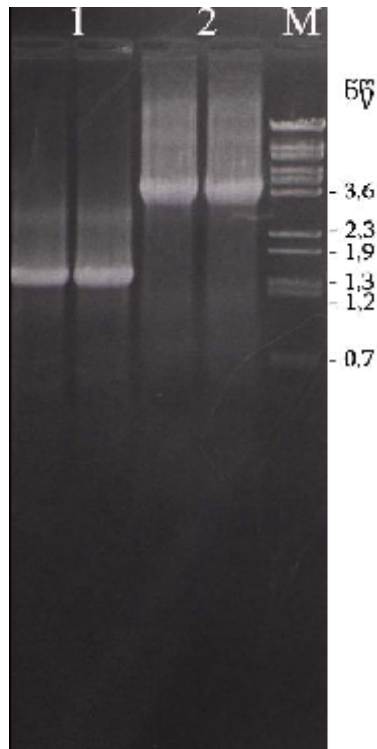
PCR-ის კომპონენტები	საწყისი კონცენტრაცია	სამუშაო კონცენტრაცია	რეაქციის მოცულობა (მკლ)
1 10X Pfu ბუფერი	10X	1X	10
2 dNTP ნარევი	10 mM	200 μ M	2
3 Fp პრაიმერი (5>3>)	0,1 მკგ/მლ	0,005 მკგ/მლ	5
4 Rp პრაიმერი (3>5>)	0,1 მკგ/მლ	0,005 მკგ/მლ	5
5 მატრიცა დნმ	10-100 ნგ	1 -10 ნგ	1
6 Taq-დნმ პოლიმერაზა	5ერთეული/მკლ	2,5 ერთეული	0,5
7 dH ₂ O	-	-	76,5
ჯამური მოცულობა			100

ვინაიდან ჩვენთვის ცნობილი იყო დასაამპლიფიცირებელი ფრაგმენტის ზომა (ცხრილი 8), ამიტომ მიღებული ამპლიკონის ვიზუალიზაციას ვახდენდით გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით, რათა ემპირიულად შეგვეფასებინა მიღებული ფრაგმენტის ზომა. სურათი 4 გამოსახავს Sb-1 ბაქტერიოფაგის ინდივიდუალური გენების (113, 114, 115, 116) მომცველი ფაგის ფრაგმენტების ამპლიკონებს.



სურათი 4. Sb-1 ბაქტერიოფაგის ინდივიდუალური გენების PCR ამპლიკონები. M-მარკერი (Lambda DNA-BstEII Digest); 1-გენი 113 (1057 ნწ); 2-გენი 114 (403 ნწ); 3-გენი 115 (1941 ნწ); 4-გენი 116 (632 ნწ);

Sb-1 ფაგის ორი გენის (113, 114) მომცველი და ოთხივე გენის (113, 114, 115, 116) მომცველი ფრაგმენტების ამპლიფიკაციისათვის გამოვიყენეთ იგივე პრაიმერები, რაც ინდივიდუალური გენების ამპლიფიკაციისათვის. კერძოდ, ორგენიანი ფრაგმენტისათვის გენი 113-ის Fp(5'-3') პრაიმერი და გენი 114-ის Rp(3'-5') პრაიმერი; ხოლო ოთხი გენის შემთხვევაში გენი 113-ის Fp(5'-3') და გენი 116-ის Rp(3'-5') პრაიმერი. სურათ 5-ზე გამოსახულია Sb-1 ფაგის ორგენიანი და ოთხგენიანი ფრაგმენტების ამპლიკონები, სადაც ორი გენის მომცველი ფრაგმენტის ზომა შეესაბამება 1434 ნწ-ს, ხოლო ოთხი გენის მომცველი ფრაგმენტის ზომაა 3959 ნწ.



სურათი 5. Sb-1 ბაქტერიოფაგის ორი და ოთხი გენის მომცველი PCR ამპლიკონები. 1-ორი გენის (113, 114) მომცველი ფრაგმენტი (1434 ნწ); 2- ოთხი გენის (113, 114, 115, 116) მომცველი ფრაგმენტი (3959 ნწ); M-მარკერი (Lambda DNA-BstEII Digest);

ფაგის გენომის ფრაგმენტის შემდგომ კლონირებისათვის გამოსაყენებლად მიღებული ამპლიკონების გაწმენდა მოვახდინეთ სპეციფიური ნაკრების (PCR-პროდუქტის გასაწმენდი ნაკრები; გელიდან გამოსაყოფი ნაკრები, QIAGEN, GmbH, Germany) საშუალებით.

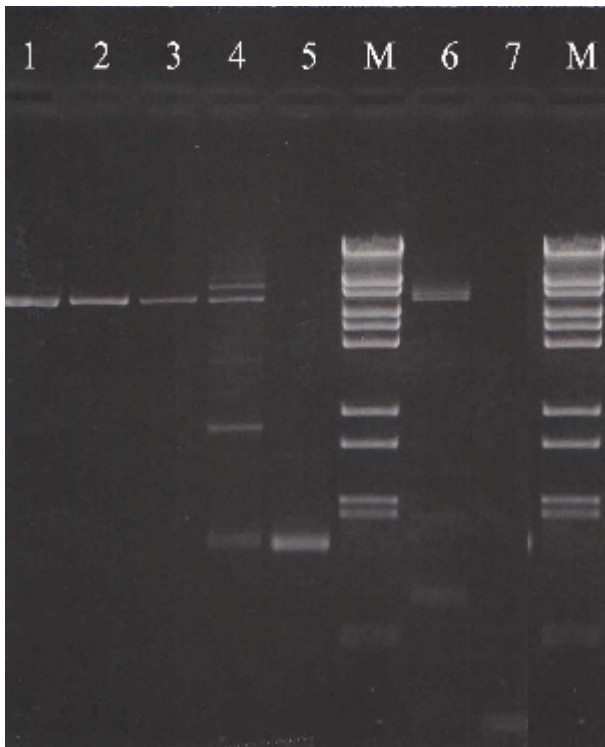
შედეგების მიხედვით, ამპლიფიკაციის შედეგად მიღებული დნმ-ის ფრაგმენტების ზომა ზუსტად შეესაბამებოდა შერჩეული ფრაგმენტების ზომას (ცხრილი 8).

2.4 ფაგის გენომის პირობით-ლეთალური გენების კლონირება pPW19 ვექტორულ სისტემაში და ტრანსფორმაცია E.coli DH5 უჯრედებში (რეკომბინანტული პლაზმიდების შემცველი ბაქტერიული კლონების მიღება)

Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომიდან პირობით-ლეთალური გენის ან გენების მომცველი დნმ-ის ფრაგმენტების კლონირებისათვის გამოყენებულია pPW19 – *E.coli* DH5 ვექტორული სისტემა. ვექტორულ პლაზმიდაში კლონირებული დნმ-ის ფრაგმენტების შესაბამისი ცილის სინთეზისათვის აუცილებელია არეში სპეციალური ინდუქტორის IPTG-ის (იზოპროპილ-β-D-თიოგალაქტოპირანოზიდი) დამატება. როგორც აღვნიშნეთ, პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციით მიღებული იქნა როგორც ინდივიდუალური გენების (113; 114; 115; 116) მომცველი ამპლიკონები, ასევე ორი გენის (113-114) და ოთხი გენის მომცველი ამპლიკონები. კლონირების ექსპერიმენტებისათვის წინასწარ გამიზნული რესტრიქციული ენდონუკლეაზა Bgl II -ის რესტრიქციული საიტი (AGATCT) დამატებული იქნა ყოველი პრაიმერის 5'-დაბილოებაზე. ფაგის ამპლიფიცირებული ფრაგმენტებისა და pPW19 ვექტორის დნმ-ის Bgl II ფერმენტით დამუშავების შემდეგ დეფოსფორილირებული და გაწმენდილი ფაგის დნმ-ის ფრაგმენტების ლიგირება მოვახდინეთ pPW19 პლაზმიდის პოლილინკერის Bgl II -ის რესტრიქციულ საიტთან (მეთოდები თავი 4. 4.3).

აღნიშნული პროცედურების წარმატებულად მიმდინარეობას ვაკვირდებოდით გელ-ელექტროფორეზით, რითაც ვახდენდით ლიგირებისა და კლონირების პროცედურების მონიტორინგს.

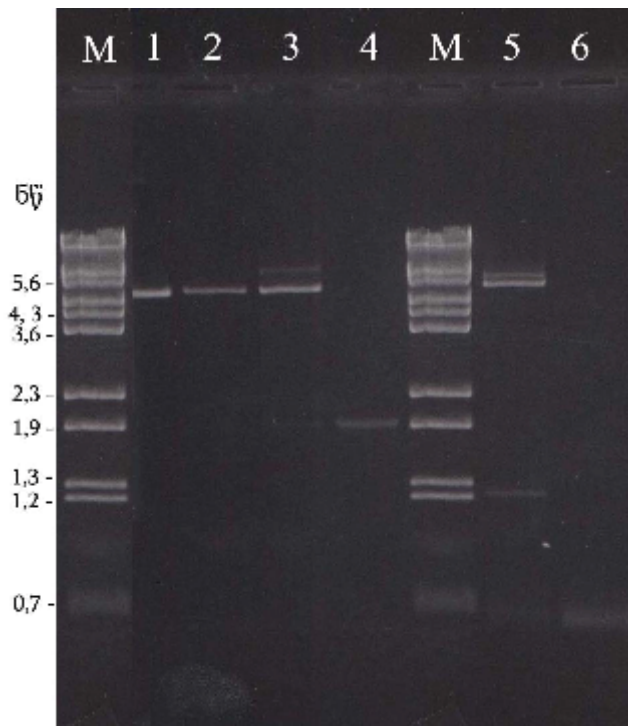
სურათი 6 ასახავს Sb-1 ფაგის ინდივიდუალური გენების 113-ისა და 114-ის მომცველი ფრაგმენტების pPW19 პლაზმიდაში ლიგირების პროცესის ყველა საფეხურს, მათ შორის გამოყენებულია ყველა შესაბამისი კონტროლი, მაგ., pPW19-ის თვითლიგირება.



1. Bgl II-ით დამუშავებული pPW19 პლაზმიდური დნმ გასუფთავებამდე
2. pPW19 პლაზმიდური დნმ დეფოსფორილების და გასუფთავების შემდეგ
3. pPW19 პლაზმიდური დნმ-ის თვითლიგირება ჩასასმელი ფრაგმენტის გარეშე
4. pPW19 პლაზმიდური დნმ-ის და ამპლიკონის (გენი 113) ლიგირება
5. დეფოსფორილებული და გაწმენდილი ამპლიკონი (გენი 113)
- M. მარკერი (Lambda DNA-BstEII Digest)
6. pPW19 პლაზმიდური დნმ-ის და ამპლიკონის (გენი 114) ლიგირება
7. დეფოსფორილებული და გაწმენდილი ამპლიკონი (გენი 114)

სურათი 6. pPW19 პლაზმიდაში Sb-1 ფაგის ინდივიდუალური გენების 113 და 114-ის მომცველი ფრაგმენტების ლიგირების მონიტორინგი

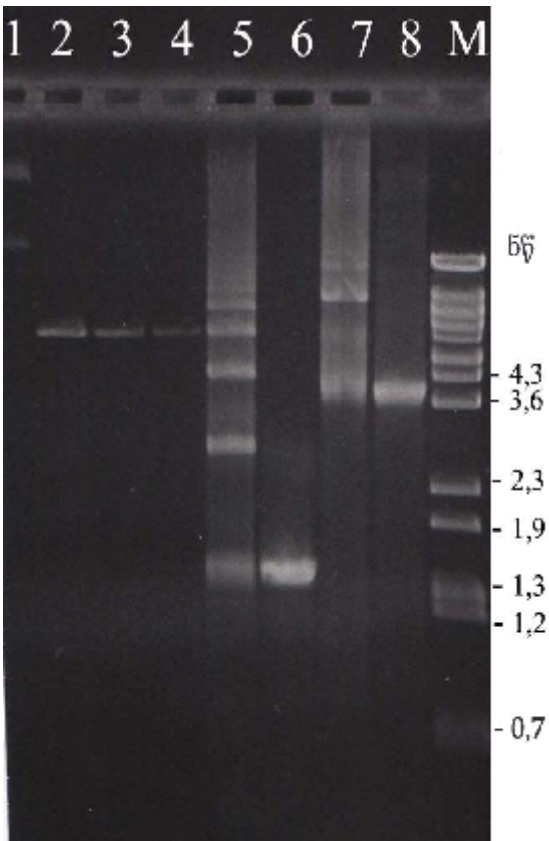
სურათ 7-ზე ნაჩვენებია ფაგის ინდივიდუალური გენების 115 და 116-ის pPW19 პლაზმიდასთან ლიგირების პროცესის მონიტორინგი.



1. pPW19 პლაზმიდური დნმ დეფოსფორილების და გასუფთავების შემდეგ
2. pPW19 პლაზმიდური დნმ-ის თვითლიგირება ჩასასმელი ფრაგმენტის გარეშე
3. pPW19 პლაზმიდური დნმ-ის და ამპლიკონის (გენი 115) ლიგირება
4. დეფოსფორილებული და გაწმენდილი ამპლიკონი (გენი 115) M. მარკერი (Lambda DNA-BstEII Digest)
5. pPW19 პლაზმიდური დნმ-ის და ამპლიკონის (გენი 116) ლიგირება
6. დეფოსფორილებული და გაწმენდილი ამპლიკონი (გენი 116)

სურათი 7. pPW19 პლაზმიდაში Sb-1 ფაგის ინდივიდუალური გენების 115 და 116-ის მომცველი ფრაგმენტების ლიგირების მონიტორინგი

Sb-1 ფაგის ორი გენისა და ოთხი გენის მომცველი ფრაგმენტების ამპლიკონების ლიგირების მონიტორინგი გამოსახულია სურათ 8-ზე.



1. pPW19 ინტაქტური პლაზმიდური დნმ
 2. Bgl II-ით დამუშავებული pPW19 პლაზმიდური დნმ გასუფთავებამდე
 3. pPW19 პლაზმიდური დნმ დეფოსფორილირების და გასუფთავების შემდეგ
 4. pPW19 პლაზმიდური დნმ-ის თვითლიგირება ჩასასმელი ფრაგმენტის გარეშე
 5. pPW19 პლაზმიდური დნმ-ის და ამპლიკონის (ორი გენის 113-114 მომცველი ფრაგმენტი) ლიგირება
 6. დეფოსფორილებული და გაწმენდილი ამპლიკონი (ორი გენის 113-114 მომცველი ფრაგმენტი)
 7. pPW19 პლაზმიდური დნმ-ის და ამპლიკონის (ოთხი გენის 113,114,115,116 მომცველი ფრაგმენტი) ლიგირება
 8. დეფოსფორილებული და გაწმენდილი ამპლიკონი (ოთხი გენის 113,114,115,116 მომცველი ფრაგმენტი)
- M. მარკერი (Lambda DNA-BstEII Digest)

სურათი 8. pPW19 პლაზმიდაში Sb-1 ფაგის ორი (113, 114) და ოთხი გენის (113, 114, 115, 116) მომცველი ფრაგმენტების ლიგირების მონიტორინგი

მიღებული რეკომბინანტული პლაზმიდები ტრანსფორმირებული იქნა *E.coli* DH5 კომპეტენტურ უჯრედებში.

ტრანსფორმაციის პროცედურის ბოლო საფეხურის (ინკუბაცია 37°C, 18სთ) შემდეგ ტრანსფორმანტების სხვადასხვა მოცულობა (0,1მლ, 0,15მლ, 0,2მლ) გადაგვქონდა ქლორამფენიკოლის (10მკგ/მლ) შემცველ მყარ საკვებ არეზე (TC). 18სთ ინკუბირების შემდეგ ვახდენდით 24-24 შესაძლო რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონის პლაზმიდური დნმ-ის ანალიზს, რათა შეგვეფასებინა ტრანსფორმაციის განხორციელება და წარმატებული ტრანსფორმაციის შემთხვევაში - ფრაგმენტის პლაზმიდაში ჩასმის მიმართულება (5'-3' თუ საწინააღმდეგო).

დადებითი შედეგის შემთხვევაში, რეკომბინანტული პლაზმიდების მატარებელ ბაქტერიულ უჯრედებს ვამოწმებდით ლეთალური ეფექტის გამოვლენაზე. კერძოდ, რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების ციტოტოქსიური აქტივობის

იდენტიფიცირება ხდებოდა ინდუქტორის (IPTG) შემცველ საკვებ არეზე კოლონიების წარმოქმნის უნარის მიხედვით.

ასევე ვიყენებდით ტრანსფორმანტების კვლევის ალტერნატიულ, კლასიკურ გზას:

ლეთალური აქტივობის მქონე რეკომბინანტული პლაზმიდების მატარებელი ბაქტერიული კლონების იდენტიფიცირებისათვის ქლორამფენიკოლის (10მკგ/მლ) შემცველ არეზე (TC) გაზრდილი შესაძლო რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების კოლონიები პარალელური გათესვის რეჟიმით (replica plating) გადაგვქონდა როგორც ინდუქტორის (0,1 mM IPTG) შემცველ (TCI), ისე უინდუქტორო ქლორამფენიკოლის (10მკგ/მლ) შემცველ მყარ ნიადაგზე (TC). შემდგომი კვლევებისათვის ვახდენდით მხოლოდ იმ კოლონიების სელექციას, რომლებიც პარალელური გათესვის დროს სიცოცხლისუნარიანობას ავლენდნენ უინდუქტორო არეზე და ვერ წარმოქმნიდნენ კოლონიებს ინდუქტორის (IPTG) თანაობისას. პირველ გენერაციაში შევარჩევდით რა კოლონიებს, რომელთა ზრდის ინჰიბირება ხდებოდა ფინჯანზე ინდუქტორის თანაობისას, ვახდენდით მათ საკონტროლო გადატანას უკვე მეორე გენერაციად ისევ ისევ ინდუქტორიან და უინდუქტორო არეზე, რადგან დაგვედასტურებინა ტრანსფორმანტების სტაბილურობა (მეთოდები თავი 5., 5.1). დადებითი შედეგის შემთხვევაში უკვე ვახდენდით ტრანსფორმანტებიდან პლაზმიდური დნმ-ის პრეპარატების მიღებას და პლაზმიდაში ინტეგრირებული S_b-1 ფაგის დნმ-ის ფრაგმენტის ორიენტაციის განსაზღვრას.

2.5 რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებში S_b-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ფრაგმენტების იდენტიფიკაცია

2.5.1. რეკომბინანტული პლაზმიდების რესტრიქციული ანალიზი

რეკომბინანტული პლაზმიდების რესტრიქციული ანალიზისათვის რესტრიქციული ენდონუკლეაზების შერჩევას ვახდენდით ფაგის დნმ-ის ფრაგმენტის ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობაში არსებული რესტრიქციული საიტების მიხედვით. აუცილებელ პირობას წარმოადგენდა დნმ-ის ფრაგმენტში რესტრიქციული

ენდონუკლეაზას საიტის ლოკალიზაციის ასიმეტრიულობა, რათა წინასწარ მოგვეხდინა რესტრიქციის შედეგად მიღებული ფრაგმენტების ზომების კალკულაცია, როგორც ფრაგმენტის 5'-3' მიმართულებით ჩასმის, ასევე რევერსი მიმართულებით შემთხვევაში. N11 ცხრილში ნაჩვენებია ყველა რესტრიქციული ენდონუკლეაზა, რომელიც შევარჩიეთ თითოეული რეკომბინანტული პლაზმიდისათვის, ასევე ფერმენტის საიტის პოზიცია როგორც ინტეგრირებულ ფრაგმენტში, ასევე პლაზმიდის პოლილინკერში და რესტრიქციის შედეგად მოსალოდნელი ფრაგმენტის ზომები, როგორც 5'-3', ისე 3'-5' ჩასმის შემთხვევაში.

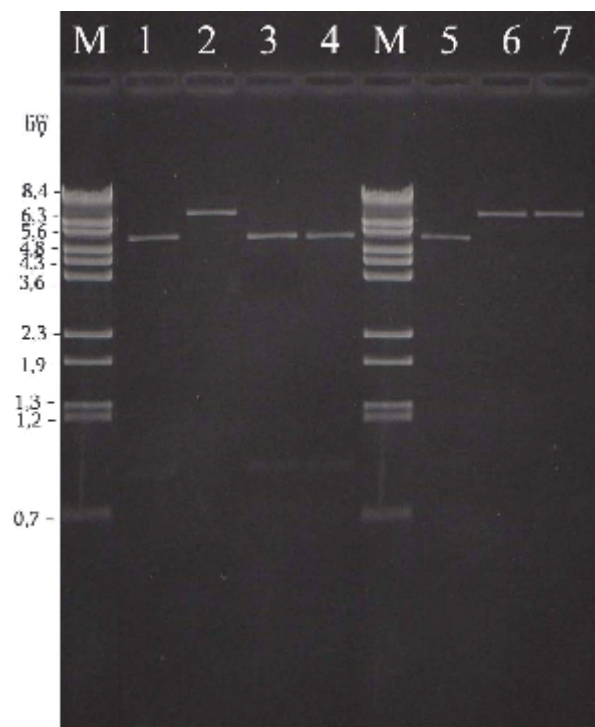
ცხრილი 11. რეკომბინანტული პლაზმიდის დნმ-ის რესტრიქციის შედეგად მოსალოდნელი ფრაგმენტების ზომები

რეკომბინანტული პლაზმიდის გენომის ზომა (ნწ)	რესტრიქციული საიტის პოზიცია pPW19 (5694 ნწ) პლაზმიდაში	რესტრიქციული საიტის პოზიცია ფრაგმენტში	მოსალოდნელი ფრაგმენტის ზომა(kbp)	
			5'- 3' ჩასმული ფრაგმენტი	3'- 5' ჩასმული ფრაგმენტი
8560 ნწ (113,114)	Hind III 1(289)	1433 ნწ Hind III 1(120)	7.0; 0.1	5.8; 1.3
9652 ნწ (113,114,115,116)	Hind III 1(289)	3958 ნწ Hind III 1(120)	9.5; 0.1	5.8; 3.8
6750 ნწ (113)	Hind III 1(289)	1056 ნწ Hind III 1(120)	0.1; 6.6	0.9; 5.8
6096 ნწ (114)	EcoRV 1(142) 2 (1371)	402 ნწ EcoRV 1(147)	0.3; 1.3 4.4	0.4; 1.2 4.4
7634 ნწ (115)	EcoRV 1(142) 2(1371)	1940 ნწ EcoR V 1(469) 2(1734)	1.2; 1.2 4.4; 0.5	0.3; 1.2 1.5; 4.4
6325 ნწ (116)	Hind III 1(289)	631 ნწ Kpn I 1(132)	0.1; 6,2	5.8; 0.5

რესტრიქციული ანალიზის შედეგების ვიზუალიზაციას ვახდენდით გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით. Sb-1 ბაქტერიოფაგის ინდივიდუალური გენი 113-ის შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის 24 ტრანსფორმანტის პლაზმიდური დნმ დამუშავებული იქნა Hind III რესტრიქციული ენდონუკლეაზით, საიდანაც სამ მათგანში ფრაგმენტირებული დნმ-ის ზომები იყო 6,6 kbp და 0,1 kbp, რაც შეესაბამება

ინტეგრირებული ფრაგმენტის 5'-3' მიმართულებას, ხოლო დანარჩენი რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების პლაზმიდები შეიცავდნენ ჩასმულ ფრაგმენტს საწინააღმდეგო (რევერსი) მიმართულებით (ზომებით: 5,8 kbp და 0,9 kbp), რაც უკვე თავისთავად გამოიხატავს ინტეგრირებული გენის ფუნქციონირებას (ცხრილი 11. სურათი 9). რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონს, რომელიც შეიცავს 5'-3' მიმართულებით ფაგის გენომის ფრაგმენტს ერთი ინდივიდუალური 113 გენით მივანიჭეთ კლონის სახელწოდება *E. coli* DH5 (pPS3), ხოლო კლონს, რომელშიც ინტეგრირებული ფრაგმენტი ჩასმულია საწინააღმდეგო მიმართულებით (3'-5'), მიენიჭა *E. coli* DH5 (pPS4) სახელწოდება.

სურათ 10-ზე ნაჩვენებია გენი 113-ის შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდების სქემატური გამოსახულება ჩასმული ფრაგმენტის შესაბამისი ორიენტაციით, რიგორც 5'-3', ასევე საწინააღმდეგო.

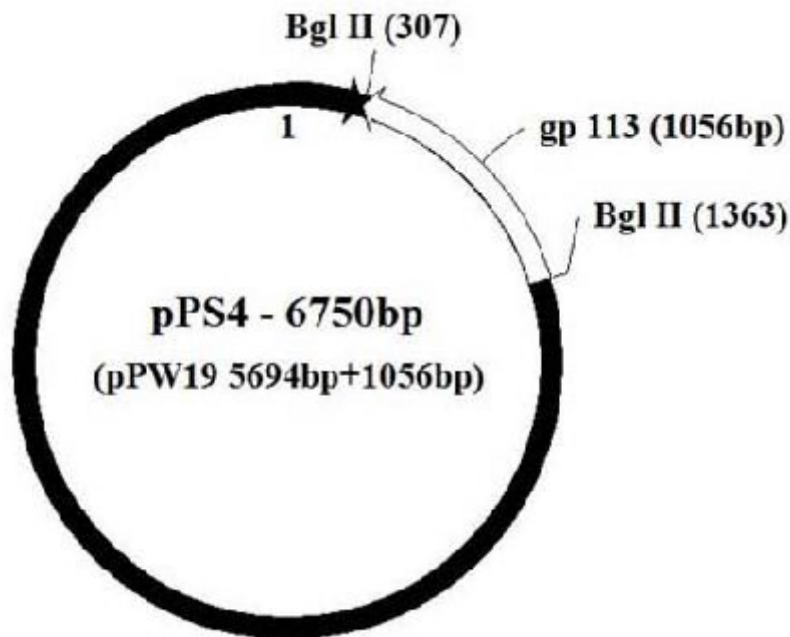
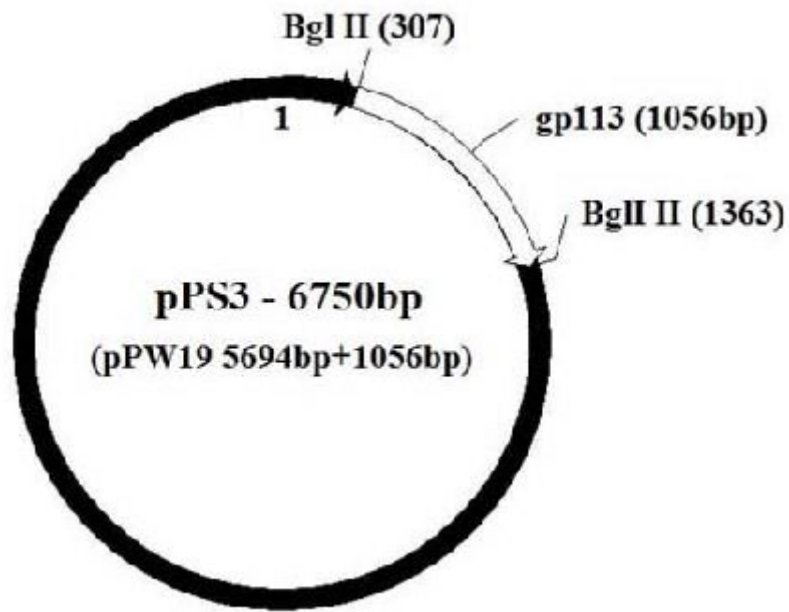


2, 6, 7 - რეკომბინანტული პლაზმიდის ფრაგმენტები ზომებით 6,6 kbp და 0,1 kbp

1, 3, 4, 5 - რეკომბინანტული პლაზმიდის ფრაგმენტები ზომებით 5,8 kbp და 0,9 kbp

M - მარკერი (Lambda DNA-BstEII Digest)

სურათი 9. გენი 113-ის შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი Hind III ენდონუკლეაზით



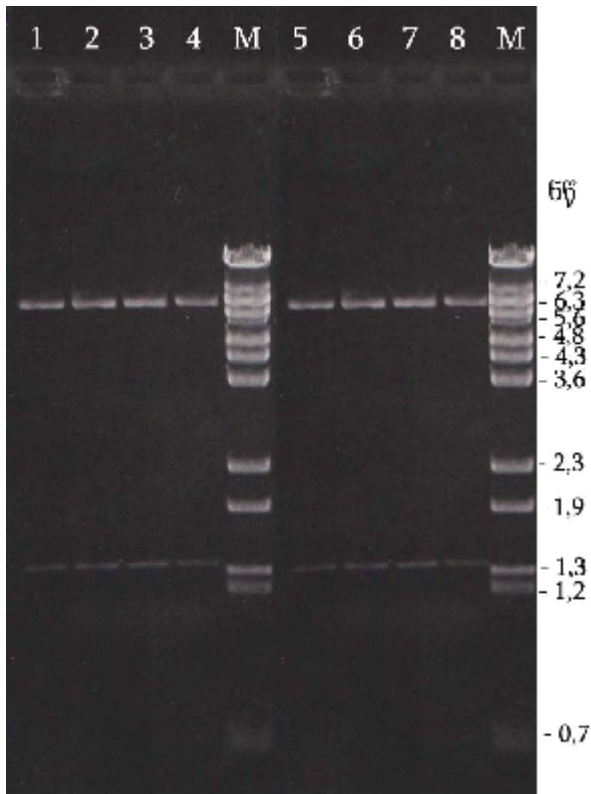
სურათი 10. *E. coli* DH5 (pPS3) და *coli* DH5 (pPS4) რეკომბინანტული პლაზმიდების სქემატური გამოსახულება.

ფაგის ორი გენის მომცველი ფრაგმენტის მატარებელი 24 სავარაუდო რეკომბინანტული პლაზმიდური დნმ-ის ანალიზი ჩავატარეთ Hind III რესტრიქციული ენდონუკლეაზით.

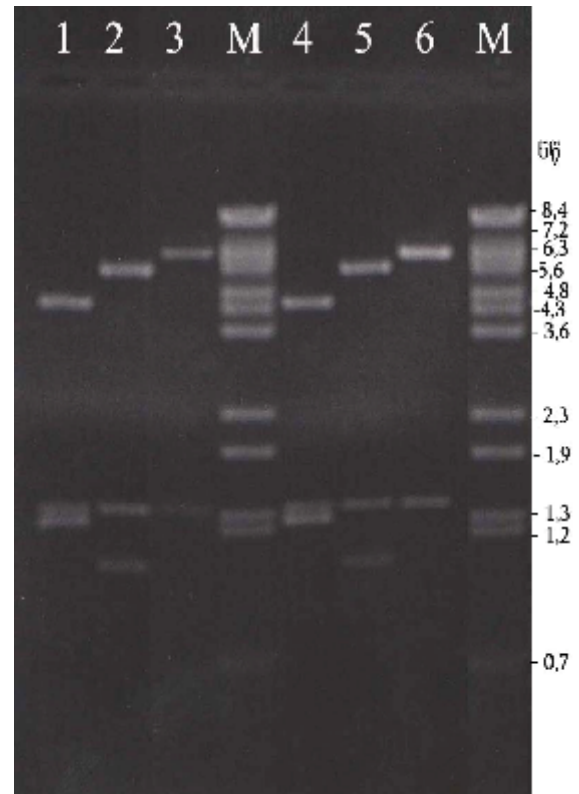
pPW19 პლაზმიდის გენომში ფაგის დნმ-ის ფრაგმენტის 5'-3' მიმართულებით ჩასმის შემთხვევაში რესტრიქციული ფრაგმენტების მოსალოდნელი ზომებია : 7,0 kbp

და 0,1 kbp; ხოლო საწინააღმდეგო (რევერსი) 3'-5' მიმართულებით ჩასმის შემთხვევაში: 5,8 kbp და 1,3 kbp. რეკომბინანტული პლაზმიდების რესტრიქციული ანალიზის ემპირიული შედეგი სრულიად განსხვავდებოდა მოსალოდნელი შედეგისაგან: ყველა, საკვლევი ტრანსფორმანტის პლამიდური დნმ-ების რესტრიქციული ფრაგმენტების ზომები იყო: 7,1 kbp და 1,4 kbp (სურათი 11). შედეგების მიხედვით გათვლებმა აჩვენა, რომ მიღებული ზომის ფრაგმენტები შესაძლოა მიგველო მხოლოდ იმ შემთხვევაში, თუ ჩასმული ფრაგმენტი იქნებოდა დუბლირებული.

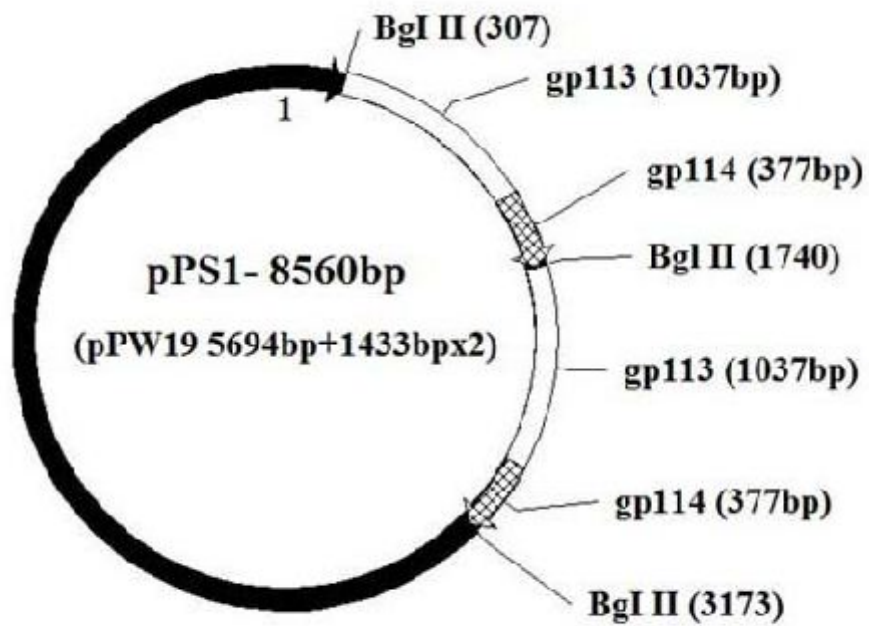
დამატებითმა კვლევებმა აჩვენა, რომ ორგანიზმი ფრაგმენტის შემცველი ყველა კლონი შეიცავს ორმაგად ჩასმულ ფრაგმენტს 5'-3' მიმართულებით. აღნიშნული ფაქტის დასადასტურებლად ჩავატარეთ დამატებითი რესტრიქციული კვლევა სამი განსხვავებული ენდონუკლეაზით. წინასწარ ჩავატარეთ რესტრიქციული ფრაგმენტების მოსალოდნელი ზომების კალკულაცია: EcoR V (4,3kbp, 1,4kbp, 1,3kbp), EcoR I (6,1kbp, 1,4kbp, 1,0kbp), Sca I (7,1kbp, 1,4kbp) (ცხრილი 11). შედეგმა დაადასტურა ფრაგმენტის დუბლიკატური ჩასმა ყველა პლაზმიდაში 5'-3' მიმართულებით (სურათი 12); საინტერესოა, რომ არცერთი ტრანსფორმანტი არ იყო იდენტიფიცირებული ჩასმული ფრაგმენტის რევერსი მიმართულებით. სურათი 13 გამოსახავს ორგანიზმი ფრაგმენტის შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის სქემატური გამოსახულებას ჩასმული ფრაგმენტის 5'-3' მიმართულებით. ორგანიზმი (113-114) ფრაგმენტის შემცველი რეკომბინანტული ბაქტერიულ კლონს მიენიჭა სახელწოდება *coli* DH5 (pPS1).



სურათი 11. ორი გენის (113-114) შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი Hind III ენდონუკლეაზით. 1-12 რესტრიქციული ფრაგმენტები ზომით: 7,1 kbp და 1,4 kbp; M - მარკერი (Lambda DNA-BstEII Digest)

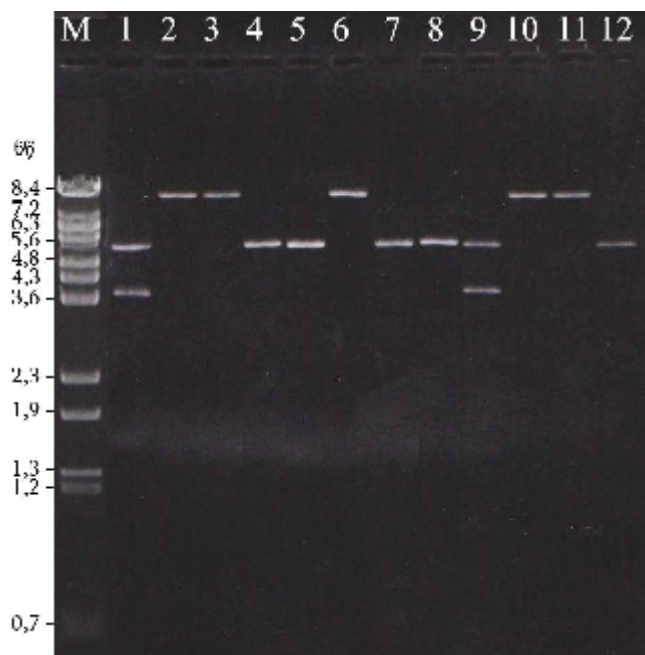


სურათი 12. ორი გენის (113-114) შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი სამი ენდონუკლეაზით: 1, 4 - EcoR V; 2, 5 -EcoR I; 3, 6 - Sca I; M - მარკერი (Lambda DNA-BstEII Digest)



სურათი 13. *E.coli* DH5 (pPS1) რეკომბინანტული პლაზმიდების სქემატური გამოსახულება.

Sb-1 ბაქტერიოფაგის ოთხი გენის (113, 114, 115, 116) მომცველი ფრაგმენტის მატარებელი 24 სავარაუდო რეკომბინანტული პლაზმიდური დნმ-ის ანალიზი ჩავატარეთ Hind III რესტრიქციული ენდონუკლეაზით. წინასწარი გათვლებით რესტრიქციული ფრაგმენტების ზომები 5'-3' მიმართულებით შეესაბამებოდა: 9,5 kbp და 0,1 kbp; ხოლო, 3'-5' მიმართულებით: 5,8 kbp და 3,8 kbp (ცხრილი 11); რესტრიქციული ანალიზის შედეგად მივიღეთ, რომ ხუთი ტრანსფორმანტი შეიცავდა ოთხ-გენიან ინტეგრირებულ ფრაგმენტს დადამავალი მიმართულებით; ორი ტრანსფორმანტი ატარებდა ფაგის ფრაგმენტს საწინააღმდეგო (რევერსი) ორიენტაციით, ხოლო დანარჩენი შეიცავდა მხოლოდ ვექტორულ დნმ-ს (სურათი 14). დადებითად შეფასებულ რეკომბინანტულ პლაზმიდას, ანუ 5'-3' მიმართულებით ჩასმული ფრაგმენტით, მიენიჭა რეკომბინანტული კლონის სახელი: *E.coli* DH5 (pPS2). სურათ 15-ზე გამოსახულია *E.coli* DH5 (pPS2) რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონის სქემატური სტრუქტურა.

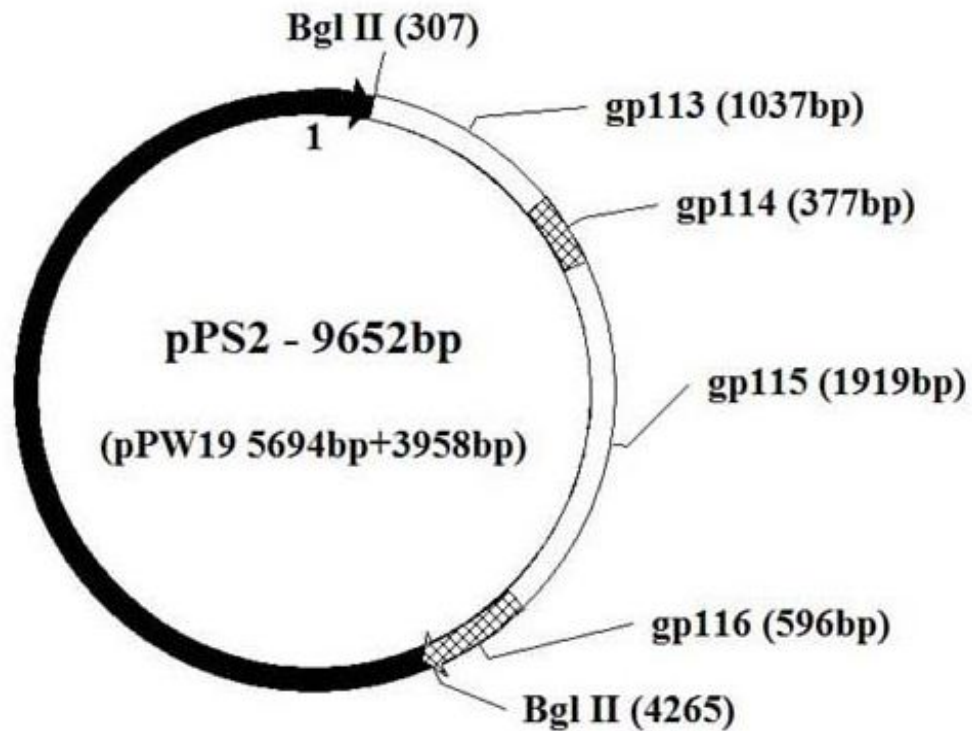


1, 9 - რესტრიქციული ფრაგმენტები ზომით: 5,8 kbp და 3,8 kbp;

2, 3, 6, 9, 10 - რესტრიქციული ფრაგმენტები ზომით: 9,5 kbp და 0,1 kbp;

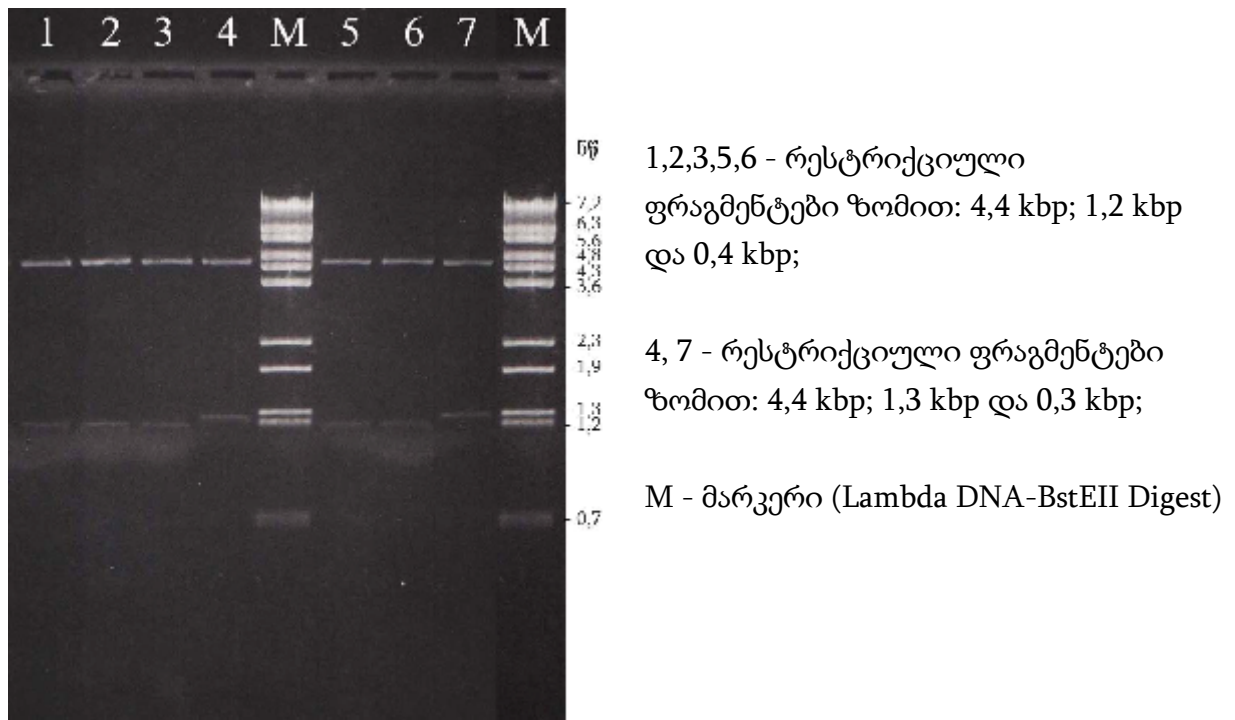
4, 5, 7, 8, 12 „ცარიელი“ ვექტორი
M - მარკერი (Lambda DNA-BstEII Digest)

სურათი 14. ოთხი გენის (113-114) შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი Hind III ენდონუკლეაზით.



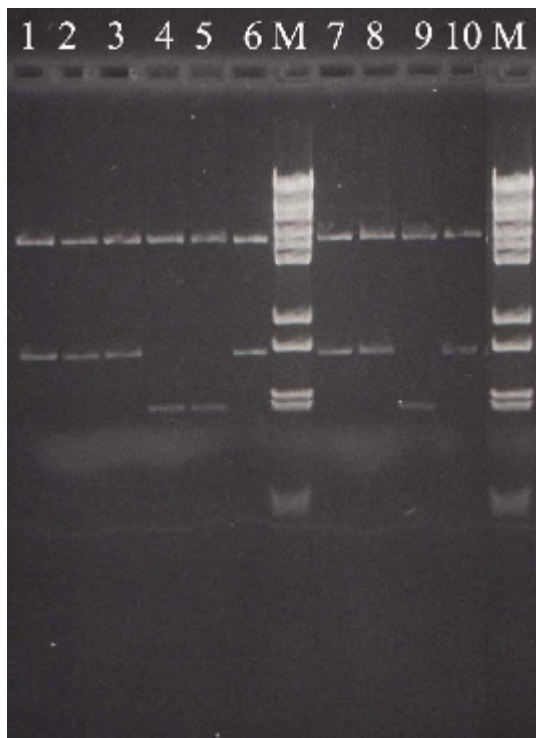
სურათი 15. *E.coli* DH5 (pPS2) რეკომბინანტული პლაზმიდების სქემატური გამოსახულება

Sb-1 ბაქტერიოფაგის ერთი ინდივიდუალური გენი 114-ის მომცველი ფრაგმენტის მატარებელი 24 სავარაუდო რეკომბინანტული პლაზმიდური დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი ჩავატარეთ *EcoR* V რესტრიქციული ენდონუკლეაზით. რეკომბინანტულ პლაზმიდაში კლონირებული ფრაგმენტის 5'-3' მიმართულებით ჩასმის შემთხვევაში მოსალოდნელი ზომები შეესაბამებოდა 4,4 kbp; 1,3 kbp და 0,3 kbp-ს; ხოლო რევერსული ორიენტაციით ჩასმის დროს მოსალოდნელი ფრაგმენტების ზომები იყო: 4,4 kbp; 1,2 kbp და 0,4 kbp (ცხრილი 11). როგორც სურათ 16-ზეა გამოსახული, მიღებული იქნა ორი კლონი პლაზმიდაში ჩასმული ფრაგმენტის 5'-3' მიმართულებით. სწორად კონსტრუირებული (5'-3') პლაზმიდის შემცველ რეკომბინანტულ კლონს მიენიჭა სახელი: *E.coli* DH5 (pPS5). ხოლო რევერსული მიმართულების ფრაგმენტის შემცველი კლონი აღინიშნა, როგორც: *E.coli* DH5 (pPS6).



სურათი 16. გენი 114-ის შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი EcoR V ენდონუკლეაზით

ინდივიდუალური გენი 115-ის მომცველი ფრაგმენტის მატარებელი რეკომბინანტული პლაზმიდური დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი ჩავატარეთ ასევე EcoR V რესტრიქციული ფერმენტით. სადაც დადებითი შედეგის შემთხვევაში, ანუ პლაზმიდაში კლონირებული ფრაგმენტის 5'-3' მიმართულებით ჩასმის შემთხვევაში, მოსალოდნელი ზომები შეესაბამებოდა 4,4 kbp; 1,2 kbp; 1,2 kbp და 0,5 kbp-ს; ხოლო რევერსული ორიენტაციით ჩასმის დროს მოსალოდნელი ფრაგმენტების ზომები იყო: 4,4 kbp; 1,5 kbp; და 0,3 kbp; (ცხრილი 11). სურათ 17-ზე ნაჩვენებია, რომ მიღებული იქნა სამი კლონი პლაზმიდაში ჩასმული ფრაგმენტის 5'-3' მიმართულებით. სწორად კონსტრუირებული (5'-3') პლაზმიდის შემცველ რეკომბინანტულ კლონს მიენიჭა სახელი: *E.coli* DH5 (pPS7). ხოლო რევერსული მიმართულების ფრაგმენტის შემცველი კლონი აღინიშნა, როგორც: *E.coli* DH5 (pPS8).



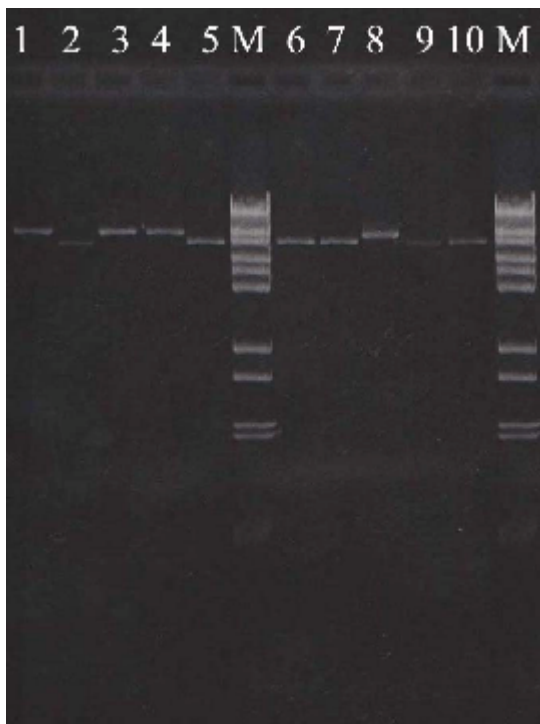
1,2,3,6,7,8,10-რესტრიქციული ფრაგმენტები ზომით: 4,4 kbp; 1,5 kbp; და 0,3 kbp;

4,5,9 - რესტრიქციული ფრაგმენტები ზომით: 4,4 kbp; 1,2 kbp; 1,2 kbp და 0,5 kbp;

M - მარკერი (Lambda DNA-BstEII Digest)

სურათი 17. გენი 115-ის შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი EcoR V ენდონუკლეაზით

Sb-1 ბაქტერიოფაგის ინდივიდუალური გენი 116-ის შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის შერჩეული ტრანსფორმანტების პლაზმიდური დნმ დამუშავებული იქნა Kpn I რესტრიქციული ენდონუკლეაზით, საიდანაც სამ მათგანში ფრაგმენტირებული დნმ-ის ზომები იყო 6,2 kbp; და 0,1 kbp;, რაც შეესაბამება ინტეგრირებული ფრაგმენტის 5'-3' მიმართულებას, ხოლო დანარჩენი რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონები შეიცავდნენ ფრაგმენტს რევერსული მიმართულებით (ზომებით: 5,8 kbp; და 0,5 kbp) (ცხრილი 11. სურათი 18). რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონს, რომელიც შეიცავს 5'-3' მიმართულებით ფაგის გენომის ფრაგმენტს ერთი ინდივიდუალური გენით (116) მიენიჭა კლონის სახელწოდება *E. coli* DH5 (pPS9), ხოლო კლონს, რომელშიც ინტეგრირებული ფრაგმენტი ჩასმულია რევერსული ორიენტაციით (3'-5'), მიენიჭა *E. coli* DH5 (pPS10) სახელწოდება.



1,3,4,8 - რესტრიქციული ფრაგმენტები ზომით: 6,2 kbp; და 0,1 kbp;

2,5,6,7,9,10-რესტრიქციული ფრაგმენტები ზომით: 5,8 kbp; და 0,5 kbp;

M - მარკერი (Lambda DNA-BstEII Digest)

სურათი 18. გენი 116-ის შემცველი რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციული ანალიზი Kpn I ენდონუკლეაზით

რესტრიქციული ანალიზის შედეგად სწორად კონსტრუირებული რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონები 5'-3' მიმართულებით ჩასმული ფაგის გემონის ფრაგმენტით, რომლებიც შეირჩა შემდგომი კვლევებისათვის წარმოდგენილია მე-12 ცხრილში.

ცხრილი 12. რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონები

რეკომბინანტული პლაზმიდა	ინტეგრირებული ფრაგმენტი (bp)	პოზიცია ფაგის გენომში
pPS1: გენი 113,114	1434	83880 – 85313
pPS2: გენი113,114,115,116	3959	83880 – 87838
pPS3: გენი113	1057	83880 – 84936
pPS4: გენი113 (რევერსი)	1057	84936 – 83880
pPS5: გენი114	403	84911 – 85313
pPS7: გენი115	1941	85292 – 87232
pPS9: გენი116	632	87207 – 87838
pPS10: გენი116 (რევერსი)	632	87838 – 87207

2.5.2 რეკომბინანტული პლაზმიდების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის

სეკვენირება და ანალიზი

გარდა იმისა, რომ რესტრიქციული ანალიზით ვახდენდით რეკომბინანტულ პლაზმიდაში ინტეგრირებული ფაგის გენომის ფრაგმენტის ორიენტაციის განსაზღვრას, ასევე ვახდენდით რეკომბინანტული პლაზმიდური დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გაშიფრვას, რათა მაქსიმალურად გამოგვერიცხა მუტაციების არსებობა, რაც შესაძლებელია საფუძველი ყოფილიყო ფსევდობაქტერიოციდული ეფექტის გამოვლენისა.

რეკომბინანტულ პლაზმიდაში კლონირებული ფრაგმენტის ზომიდან გამომდინარე რეკომბინანტული პლაზმიდის დნმ-ის გაშიფრვას ვახდენდით Primer walking სეკვენირების მეთოდით (მეთოდები თავი 4., 4.4.2).

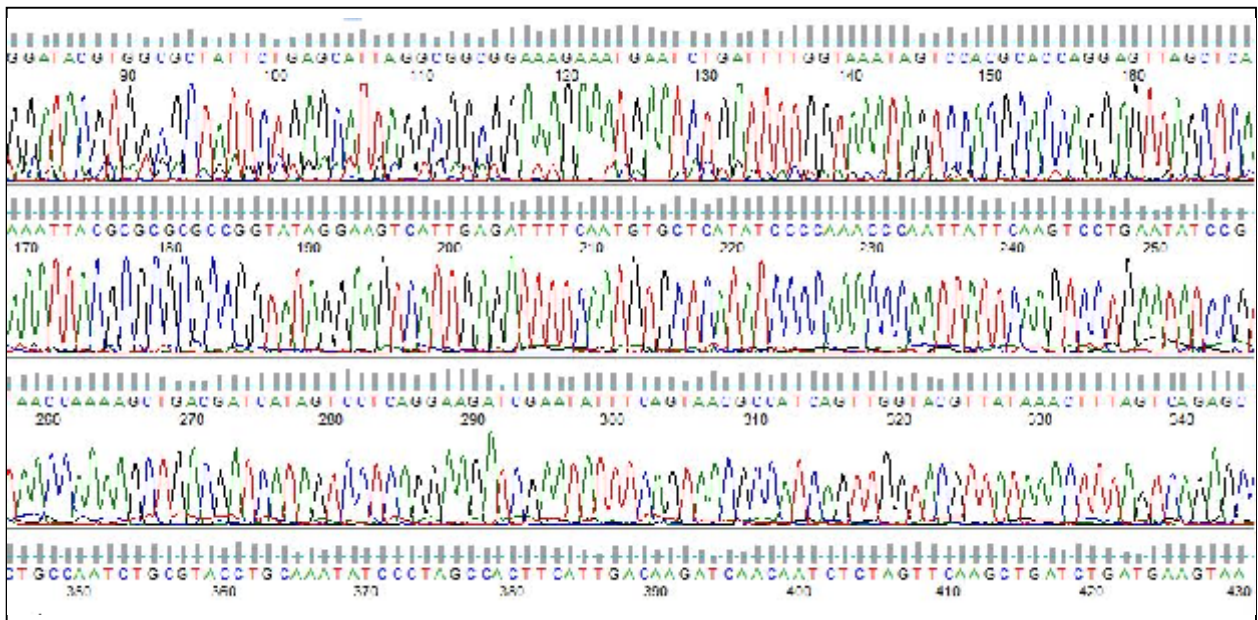
ჩატარებული იქნა კლონირების შედეგად მიღებული შემდეგი ექვსი რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონის პლაზმიდური დნმ-ის ნუკლეოტიდური ანალიზი. 5'-3' მიმართულებით ჩასმული ფრაგმენტით: *E. coli* DH5(pPS1); *E. coli* DH5(pPS2); *coli* DH5(pPS3); *E. coli* DH5(pPS5); *E. coli* DH5(pPS7); *E. coli* DH5(pPS9); და ორი ბაქტერიული კლონის რეკომბინანტული პლაზმიდა 3'-5' ორიენტაციით ჩასმული ფრაგმენტით: *E. coli* DH5(pPS4) და *E. coli* DH5(pPS10).

ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის ანალიზს ვახდენდით კომპიუტერული პროგრამებით: DNA straidr™ 1,2 და Biology WorkBench 3,2. ანალიზი გულისხმობდა ემპირიულად მიღებული რეკომბინანტული პლაზმიდის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის ზუსტ შედარებას მატრიცული დნმ-ის (Sb-1 ბაქტერიოფაგის საკვლევი ფრაგმენტის) და ვექტორული პლაზმიდა pPW19-ის (wild-type) ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობასთან.

რეკომბინანტული პლაზმიდების დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის შედარებითმა ანალიზმა მატრიცული პლაზმიდური (wild-type) დნმ-ის ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობასთან აჩვენა, რომ ყველა რეკომბინანტული პლაზმიდა ნამდვილად შეიცავს ინტეგრირებული Sb-1 ბაქტერიოფაგის ფრაგმენტს 5'-3' მიმართულებით, ყოველი ნუკლეოტიდური ფუძე ფაგის ფრაგმენტში და ფრაგმენტის pPW19 პლაზმიდის დნმ-თან გადაბმის ადგილებში არ შეიცავდა არცერთ რეალურ მუტაციას (SNPs), რომელსაც შესაძლოა შეეცვალა საკვლევი

გენის/გენების ფუნქცია. სეკვენსის ანალიზმა ასევე დაადასტურა, რომ რეკომბინანტული კლონი, ფაგის ორი გენის მომცველი ფრაგმენტით ნამდვილად იყო ორმაგად ჩასმული pPW19 პლაზმიდის გენომში. ბაქტერიული კლონები *E. coli* DH5(pPS4) და *E. coli* DH5(pPS10), ნამდვილად შეიცავდნენ ინტეგრირებულ ფრაგმენტს 3'-5' მიმართულებით.

კვლევის შედეგებმა აჩვენა რომ ყველა რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონის რეკომბინანტული პლაზმიდის დნმ 100% იდენტურობას ავლენდა ხელოვნურად შექმნილი რეკომბინანტული პლაზმიდის დნმ-ის თანმიმდევრობასთან. მე-19 სურათზე გამოსახულია ერთ-ერთი რეკომბინანტული პლაზმიდის სეკვენირების დიაგრამა.



სურათი 19. რეკომბინანტული პლაზმიდის სეკვენირების დიაგრამა

თავი 3. რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლა

3.1 რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების ბაქტერიოციდული აქტივობის განსაზღვრა მყარ არეზე

შესწავლილი იქნა რეციპიენტ-ბაქტერიულ უჯრედებში რეკომბინანტული პლაზმიდების ექსპრესიით გამოწვეული ცვლილებები, კერძოდ, კლონების ინჰიბიტორული აქტივობა პატრონი ბაქტერიების მიმართ.

კლონირებული გენის ექსპრესიის პირობებში სიცოცხლისუნარიანი ბაქტერიების წარმოქმნის უნარს ვსწავლობდით რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების სუსპენზიის გადატანით ინდუქტორიან და უინდუქტორო მყარ საკვებ არეზე (როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ გენის ექსპრესიას იწვევს სწორედ ინდუქტორი IPTG). წარმოქმნილი კოლონიების რაოდენობის შესაფასებლად ბაქტერიული სუსპენზია სერიული განზავებების მეთოდით გადაგვქონდა არეზე. კოლონიების წარმოქმნის ეფექტურობას ვაფასებდით ინდუქტორიან არეზე წარმოქმნილი კოლონიების რაოდენობის შეფარდებით უინდუქტორო არეზე წარმოქმნილი კოლონიების რაოდენობასთან (კოლონიები [+]*IPTG*/კოლონიები [-]*IPTG*). მიღებული შედეგების მიხედვით ვნახეთ, რომ ბაქტერიული კოლონიების წარმოქმნის უნარი თითქმის სრულად შეზღუდულია pPS1(გენი:113,114), pPS2(გენი:113,114,115,116), pPS3(გენი:113): და pPS9(გენი:116) რეკომბინანტული კლონების ექსპრესიის შემთხვევაში (ცხრილი 13). რეკომბინანტულმა კლონებმა pPS5(გენი:114) და pPS7(გენი:115) გენის ექსპრესიის პირობებში მცირედ ან საერთოდ არ გამოავლინეს ციტოტოქსიური ეფექტი. ბაქტერიების ზრდის სიხშირე თითქმის იგივე იყო, როგორც ცარიელი ვექტორის pPW19 (უარყოფითი კონტროლის), pPS4(გენი:113 რევერსი) და pPS10(გენი:116 რევერსი) კლონების შემთხვევაში, რომლის დროსაც ფრაგმენტები ჩასმულია 3'-5' ორიენტაციით, რის შემთხვევაშიც გენის ექსპრესია გამორიცხულია (ცხრილი 13. სვეტი 3). პირველადი შედეგები რეკომბინანტული კლონების ბაქტერიოციდული ეფექტის გამოვლენაზე მიუთითებდა, რომ Sb-1 ფაგის გენომში

ერთი ოპერონით ინიცირებული ოთხი გენიდან: 113 და 116 გენების პროდუქტები ავლენდნენ სრულ ციტოტოქსიურ ეფექტს, ხოლო გენები 114 და 115 მცირედ ან საერთოდ არ ახდენენ გავლენას ბაქტერიების ზრდაზე.

ცხრილი 13. Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ფრაგმენტების შემცველი რეკომბინანტული კლონების ბაქტერიოციდული აქტივობა

რეკომბინანტული პლაზმიდა	Sb-1 ფაგის გენები	კოლონიების წარმოქმნის ეფექტურობა ^(ა)	სითხეში გადარჩენილი ბაქტერიები ^(ბ)
pPS1	113, 114	0.00027	0.0037
pPS2	113, 114, 115, 116	0.00026	0.001
pPS3	113	<0.0006	0.02
pPS4	113 (რევერსი)	0.13	3.4
pPS5	114	0.47	3.1
pPS7	115	0.68	3.3
pPS9	116	<0.00007	0.01
pPS10	116 (რევერსი)	0.73	3.1
pPW19	-	0.8	3.6

ა. ინდუქტორიან არეზე წარმოქმნილი კოლონიების რაოდენობის განაყოფი, უინდუქტორო არეზე წარმოქმნილი კოლონიების რაოდენობაზე.

ბ. ინდუქციიდან 24 საათის შემდეგ გადარჩენილი ბაქტერიების რაოდენობის განაყოფი ინდუქციამზე ბაქტერიების რაოდენობაზე (ნულოვანი წერტილი). სიცოცხლისუნარიანი ბაქტერიების რაოდენობა შეფასებულია უინდუქტორო მყარ არეზე.

3.2 რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების ბაქტერიოციდული აქტივობის განსაზღვრა თხევად არეში

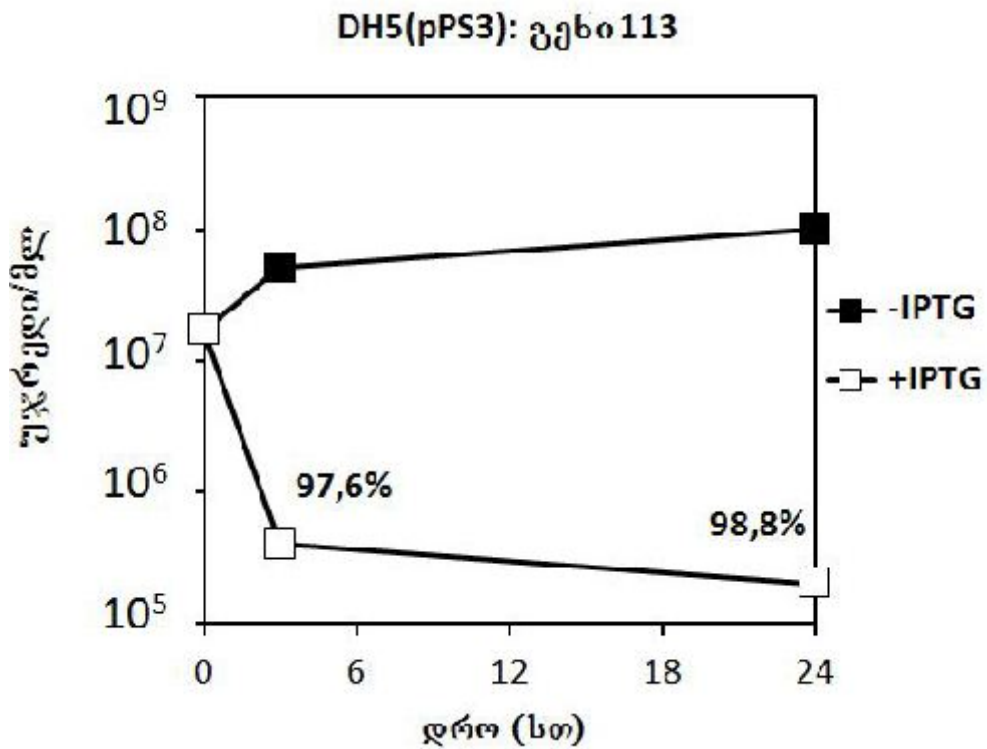
რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედების ზრდის ინჰიბირება შესაძლოა ყოფილიყო როგორც ბაქტერიოციდული, ასევე ბაქტერიოსტატიკური. ამისათვის

თითოეული კლონირებული გენის პროდუქტის ბაქტერიოციდული ეფექტის შესასწავლად განვსაზღვრეთ სიცოცხლისუნარიანი ბაქტერიების რაოდენობა თხევად პირობებში ინდუქციის გზით. ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონის ზრდის პროცესში მოგვეხდინა კლონირებული გენის ექსპრესია და შეგვესწავლა რა სიხშირით განაგრძობდა ბაქტერიული კლონი ზრდას.

ქლორამფენიკოლის შემცველ (10მკგ/მლ) თხევად არეში ადრეულ ექსპოტენციალურ ფაზამდე გაზრდილი რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების სუსპენზიას (ოპტიკური სიმკვრივე $OD_{600}=0,8-0,9$ მ) ვყოფდით ორ ალიკვოტად, სადაც ერთ დუბლიკატს ემატებოდა კლონირებული გენის ექსპრესიის ინდუქტორი, იზოპროპილ- β -D-თიოგალაქტოპირანოზიდი (IPTG), საბოლოო კონცენტრაციით 0,1 mM; ხოლო მეორე ალიკვოტს ვიყენებდით ექსპრტიმრენტში, როგორც უარყოფით კონტროლს - ინდუქტორის გარეშე. ინდუქტორის დამატების მომენტი მიჩნეული იყო გენის ექსპრესიის ნულოვან წერტილად. შემდეგ დამატებით 3 და 24 საათიანი ინკუბაციის განმავლობაში ვაკვირდებოდით ბაქტერიების ზრდის დინამიკას ბაქტერიული სუსპენზიის ოპტიკური სიმკვრივის განსაზღვრის მეთოდით. შესაბამისად ვიკვლევდით რეკომბინანტული კლონების ბიოლოგიურ აქტივობას ინდუქტორის დამატებამდე (ნულოვანი წერტილი) და ინდუქტორის დამატებიდან 3 და 24 საათის განმავლობაში, რისთვისაც დროის ამ წერტილებზე (0, 3 და 24 სთ) საკვლევი სინჯები გადაგვქონდა უინდუქტორო მყარ არეზე (TC), რათა შეგვეფასებინა სითხეში ინდუქციის შედეგად გადარჩენილი სიცოცხლისუნარიანი ბაქტერიების რაოდენობა. გადარჩენილი-სიცოცხლისუნარიანი ბაქტერიების წილის შეფასებას ვახდენდით ინდუქციიდან სამ და 24 საათში სიცოცხლისუნარიანი ბაქტერიების რაოდენობის განაყოფით ინდუქციამდე ბაქტერიების რაოდენობაზე (ნულოვანი წერტილი) (მეთოდები თავი 5., 5.1).

მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონი DH5(pPS3), რომელიც მოიცავს ფაგის გენომის ერთ გენს-113-ს, 97,6%-ით იწვევს ბაქტერიების ზრდის ინჰიბირებას გენის ექსპრესიიდან 3 საათში, ხოლო 24 საათის განმავლობაში თითქმის სრულად ბლოკავს რეციპიენტი უჯრედების მეტაბოლიზმს (გრაფიკი 1).

გრაფიკი 1. *E. coli* DH5(pPS3) რეკომბინანტული კლონის ბაქტერიოციდული აქტივობა თხევად არეში

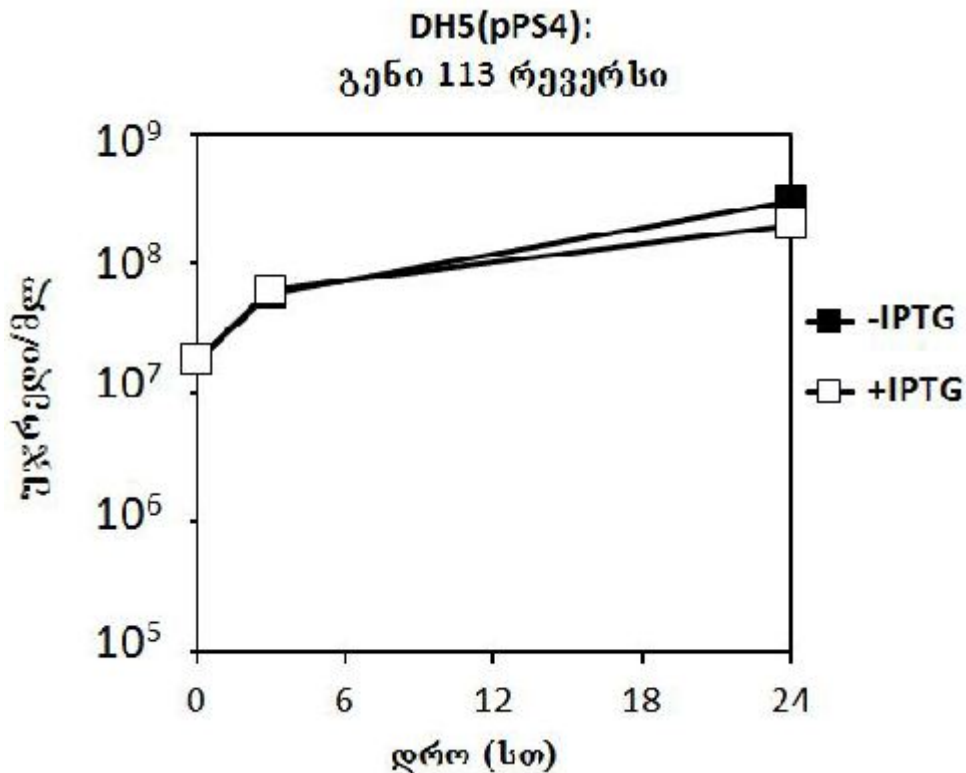


როგორც ზემოთ ავღნიშნეთ, ექსპერიმენტში უარყოფით კონტროლად გამოყენებული იქნა რეკომბინანტული კლონები, რომლებშიც ფაგის გენომის ფრაგმენტი ინტეგრირებულია რევერსი ორიენტაციით (3'-5'), სადაც თავისთავად ცხადია ინდუქციის შედეგად გენის ექსპრესია არ ხდება. რეკომბინანტული კლონი DH5(pPS4), რომელშიც გენი-113 ინტეგრირებულია 3'-5' მიმართულებით ინდუქციის პირობებში პროლიფერირდება ჩვეულ რეჟიმში და ინდუქციიდან 3 და 24 საათში ავლენს ბაქტერიების რაოდენობის თანაბრ მატებას (3-10 ჯერ), როგორც ინდუქტორიან ასევე უინდუქტორო არეში (გრაფიკი 2).

ფაგოსპეციფიური ცილის ლეტალური აქტივობა ასევე შესწავლილი იქნა რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონებისათვის: DH5(pPS9) და კლონი DH5(pPS10), რომლებიც მოიცავენ Sb-1 ბაქტერიოფაგის 116-ე გენის მომცველ ფრაგმენტს 5'-3' და რევერსული (3'-5') მიმართულებით. მიღებული შედეგების მიხედვით DH5(pPS9) რეკომბინანტულმა კლონმა ინდუქციის პირობებში სამ საათში გამოავლინა

უჯრედების ზრდის ინჰიბირება 98,7% -ით, ხოლო 24 საათში 99,2%-ით ლეტალური ეფექტი (გრაფიკი 3); საკონტროლო კლონი DH5(pPS10) განაგრძობდა ზრდას როგორც ინდუქტორიან, ასევე უინდუქტორო არეში (გრაფიკი 4).

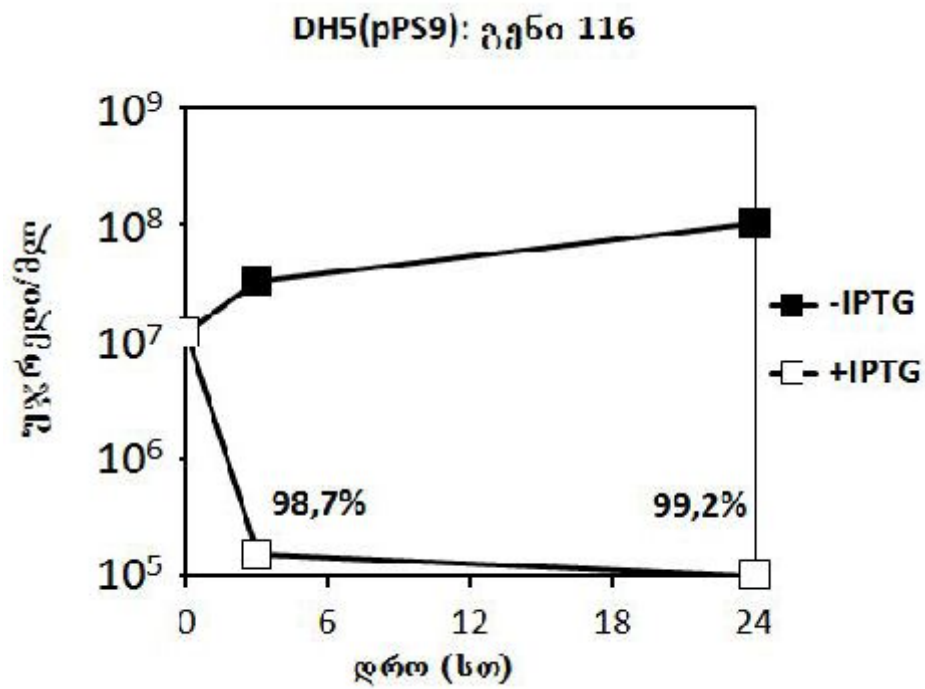
გრაფიკი 2. *E. coli* DH5(pPS4) რეკომბინანტული კლონის ბაქტერიოციდული აქტივობა თხევად არეში



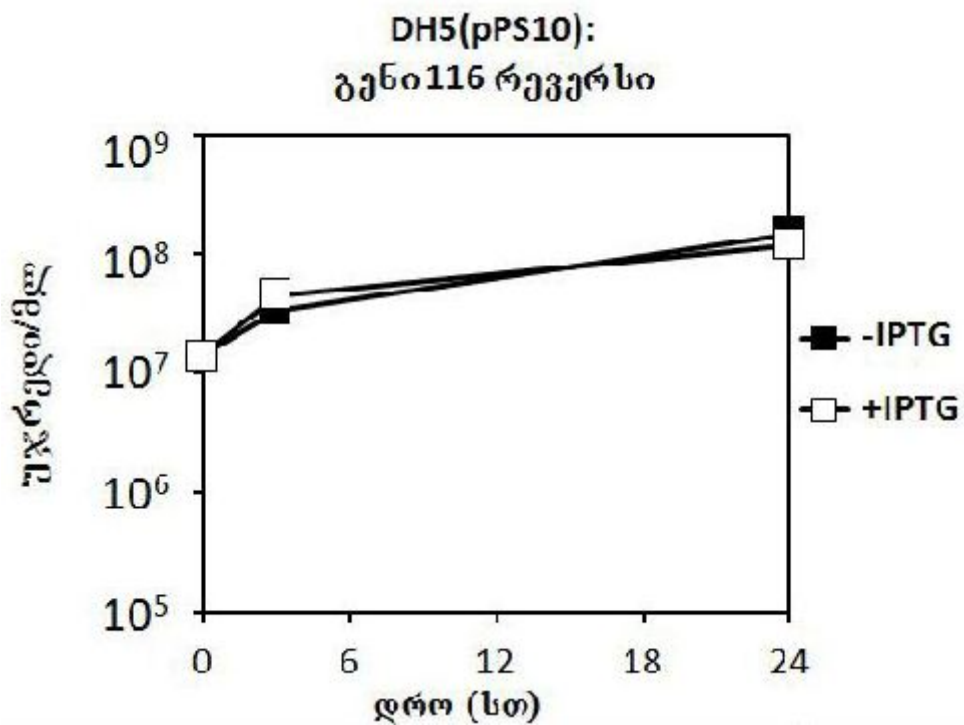
რეკომბინანტულმა ბაქტერიულმა კლონებმა DH5(pPS5) და DH5(pPS7) სითხეში ინდუქციის პირობებში არ გამოავლინეს ლეტალური ეფექტი (ცხრილი 13, სვეტი 4).

რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონი DH5(pPS1), რომელიც მოიცავს Sb-1 ბაქტერიოფაგის ორი გენის (113, 114) მომცველი ფრაგმენტს, გენის ექსპრესიის პირობებში ავლენდა უფრო ძლიერ ლეტალურ აქტივობას ვიდრე კლონი ერთი გენით pPS3(გენი113); ინდუქციიდან 3 საათში ინჰიბიტორული აქტივობა შეესაბამებოდა 99,7%; ხოლო 24 საათში ლეტალური ეფექტი აღწევდა მაქსიმუმს - 99,9% (გრაფიკი 5). როგორც აღნიშნეთ გენი 114 -ის მომცველ კლონს ციტოტოქსიური ეფექტი არ ქონდა; შესაბამისად DH5(pPS1)-ის უფრო ძლიერი ლეტალური ეფექტი ვიდრე pPS3-სა გამოწვეილი უნდა ყოფილიყო გენი 113-ის გაორმაგებული ექსპრესიით, რადგან აღნიშნულ pPS1 კლონში გვაქვს კლონირებული ფრაგმენტის ორმაგი დოზა.

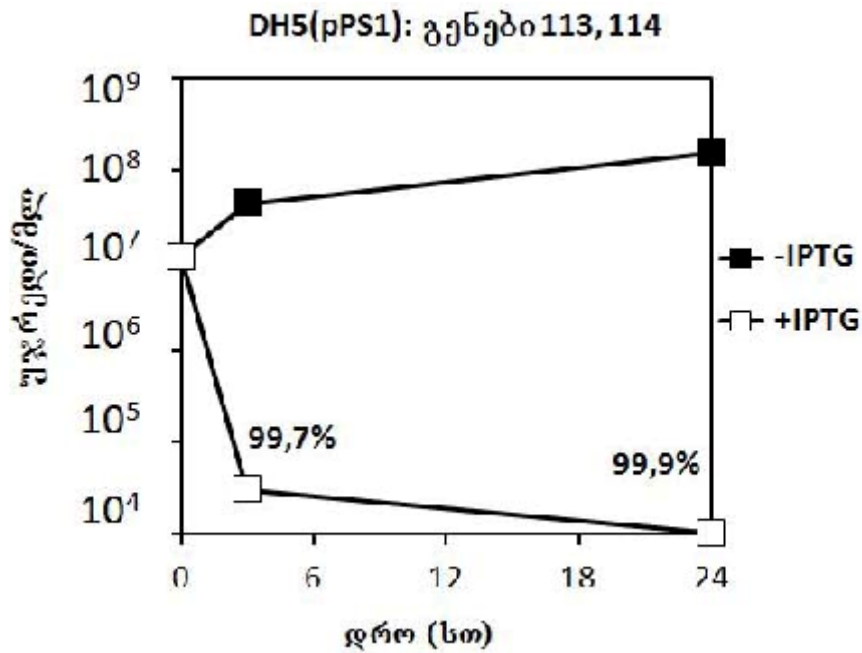
გრაფიკი 3. *E. coli* DH5(pPS9) რეკომბინანტული კლონის ბაქტერიოციდული აქტივობა თხევად არეში



გრაფიკი 4. *E. coli* DH5(pPS10) რეკომბინანტული კლონის ბაქტერიოციდული აქტივობა თხევად არეში

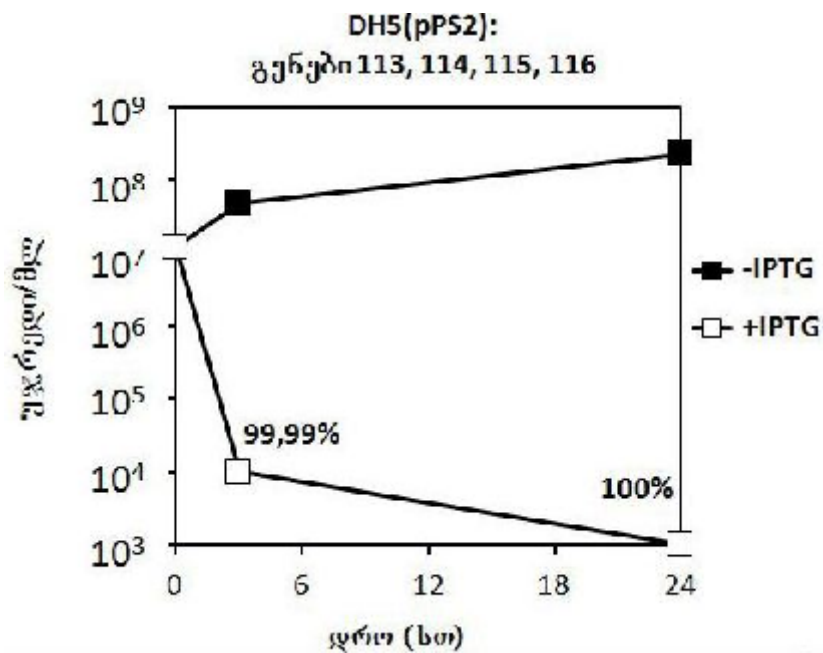


გრაფიკი 5. *E. coli* DH5(pPS1) რეკომბინანტული კლონის ბაქტერიოციდული აქტივობა თხევად არეში



რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონი Sb-1 ბაქტერიოფაგის ოთხივე გენის მომცველი ფრაგმენტით - pPS2 (გენები 113, 114, 115, 116) ავლენს თითქმის სრულ, 99,99%-იან ლეტალურ აქტივობას გენის ექსპრესიიდან 3 საათში (გრაფიკი 6).

გრაფიკი 6. *E. coli* DH5(pPS2) რეკომბინანტული კლონის ბაქტერიოციდული აქტივობა თხევად არეში



რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების სითხეში ინდუქციის შედეგები ასევე წარმოდგენილია ცხრილი 8, მე-4 სვეტი, სადაც რეკომბინანტული ცილის ლეთალური ეფექტი ცვალებადობს 98,7-99,99% დიაპაზონში, მაშინ როცა, საკონტროლო კლონების შემთხვევაში, რომლებიც არ მოიცავენ ტოქსიურ გენს ან ატარებენ რევერსულად ჩასმულ ფრაგმენტს, სიცოცხლისუნარიანი ბაქტერიების რაოდენობა სამჯერ მატულობს ინდუქციიდან 24 საათში.

წარმოდგენილი შედეგების მიხედვით რეკომბინანტულმა ბაქტერიულმა კლონებმა Sb-1 ბაქტერიოფაგის ინდივიდუალური გენებით: DH5(pPS3): გენი 113 და DH5(pPS9): გენი 116 გამოავლინეს 98-99% ბაქტერიოციდული აქტივობა როგორც მყარ, ასევე თხევად არეში; ფაგის ორი და ოთხ გენიანი ფრაგმენტების მომცველი რეკომბინანტული კლონები DH5(pPS1): გენები 113, 114 და DH5(pPS2): გენები 113, 114, 115, 116 ავლენენ თითქმის 100% ციტოტოქსიურ ეფექტს რეციპიენტ ბაქტერიულ უჯრედებზე. შედეგებზე დაყრდნობით შეგვიძლია ვთქვათ, რომ Sb-1 ბაქტერიოფაგის ერთი ადრეული პრომოტორით ინიცირებული ოთხი გენიდან: 113 და 116 გენები აკოდირებენ ძლიერ ბაქტერიოციდულ ცილას და აღნიშნული გენების ერთი ოპერონის ქვეშ გაერთიანებული აქტივობა 100%-ით ლეთალურია.

თავი 4. რეკომბინანტულ კლონებში ფაგოსპეციფიური ცილის უჯრედული სამიზნეების (დნმ, რნმ, ცილები) განსაზღვრა რადიოაქტიული იზოტოპების გამოყენებით

4.1. რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებში უჯრედული დნმ-ის და რნმ-ის

სინთეზირების სიხშირის განსაზღვრა [³H] - თიმიდინით და 5[³H] - ურიდინით

ვინაიდან ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგებმა აჩვენა, რომ რეკომბინანტული ბაქტერიული შტამები ფაგის კლონირებული ლეთალური გენის ექსპრესიის პირობებში ავლენენ ბაქტერიული უჯრედების ზრდის ინჰიბირებას,

საინტერესო იყო თუ რა მექანიზმი მუშაობდა ამ დროს, ანუ საჭირო იყო დაგვედგინა რის ხარჯზე ხდებოდა რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედების მეტაბოლიზმის დათრგუნვა.

ამ მიზნით განსაზღვრული იქნა რეკომბინანტული ცილის უჯრედული სამიზნეები, რისთვისაც გამოვიყენეთ რადიოაქტიული იზოტოპებით მონიშვნის მეთოდი.

რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებს: *E.coli* DH5(pPS1), *E.coli* DH5(pPS2), *E.coli* DH5(pPS3), *E.coli* DH5(pPS9), რომლებმაც გამოავლინეს მკვეთრი ინჰიბიტორული აქტივობა რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედების მიმართ, რადიოაქტიული იზოტოპებით მონიშვნის პროცედურა ჩაუტარდათ უჯრედის სამ სასიცოცხლო კომპონენტზე. ეს საშუალებას გვაძლევდა შეგვესწავლა რომელი უჯრედული სამიზნის დონეზე ხდებოდა მასპინძელი უჯრედების ბიოსინთეზის დათრგუნვა ან დაბლოკვა. კერძოდ, რეკომბინანტული ბაქტერიების უჯრედული ცილების, დნმ-ისა და რნმ-ის სინთეზირების სიხშირის გაზომვას ვახდენდით თხევად არეში (C4/NY), წყაბადის რადიოაქტიული იზოტოპით ტრიტიუმით [³H]. უჯრედული ცილები ინიშნებოდა წყაბადის იზოტოპი [³H]-ლეიცინით, ნუკლეინის მჟავები [³H]-თიმიდინით და 5[³H]-ურიდინით (მეთოდები თავი 5., 5.2).

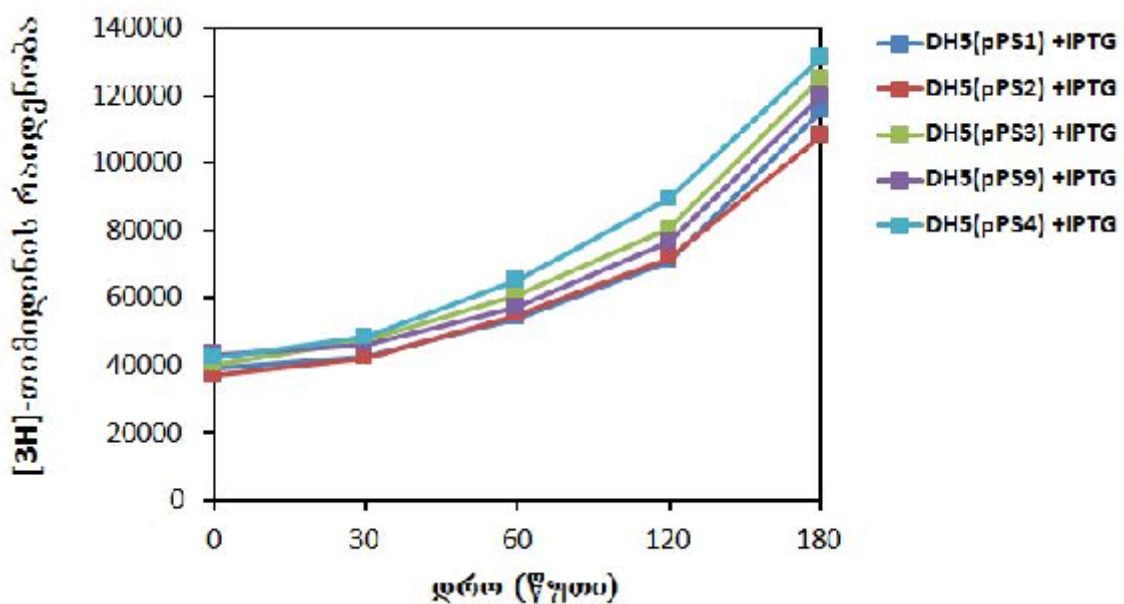
ექსპერიმენტებში უარყოფით კონტროლად ვიყენებდით, რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებს რომელთა პლაზმიდა შეიცავდა კლონირებულ ფრაგმენტს რევერსული ორიენტაციით ანუ პლაზმიდაში ინტეგრირებულ გენს არ ქონდა ფუნქციონირების უნარი - *E.coli* DH5(pPS4), *E.coli* DH5(pPS10).

რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების პროლიფერაციის პროცესში უჯრედული მაკრომოლეკულების (დნმ, რნმ, ცილები) სინთეზის სიხშირეს ვსაზღვრავდით კლონირებული გენის ექსპრესიიდან დროის რამდენიმე მონაკვეთზე. რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებში დნმ-ის მოლეკულების სინთეზირების სიხშირის განსაზღვრისათვის ვიყენებდით წყაბადის რადიოაქტიულ იზოტოპს [³H]-თიმიდინს, ხოლო რნმ-ის მიკრომოლეკულების სინთეზის სიხშირეს ვსაზღვრავდით 5[³H]-ურიდინით. რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების პროლიფერაციის პროცესში უჯრედული კომპონენტების რადიოაქტიული იზოტოპებით სამწუთიანი

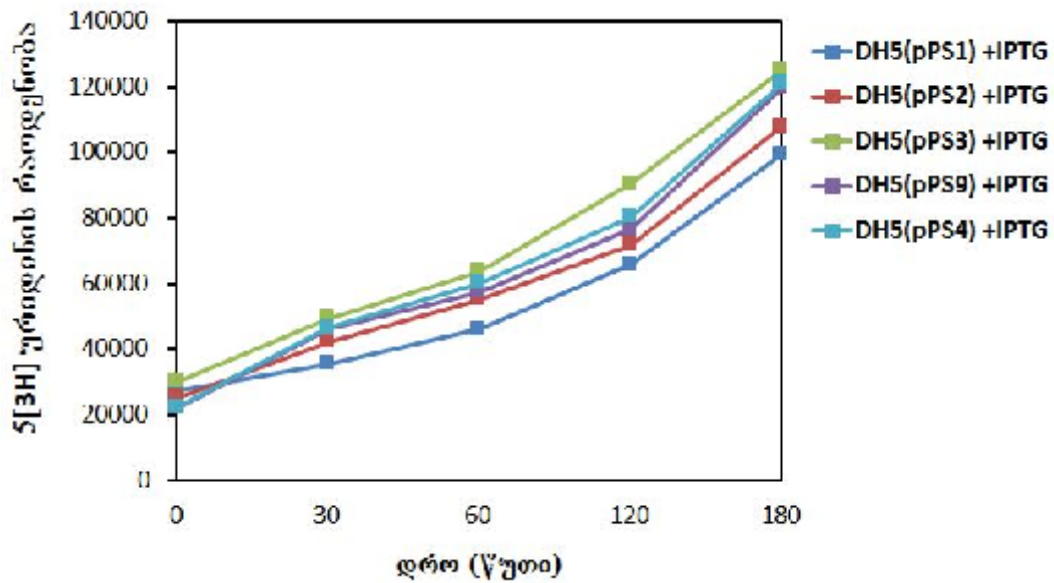
მონიშვნის პროცედურით ვსაზღვრავდით დროს ამ მომენტში საკვლევი მაკრომოლეკულების რა რაოდენობა დასინთეზირდა. მიღებულმა შედეგებმა აჩვენეს, რომ გენის ექსპრესიის პირობებში არცერთმა რეკომბინანტულმა კლონმა არ მოახდინა რეციპიენტი *E. coli*-ს უჯრედებში დნმ-სა და რნმ-ის სინთეზირების სიხშირის შეცვლა. არამედ, რეციპიენტი უჯრედების ნუკლეინის მჟავების რადიოაქტიული იზოტოპებით მონიშვნის შემდეგ, სინთეზირებული დნმ-ის და რნმ-ის მოლეკულებში რადიოაქტიული სიგნალი მატულობდა ისევე, როგორც უარყოფით საკონტროლო სინჯში სინთეზირებული დნმ-ის და რნმ-ის მოლეკულებში. ანუ რაც მეტი ნუკლეინის მჟავა სინთეზირდებოდა მით მეტი პრეკურსორი უკავშირდებოდა.

გრაფიკი 7 და 8-ზე ნაჩვენებია, რომ Sb-1 ბაქტერიოფაგის როგორც ინდივიდუალური, ასევე ორ და ოთხ გენიანი ფრაგმენტების მომცველ რეკომბინანტული კლონებში გენის ექსპრესიის პირობებში ისეთივე სიხშირით სინთეზირდება დნმ-ისა და რნმ-ის მაკრომოლეკულები, როგორც გამოყენებულ უარყოფით კონტროლში (DH5(pPS4)), სადაც გენის ექსპრესია თავისთავად გამორიცხებულია.

გრაფიკი 7. რეკომბინანტული კლონების კლონირებული გენის ექსპრესიის გავლენა *E. coli*-ს უჯრედებში დნმ-ის სინთეზზე



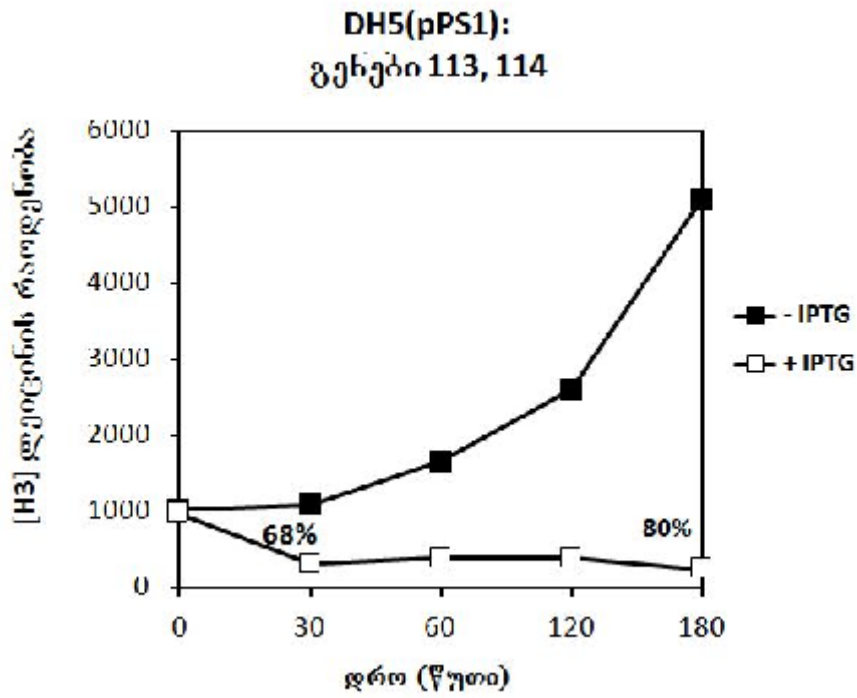
გრაფიკი 8. რეკომბინანტული კლონების კლონირებული გენის ექსპრესიის გავლენა *E. coli*-ს უჯრედებში რნმ-ის სინთეზზე



4.2 რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებში უჯრედული ცილების სინთეზირების სიხშირის განსაზღვრა [³H]-ლეიციონით

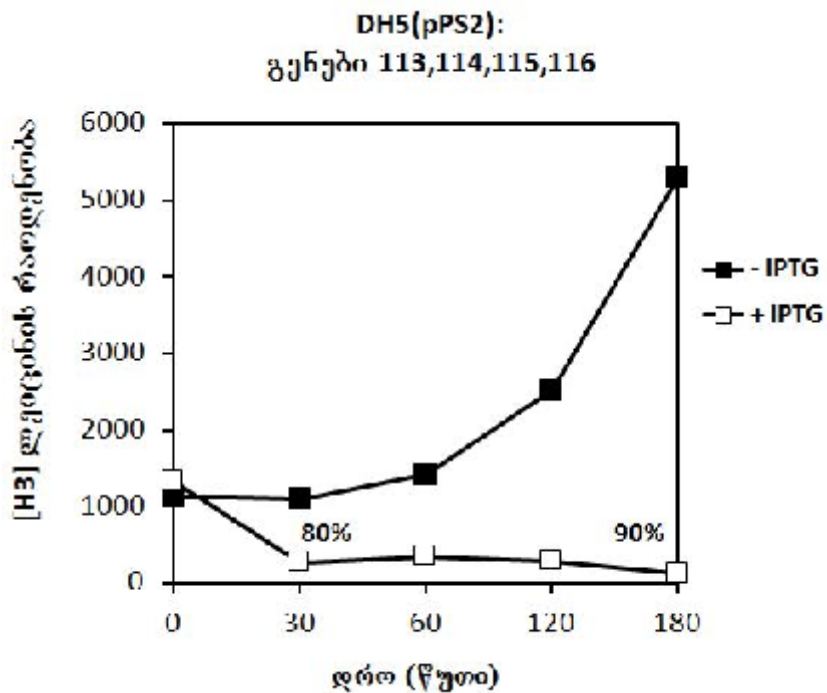
E. coli DH5 რეციპიენტ ბაქტერიულ უჯრედებში ცილების სინთეზირების სიხშირეს ვსაზღვრავდით წყალბადის რადიოაქტიური იზოტოპით [³H]-ლეიციონით. რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების ესპონენციალური ფაზის სუსპენზიას ვყოფდით ორ ალიკვოტად, სადაც ერთს ალიკვოტს ემატებოდა კლონირებული გენის ექსპრესიის ინდუქტორი (0.1 mM IPTG). შემდეგ დროის რამოდენიმე მონაკვეთზე ვახდენდით როგორც ინდუქტორიანი, ასევე უინდუქტორო სინჯების [³H]-ლეიციონით სამწუთიან მონიშვნას, რითაც ვსაზღვრავდით უჯრედული ცილების სინთეზირების სიხშირეს. შედეგების მიხედვით, რეკომბინანტული კლონები ფაგის ორი და ოთხი გენის მომცველი ფრაგმენტით ავლენდნენ უჯრედული ცილების სინთეზირების სწრაფ დაბლოკვას. კერძოდ, *E.coli* DH5(pPS1) ბაქტერიულ კლონში ინდუქციიდან 30 წთ-ში უჯრედული ცილების სინთეზირება მცირდება 68%-ით, რომელიც შემდეგ თანაბრად მცირდება 80%-მდე 180 წთ-ის განმავლობაში (გრაფიკი 9).

გრაფიკი 9. DH5(pPS1) კლონის ფაგის გენის ექსპრესიის გავლენა ცილების სინთეზის სიხშირეზე *E. coli*-ს უჯრედებში



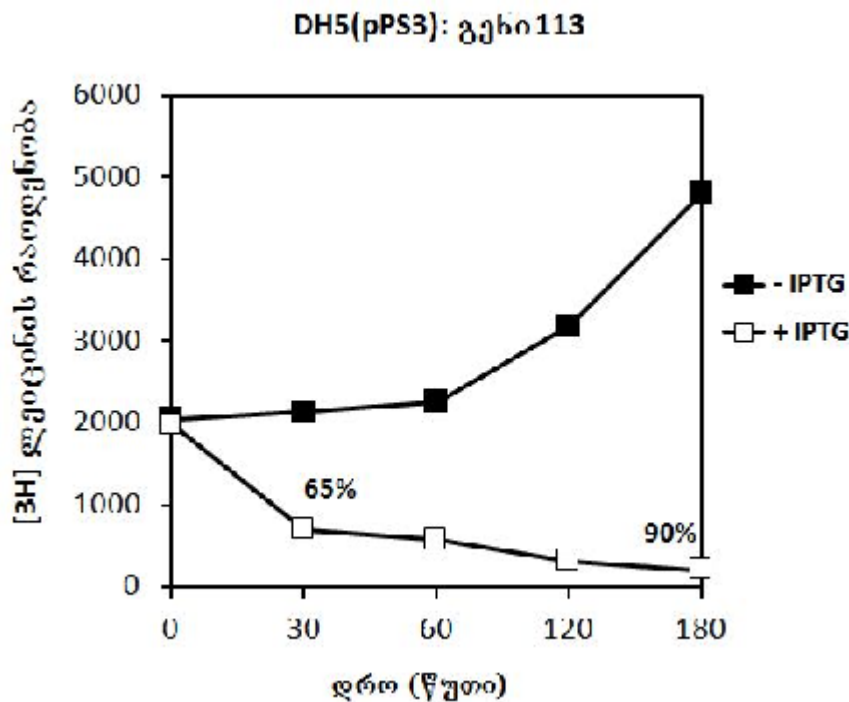
ოთხი გენის მომცველი რეკომბინანტული კლონი *E. coli* DH5(pPS2) ავლენს ცილების სინთეზის 80% ინჰიბირებას ინდუქციიდან 30 წთ-ში (გრაფიკი 10).

გრაფიკი 10. DH5(pPS2) კლონის ფაგის გენის ექსპრესიის გავლენა ცილების სინთეზის სიხშირეზე *E. coli*-ს უჯრედებში



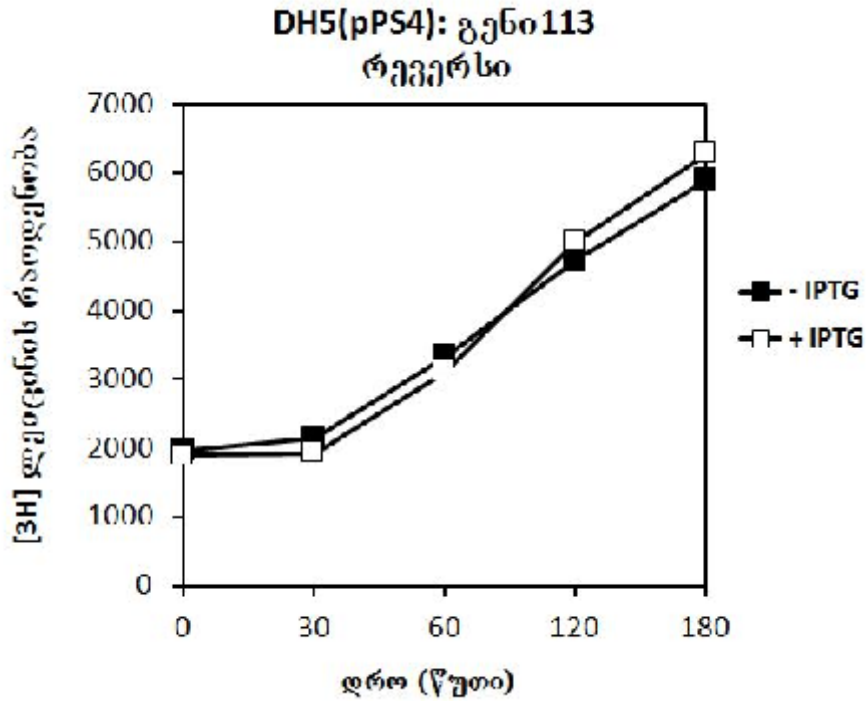
კლონირებული გენის ექსპრესიის პირობებში რადიოაქტიული პრეკურსორების ჩასმა უჯრედულ ცილებში თანაბრად იბლოკება ფაგის ერთი გენის მატარებელი რეკომბინანტული კლონების შემთხვევაში. *E.coli* DH5(pPS3) რეკომბინანტული კლონის ინდუქციიდან 30 წთ-ში უჯრედული ცილების სინთეზი მცირდება 65%-ით, დროის შემდეგ წერტილებზე დინამიურად მცირდება სინთეზირებული ცილების რაოდენობა და მაქსიმალურ ინჰიბირებას 90%-ს ავლენს ინდუქციიდან 180 წუთში, ხოლო უინდუქტორო ალიკვოტში, სადაც არ ხდება გენის ექსპრესია ბაქტერიული უჯრედები განაგრძობენ ზრდას სტანდარტული მრუდის მიხედვით (გრაფიკი 11).

გრაფიკი 11. DH5(pPS3) კლონის ფაგის გენის ექსპრესიის გავლენა ცილების სინთეზის სიხშირეზე *E. coli*-ს უჯრედებში



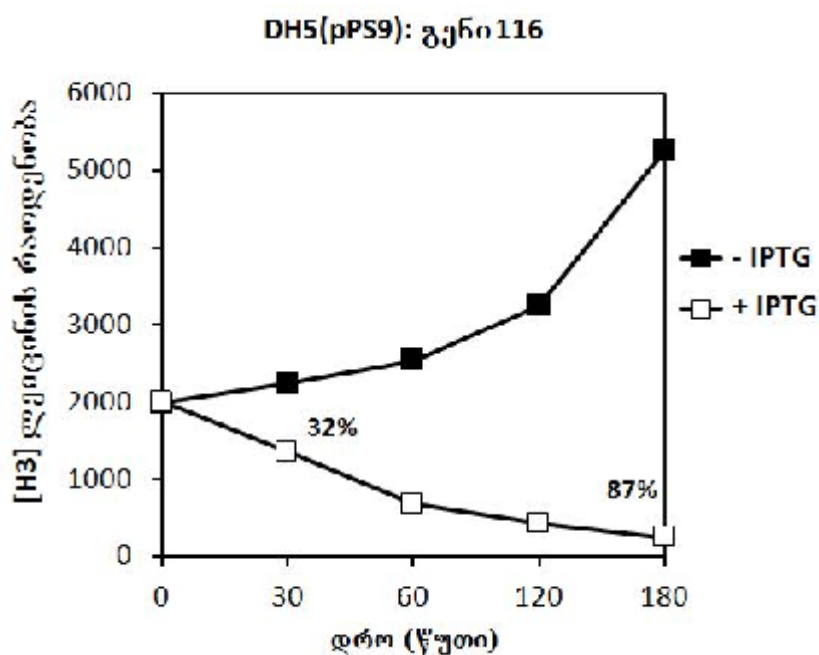
ექსპერიმენტში ასევე გამოყენებული იქნა უარყოფითი კონტროლი, რეკომბინანტული კლონი რევერსი მიმართულებით ჩასმული ფრაგმენტით *E.coli* DH5(pPS4), სადაც ინდუქციის შემდეგ ინდუქტორიანი და უინდუქტორო სინჯები ერთნაირად განაგრძობენ უჯრედული ცილების სინთეზს სტანდარტული მრუდის მიხედვით, რადგან ამ შემთხვევაში კლონირებული გენის ექსპრესია არ ხდება (გრაფიკი 12).

გრაფიკი 12. DH5(pPS4) კლონის ფაგის გენის ექსპრესიის გავლენა ცილების სინთეზის სიხშირეზე *E. coli*-ს უჯრედებში

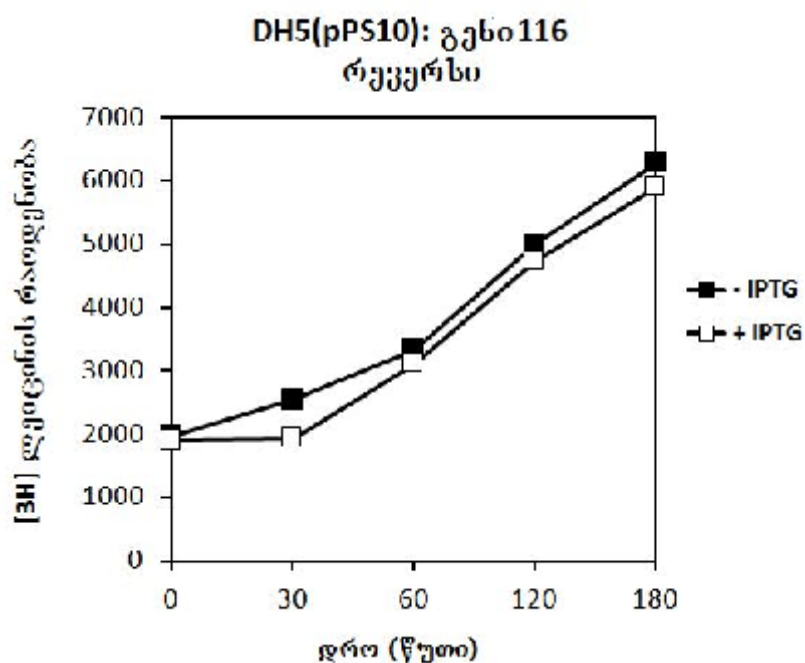


რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონი *E.coli* DH5(pPS9), გენის ექსპრესიის მომენტიდან 30 წთ-ში ავლენს უჯრედული ცილების სინთეზის დაბლოკვას 32%-ით, ინჰიბირების პროცესი თანაბრად გრძელდება და 180 წთ-ზე ცილების სინთეზის ინჰიბირება აღწევს 87%-ს; ხოლო უინდუქტორო ალიკვოტში უჯრედული ცილის სინთეზი არ ითრგუნება (გრაფიკი 13). ამ შემთხვევაში უარყოფით კონტროლად გამოყენებული იქნა იგივე 116-ე გენის რევერსულად შემცველი კლონი *E.coli* DH5(pPS10), სადაც ინდუქტორიან და უინდუქტორო სინჯებში უჯრედული ცილის სინთეზი არ ფერხდება (გრაფიკი 14).

გრაფიკი 13. DH5(pPS9) კლონის ფაგის გენის ექსპრესიის გავლენა ცილების სინთეზის სიხშირეზე *E. coli*-ს უჯრედებში



გრაფიკი 14. DH5(pPS10) კლონის ფაგის გენის ექსპრესიის გავლენა ცილების სინთეზის სიხშირეზე *E. coli*-ს უჯრედებში



მიღებული შედეგების მიხედვით, Sb-1 ბაქტერიოფაგის ორი და ოთხი გენის მომცველი რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონები *E.coli* DH5(pPS1) და *E.coli* DH5(pPS2) ავლენენ უფრო ძლიერ ინჰიბიტორულ აქტივობას პატრონი-რეციპიენტი უჯრედების (*E.coli* DH5) მიმართ, ვიდრე ფაგის ერთი გენის მომცველი კლონები: *E.coli* DH5(pPS3) და *E.coli* DH5(pPS9).

წარმოდგენილი კვლევის შედეგების საფუძველზე შეგვიძლია ვთქვათ, რომ ვირულენტული Sb-1 ფაგის ლეტალური 113 და 114 გენების ექსპრესია *E.coli*-ს უჯრედებში იწვევს რეციპიენტი უჯრედების ზრდის ინჰიბირებას (უჯრედის მეტაბოლიზმის დაბლოკვას) უჯრედული ცილების ბიოსინთეზის მექანიზმის დაზიანებით.

შედეგების განხილვა

მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის (WHO) ბოლო მონაცემებით (2012-1013) დღეისათვის ანტიბიოტიკორეზისტენტობა წარმოადგენს სერიოზულ საფრთხეს ადამიანის ჯანმრთელობისათვის. სტატისტიკური მონაცემების მიხედვით, ევროკავშირის ქვეყნებში ყოველწლიურად მულტირეზისტენტული ბაქტერიებით გამოწვეული ინფექციებით დაახლოებით 25,000 პაციენტი იღუპება. განსაკუთრებულ საშიშროებას წარმოადგენს მეტიცილინ-რეზისტენტული სტაფილოკოკი, რომელიც აშშ-ში ყოველწლიურად აინფიცირებს 94,000 ადამიანს, საიდანაც 19,000 ლეთალური შედეგით სრულდება [72, 156]. ასევე, აღწერილია სხვადასხვა პათოგენური ბაქტერიების მულტირეზისტენტული ფორმების საგანგაშო მატება [23, 36, 52, 96], რაც გადაუდებლად მოითხოვს ახალი ანტიბაქტერიული საშუალებების შექმნას და განვითარებას.

ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიული შტამების გლობალურად გავრცელებამ და თანამედროვე ანტიბაქტერიული საშუალებებით მასთან ბრძოლის სირთულემ განაახლა ინტერესი ფაგოთერაპიის მიმართ [3, 55, 72, 96, 148].

ბაქტერიოფაგების თერაპიული თვალსაზრისით გამოყენებას ხანგრძლივი ისტორია გააჩნია. მრავალი წელია ბაქტერიოფაგები გამოიყენება სხვადასხვა მიკროორგანიზმებით გამოწვეული ინფექციური დაავადებების პროფილაქტიკისა და მკურნალობისათვის. დღეისათვის, ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული ბაქტერიული შტამების მზარდი გავრცელების გამო, ფართო სპექტრის მქონე ვირულენტული ბაქტერიოფაგების სამკურნალო მიზნით გამოყენება მეტ აქტუალობას იძენს. შესაბამისად, მათი ბიო-სამედიცინო კუთხით შესწავლა მნიშვნელოვანია.

დღეისათვის, ვირულენტური ბაქტერიოფაგები განიხილება, როგორც ანტიბაქტერიული საშუალებების ერთ-ერთი ალტერნატიული საშუალება სხვადასხვა ეთიოლოგიის მქონე ინფექციების პრევენციისათვის. ფაგების მიმართ მაღალი ინტერესი განპირობებულია, ერთის მხრივ, ანტიბიოტიკების მიმართ მულტირეზისტენტული ბაქტერიული შტამების გავრცელებით, მეორეს მხრივ კი,

ფაგების მოქმედების მაღალი სპეციფიკურობის, ეფექტურობისა და უვნებლობის ფაქტორით [83, 84, 87, 116, 156].

თერაპიული პრეპარატების შექმნისათვის, მათი ხარისხისა და ეფექტურობის გასაზრდელად მეტად მნიშვნელოვანია ბაქტერიული ვირუსების მოლეკულურ დონეზე დახასიათება. სამკურნალო-პროფილაქტიკური მიზნით ბაქტერიოფაგების გამოყენების ერთ-ერთ ძირითად პირობას წარმოადგენს ფაგი-ბაქტერიის ურთიერთქმედების მექანიზმების დადგენა. ფაგური ინფექცია გახლავთ მაღალორგანიზებული პროცესი, რომლის განხორციელებაში მონაწილეობას ღებულობს როგორც ბაქტერიული, ასევე ფაგოსპეციფიური ფერმენტები.

ბაქტერიოფაგის გამრავლების ლითიური ციკლის დროს ვირიონი მაღალი სპეციფიურობით ადსორბირდება მიკრობის რეცეპტორულ უბნებზე. შემდეგ საფეხურზე, ფაგის გენომი ფაგის წანაზარდის (კუდის) გავლით გადადის უჯრედში. ეს პროცესი ხორციელდება ზუსტი, მაღალორგანიზებული მექანიზმით: ფაგის ადსორბციის შემდეგ, მიკრობის უჯრედის კედლის შემადგენლობაში არსებული თუთიის იონები (Zn^{2+}) იწვევენ ფაგის წანაზარდის დისტალური ნაწილის ბოჭკოების გახლეჩვას. გამოთავისუფლებული ბაზალური ფირფიტა კუდის დისტალურ ნაწილში მოთავსებული ფერმენტის ენდოლიზინის (ლიზოციმის) გამოყოფით ახდენს ბაქტერიული უჯრედის კედლის მიმდებარე უბნის დაშლას. ამავდროულად, შალითაში გამოთავისუფლებული კალციუმის (Ca^{2+}) იონები იწვევენ ატფ-აზას აქტივირებას, რაც თავის მხრივ, განაპირობებს შალითის შეკუმშვას და უჯრედში ციტოპლაზმური მემბრანის გავლით კუდის ღერძის შეჭრას, რასაც მოსდევს ვირუსული დნმ-ის სწრაფი გადასვლა უჯრედის ციტოპლაზმაში [24, 49, 51, 88]. უჯრედში ფაგის დნმ-ის შესვლის შემდეგ მასპინძელი უჯრედის რნმ-პოლიმერაზას მიერ ხდება ფაგის დნმ-ის პრომოტორის ამოცნობა და ადრეული გენების ტრანსკრიფცია [24, 115]. ადრეული გენების პროდუქტები იცავენ ფაგურ დნმ-ს და ახდენენ მასპინძელი უჯრედის რესტრუქტურიზაციას: აინჰიბირებენ მასპინძელი უჯრედის პროტეაზებს, რესტრიქციულ ენზიმებს, შლიან სხვადასხვა ცილებს. შუალედური გენების ტრანსკრიპცია მიმართულია ფაგის ახალი დნმ-ის სინთეზისთვის. შუალედურ გენებს მოჰყვება გვიანი გენები, რომლებიც აკოდირებენ ფაგური ნაწილაკების აწყობას. ბაქტერიული უჯრედის დნმ-ის დეგრადაცია და

მატრიცული რნმ-ის ტრანსლაციის ინჰიბირება - ეს ის მექანიზმებია, რომელიც პარალელურად მიმდინარეობს უჯრედში [24, 49, 50]. ლითიური ფაგის სასიცოცხლო ციკლის საბოლოო საფეხურია ფაგის სრულყოფილი ვირიონების დაგროვება და ახალი გენერაციის გამოთავისუფლება მასპინძელი უჯრედის ლიზისის გზით [24, 88].

სწორედ ასეთი, ლითიური მოქმედების მექანიზმის არსებობის გამო, თერაპიული მიზნებისათვის ვირულენტული ბაქტერიოფაგების გამოყენებას არსებითი მნიშვნელობა ენიჭება. განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია, დიდი გენომის მქონე სტაფილოკოკური მიოვირუსები, რომლებიც ერთიანდებიან Twort-მსგავსი ბაქტერიოფაგების გვარში, *Spounavirinae* ქვეოჯახში. ფაგების აღნიშნულ ჯგუფში გაერთიანებულია შემდეგი ბაქტერიოფაგები: Sb-1 [87], ISP [116, 159], K [123], 812 [124], რომელთა გენომის მოდულარული სტრუქტურა შესწავლილია და ასევე აღწერილია მათი თერაპიაში გამოყენების საიმედო პოტენციალი. მაგ., შესწავლილია, სტაფილოკოკური ფაგი K-ს ბიოფილმებზე ეფექტური მოქმედება, რაც გამოიხატება მათი წარმოქმნის პრევენციით ან დაშლით [77]; გამოქვეყნებულია კისტოზური ფიბროზით დაავადებულ პაციენტებში სტაფილოკოკური კოლონიზაციის წინააღმდეგ Sb-1 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის წარმატებული გამოყენება [87]; შესწავლილია, ISP სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის ეფექტური გამოყენება დამწვრობების წინააღმდეგ [116, 159].

ლითიური ბაქტერიოფაგის გენომი აკოდირებს მრავალ გენს, რომელთა პროდუქტები ტოქსიურია ბაქტერიული უჯრედების სასიცოცხლო კომპონენტების მიმართ.

წარმატებული ფაგური ინფექციის შემთხვევაში, განსაკუთრებით აღსანიშნავია ფაგის გენომით კოდირებული ნუკლეოზური ფერმენტები (ცილები), რომლებიც ცნობილია, როგორც ლიზინები ან ენდოლიზინები. ისინი ხასიათდებიან ბაქტერიული უჯრედის პეპტიდოგლიკანის შრის ან ნუკლეინის მჟავას სწრაფად დახლეჩვის უნარით. ლითიური ფაგის გენომით კოდირებულ ერთ-ერთ უმნიშვნელოვანეს ცილას წარმოადგენს ჰოლინი, რომელიც უჯრედის შიდა მემბრანაზე წარმოქმნის ფორებს, რომელთა გავლით ლიზინი ადვილად აღწევს პეპტიდოგლიკანურ შრემდე. მოქმედების ამგვარი მექანიზმი წამოაჩენს

ფაგოსპეციფიურ ცილებს, როგორც ახალი კლასის ანტიბაქტერიულ აგენტებს მაღალი სამიზნე სპეციფიურობით [49, 50, 51, 98, 176]. სწორედ ასეთი ფაგოსპეციფიური ფერმენტების ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა და უჯრედზე მათი მოქმედების მოლეკულური მექანიზმების დადგენა ქმნის რეალურ საფუძველს ახალი კლასის ანტიბაქტერიული პრეპარატების შესაქმნელად. ამ მიმართულებით ჩატარებული სამეცნიერო კვლევა მეტად აქტუალურია ახალი თაობის ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული ბაქტერიების გლობალური გავრცელების პირობებში.

კვლევებმა აჩვენეს, რომ რეციპიენტ ბაქტერიულ უჯრედებში ფაგოსპეციფიური გენების ექსპრესია უჯრედის მიმართ ავლენს ბაქტერიოციდულ ეფექტს [85, 97, 121, 140, 151, 152, 167]. ყველა ასეთი ფაგოსპეციფიური გენის პროდუქტი შესაძლოა განხილული იქნას, როგორც ახალი ანტიბიოტიკის მოქმედების მექანიზმის პოტენციური საფუძველი. ამ მიმართულებით დღეისთვისაც მრავალი კვლევა მიმდინარეობს, მათ შორისაა ჯ. ლიუსა და მისი კოლეგების მიერ გამოქვეყნებული ნაშრომი [97], სადაც ნათლად არის წარმოჩენილი ფაგოსპეციფიური გენების პოტენციური ანტიბაქტერიული საშუალებების განვითარებაში. მკვლევარების მიერ დასეკვენირებული იქნა 26 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის გენომი და იდენტიფიცირებული იქნა ვირულენტული ფაგებით კოდირებული 31 პოლიპეპტიდი. ამ ფაგოსპეციფიური პოლიპეპტიდების მაკოდირებელი გენების ექსპერია იწვევს *S.aureus* ბაქტერიების ზრდის ინჰიბირებას. ასევე, იდენტიფიცირებული იქნა აღნიშნული პოლიპეპტიდების უჯრედული სამიზნეები [97]. პოლიპეპტიდებისა და უჯრედული სამიზნეების ურთიერთქმედების მექანიზმების შესწავლით აღმოჩენილი იქნა ის მოლეკულური მექანიზმები, რომელთა საშუალებითაც ფაგოსპეციფიური პოლიპეპტიდები ახდენენ უჯრედული სამიზნეების ინჰიბირებას. ლიგანდ-სამიზნის ურთიერთქმედების შესწავლა უზრუნველყოფდა იმ პრინციპის დადასტურებას, რომ ფაგოსპეციფიური გენები შესაძლოა ახალი ანტიბაქტერიული მექანიზმების განვითარების საფუძველს წარმოადგენდნენ [97].

მიუხედავად იმისა, რომ მრავალი ფაგოსპეციფიური ლითიური ენზიმი, როგორც ანტიბაქტერიული საშუალება უკვე წარმატებულად იქნა გამოყენებული [49,

99, 144], ჯერ კიდევ შეუსწავლელია მრავალი ფაგოსპეციფიური გენის ციტოტოქსიური მოქმედების მექანიზმი.

ფაგოსპეციფიური პირობით ლეთალური გენების კლონირების სტრატეგია გამოიყენა მეცნიერთა ჯგუფმა ი. შიბაიამასა და ე. დაბის ხელმძღვანელობით [143]. მათ მოახდინეს *Rhodococcus equi*-ის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგი YF1-ის ფაგოსპეციფიური გენების იდენტიფიკაცია, რომელთა ექსპრესია პათოგენურ მასპინძელ უჯრედებში იწვევს ლეთალურ ეფექტს.

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა, სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი Sb-1-ის გენომში ლეთალური ეფექტის მქონე გენების სკრინინგი და ფაგოსპეციფიური გენების ექსპრესიის პირობებში რეციპიენტ უჯრედებზე რეკომბინანტული ცილის ბაქტერიოციდული მოქმედების ეფექტის და მექანიზმის შესწავლა.

განსაკუთრებული ინტერესი Sb-1 ბაქტერიოფაგის მიმართ გამოწვეულია იმით, რომ იგი ისტორიულად წარმოადგენდა პოლივალენტური თერაპიული პრეპარატის [მწარმოებელი - გ.ელიავას ინსტიტუტი] მნიშვნელოვან კომპონენტს, რომელიც წარმატებულად გამოიყენებოდა *S.aureus*-ით გამოწვეული ინფექციების წინააღმდეგ, მათ შორის მეტიცილინ-რეზისტენტული სტაფილოკოკური ინფექციების წინააღმდეგ [28, 83, 87, 116].

ლითიური ბაქტერიოფაგი Sb-1 გაერთიანებულია Twort-მსგავსი ვირუსების გვარის, SPO1-მონათესავე ფაგების ქვეოჯახში, რომლის სახელწოდებაცაა *Spounavirinae* [39, 80, 94, 98]. აღნიშნული ოჯახი აერთიანებს ისეთ ბაქტერიოფაგებს, როგორებიცაა: სტაფილოკოკური ფაგები K [123], G1 და Twort [90], ISP [116, 159], *Lactobacillus plantarum*-ის ფაგი LP65 [34], *Bacillus subtilis*-ის ფაგი SPO1 [150, 151].

ჩ. სტიუარტისა და მისი ჯგუფის მიერ შესწავლილი იქნა *B.subtilis*-ის ფაგი SPO1-ის გენომით კოდირებული ფაგოსპეციფიური ცილების ჯგუფი, რომლებიც ბაქტერიების სასიცოცხლო ფუნქციების ინჰიბირების გზით მონაწილეობენ მასპინძელი უჯრედების მეტაბოლიზმის დაბლოკვაში [150, 167].

გამომდინარე იქიდან, რომ Sb-1 და SPO1 ბაქტერიოფაგების დნმ-ებს შორის არსებობს მნიშვნელოვანი ჰომოლოგია [87, 158], გადავწყვიტეთ შეგვესწავლა Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომით კოდირებული ბაქტერიოციდული აქტივობა, რომელიც

შესაძლოა განგვიხილა, როგორც პოტენციური საფუძველი ახალი კლასის ანტიბაქტერიული საშუალებების შესაქმნელად.

ჩვენი კოლეგების - ჯ. ლიუსა [97] და ი. შიზაიამასაგან [143] განსხვავებით, ავირჩიეთ კვლევის განსხვავებული სტრატეგია. კერძოდ, სტაფილოკოკური Sb-1 ბაქტერიოფაგის პირობით-ლეთალური გენების ექსპრესიას ფაგის ბუნებრივი მასპინძლის - გრამ-დადებითი სტაფილოკოკების ნაცვლად, ვახდენდით გრამ-უარყოფით *E.coli*-ის უჯრედებში. კვლევის არჩეული გზა არ იყო შემთხვევითი; ჩვენ ვუშვებდით, რომ ფაგოსპეციფიური გენის ექსპრესიით გამოვლენილი ბაქტერიოციდული აქტივობა არ არის შეზღუდული მხოლოდ პატრონ ბაქტერიულ უჯრედზე ზემოქმედებით, ანუ ფაგოსპეციფიური ცილების ბაქტერიოციდული აქტივობის სპექტრი საკმაოდ ფართო უნდა ყოფილიყო პათოგენური ბაქტერიების მიმართ. კვლევის დადებითი შედეგი შესაძლოა კარგი საფუძველი ყოფილიყო ახალი, ფართო სპექტრის მქონე ანტიბაქტერიული საშუალებების შექმნისათვის.

კვლევის მიზნებიდან გამომდინარე, სამუშაოს საწყის ეტაპზე ჩატარდა Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ანალიზი. აღნიშნული ფაგის გენომის ზომა შეესაბამება 127,188 ნუკლეოტიდურ წყვილს. მისი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა საიდენტიფიკაციო ნომრით - ID-HQ163896 განთავსებულია გენომის საერთაშორისო მონაცემთა ბაზაში [87].

Sb-1 ფაგის გენომში მოვახდინეთ ფუნქციონალური ღია წაკითხვის ჩარჩოების, ადრეული პრომოტორების, ტრანსკრიფციის ტერმინატორების იდენტიფიცირება. ფაგის გენომის ანალიზის შედეგად, იდენტიფიცირებული იქნა 183 ღია წაკითხვის ჩარჩო, საიდანაც 59 ღია წაკითხვის ჩარჩო წარმოდგენილია რიბისომა დამაკავშირებელი საიტის ზუსტი თანმიმდევრობით **AAAGGAGG** (შაინ-დალგარნოს კონსენსუს თანმიმდევრობა).

კვლევის ძირითადი მიზნიდან გამომდინარე, Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში უნდა მოგვეხდინა ადრეული გენების ტრანსკრიფციის საწყისი წერტილის ანუ ადრეული პრომოტორების იდენტიფიკაცია, რადგან ფაგური ინფექციის დროს სწორედ ადრეული გენები უზრუნველყოფენ მასპინძელ ბაქტერიულ უჯრედში მნიშვნელოვან ცვლილებებს, კერძოდ, აინჰიბირებენ უჯრედულ პროტეაზებს,

ბაქტერიულ რესტრიქციულ ენზიმებს, შლიან უჯრედის მეტაბოლიზმისათვის საჭირო სხვადასხვა ცილას.

როგორც ავღნიშნეთ, Sb-1 ბაქტერიოფაგს ახასიათებს მაღალი ჰომოლოგია SPO1 ფაგთან, ამიტომ Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში ადრეული პრომოტორების საიდენტიფიკაციოდ ვახდენდით სწორედ SPO1 ფაგის ადრეული პრომოტორების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის ჰომოლოგიური თანმიმდევრობების სკრინინგს. შედეგად, Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში იდენტიფიცირებული იქნა 27 ადრეული პრომოტორი (PE1-PE27), რომელთა პოზიცია ფაგის გენომში შეესაბამებოდა ტრანსკრიფციის ტერმინატორის სიგნალსა და მომდევნო გენის რიბოსომა დამაკავშირებელ საიტს შორის უბანს, ან ერთი გენის ტერმინაციის კოდონსა და მომდევნო გენის რიბოსომა დამაკავშირებელ საიტს შორის უბანს. ფაგის გენომში იდენტიფიცირებული 27 ადრეული პრომოტორი სრულად აკმაყოფილებს ადრეული პრომოტორის კონსესუს ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას [-35 TTGACA (N15-17) -10 TATAAT]. აღწერილი მეთოდით მოვახდინეთ ადრეული პრომოტორების იდენტიფიცირება, ხოლო გენები, რომელთა ინიციაციას ახდენდნენ ადრეული პრომოტორები ყოველ მომდევნო ტერმინაციის სიგნალამდე, წარმოადგენენ ე.წ. ადრეულ გენებს. აღნიშნული კრიტერიუმით ადრეულ გენებად იდენტიფიცირებული იქნა გენები, რომლებიც დაუყოვნებლივ მოსდევენ ადრეულ პრომოტორს.

Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში იდენტიფიცირებული ადრეული პრომოტორით ინიცირებულ გენებს შორის მოვახდინეთ პირობით-ლეთალური გენების სკრინინგი. კერძოდ, ვახდენდით იმ ადრეული პრომოტორების სელექციას, რომელთა მიერ კოდირებულ გენებს შორის არ იყო გადაფარვა, ანუ ერთი გენის ტერმინაციულ კოდონს მოსდევდა შემდეგი გენის სასტარტო კოდონი. შედეგად, Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში შერჩეული იქნა ოთხი გენი: 113, 114, 115, 116, რომელთა ინიცირება ხდება ერთი ადრეული პრომოტორით (PE19). გენი 113-ის ინიციაციის კოდონის (ATG) პოზიცია Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში შეესაბამება 83,899-ს, ხოლო ტერმინაციის ტრიპლეტის (TAA) პოზიციაა 84,936. შემდეგი მომდევნო გენი 114-ის სასტარტო კოდონი იწყება ზუსტად 84,936 პოზიციაზე, ანუ გენი 114-ის საინიციაციო

კოდონის პირველი ნუკლეოტიდი ადენინი წარმოადგებს გენი 113-ის ტერმინაციის კოდონის მესამე ნუკლეოტიდს. მსგავსი სიზუსტით არის წარმოდგენილი მე-19 ადრეული ოპერონით ინიცირებული დანარჩენი ორი გენი: 115 და 116. შესაბამისად, აღნიშნული გენები არ მოიცავენ ერთმანეთის გადამფარავ ფრაგმენტებს და მათი რეგულაცია აბსოლუტურად ინდივიდუალურია, რაც თავისთავად გამორიცხავს ქიმურული ცილების სინთეზს გენების ექსპრესიისას.

Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ანალიზის შედეგად, კლონირების ექსპერიმენტებისათვის შერჩეული იქნა ადრეულ პრომოტორი P_{E19}-ით ინიცირებული ოთხი გენი: 113, 114, 115 და 116.

კვლევის შემდეგ საფეხურს წარმოადგენდა Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომში შერჩეული ადრეული პრომოტორი P_{E19}-ით ინიცირებული პირობით-ლეთალური გენის (ან გენების) მომცველი ფრაგმენტების ამპლიფიკაცია. Sb-1 ფაგის დნმ-ის გაშიფრული ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მიხედვით მოვახდინეთ წყვილი ოლიგონუკლეოტიდების დიზაინი, როგორც თითოეული ინდივიდუალური გენის (113,114,115,116) მომცველი ფრაგმენტებისათვის ცალცალკე, ასევე, კომბინირებულად ორი გენის (113, 114) და ოთხივე გენის ერთდროულად მომცველი ფრაგმენტებისათვის. შესაბამისად, პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციით მოვახდინეთ შერჩეული ფრაგმენტების ამპლიფიცირება.

ფაგის დნმ-ის ლეთალური ეფექტის მქონე ცილების მაკოდირებელი ფრაგმენტების კლონირება შესაძლებელია მხოლოდ ისეთ ვექტორულ სისტემებში, რომელთაც გააჩნიათ ჩასმული ფრაგმენტის გენების ექსპრესიის რეგულირების უნარი. სწორედ ამიტომ, კლონირებისათვის გამოყენებული იქნა pPW19 – *E.coli* DH5 ვექტორული სისტემა, სადაც ვექტორულ პლაზმიდაში კლონირებული დნმ-ის ფრაგმენტების შესაბამისი ცილის სინთეზისათვის აუცილებელია არეში სპეციალური ინდუქტორის, IPTG-ის (იზოპროპილ-β-D-თიოგალაქტოპირანოზიდი) დამატება. ინდუქტორი უზრუნველყოფს pPW19 პლაზმიდის პოლილინკერში ინტეგრირებული Spac I პრომოტორის ინიცირებას, რაც იწვევს პლაზმიდაში ჩასმული გენის ექსპრესიას. შესაბამისად, Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომიდან, როგორც ცალ-ცალკე ინდივიდუალური გენების (113; 114; 115; 116), ასევე ორი გენის (113-114) და ოთხი გენის მომცველი ამპლიკონების ლიგირებისა და კლონირების შემდგომ,

რეკომბინანტული პლაზმიდების ტრანსფორმაციას ვახდენდით აღნიშნულ pPW19 – *E.coli* DH5 ვექტორულ სისტემაში.

იმის გასარკვევად, იყო თუ არა მიღებული რეკომბინანტული პლაზმიდები სწორად კონსტრუირებული, ვახდენდით რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციულ ანალიზს. ეს საშუალებას გვაძლევდა დაგვედგინა, თუ როგორი ორიენტაციით მოხდა ფაგის დნმ-ის ფრაგმენტის ჩაკერება პლაზმიდის გენომში: 5'-3' თუ საწინააღმდეგო, 3'-5' მიმართულებით. რეკომბინანტული პლაზმიდის რესტრიქციულ ანალიზს არსებითი მნიშვნელობა ჰქონდა, რათა შეგვეფასებინა სწორად ხდებოდა თუ არა კლონირებული გენის ან გენების წაკითხვა. აღნიშნულ კვლევებში ადგილი ჰქონდა განსაკუთრებულ შემთხვევას: ფაგის ორი გენის (113 და 114) მომცველი ფრაგმენტის ჩასმა პლაზმიდის გენომში, ყველა ტრანსფორმანტის შემთხვევაში განხორციელდა დუბლიცირებულად.

ჩატარებული ანალიზის შედეგად, შემდეგი კვლევებისათვის შერჩეული იქნა რვა რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონი, როგორც 5'-3' მიმართულებით ჩასმული ფაგის დნმ-ის ფრაგმენტით, ასევე კლონები რევერსი ორიენტაციის (3'-5') შემცველი ფრაგმენტით:

1. *E. coli* DH5(pPS1) - გენი 113,114
2. *E. coli* DH5(pPS2) - გენი 113,114, 115, 116
3. *E. coli* DH5(pPS3) - გენი 113
4. *E. coli* DH5(pPS4) - გენი 113 (რევერსი)
5. *E. coli* DH5(pPS5) - გენი 114
6. *E. coli* DH5(pPS7) - გენი 115
7. *E. coli* DH5(pPS9) - გენი 116
8. *E. coli* DH5(pPS10) - გენი 116 (რევერსი)

გარდა იმისა, რომ რესტრიქციული ანალიზით ვახდენდით რეკომბინანტულ პლაზმიდაში ინტეგრირებული ფაგის ფრაგმენტის ორიენტაციის განსაზღვრას, ასევე ვახდენდით რეკომბინანტული პლაზმიდური დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გაშიფრვას (სეკვენირებას). ეს საშუალებას გვაძლევდა მაქსიმალურად გამოგვერიცხა მუტაციების არსებობა, რაც შესაძლებელია საფუძველი ყოფილიყო ფსევდობაქტერიოციდული ეფექტის გამოვლენისა.

ჩატარდა კლონირების შედეგად მიღებული რვა რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონის პლაზმიდური დნმ სეკვენირება, რომელთაგანაც 6 კლონი 5'-3' მიმართულებით ჩასმული ფრაგმენტით: *E. coli* DH5(pPS1); *E. coli* DH5(pPS2); *coli* DH5(pPS3); *E. coli* DH5(pPS5); *E. coli* DH5(pPS7); *E. coli* DH5(pPS9) და ორი 3'-5' (რევერსი) ორიენტაციით ჩასმული ფრაგმენტით: *E. coli* DH5(pPS4) და *E. coli* DH5(pPS10).

რეკომბინანტული პლაზმიდების დნმ-ის და ნატიური ვექტორული პლაზმიდის (wild-type) დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების შედარებითმა ანალიზმა აჩვენა, რომ ყველა რეკომბინანტული პლაზმიდა ნამდვილად შეიცავს ინტეგრირებული Sb-1 ბაქტერიოფაგის დნმ-ის ფრაგმენტს 5'-3' მიმართულებით. ამასთან, ყოველი ნუკლეოტიდური ფუძე ფაგის დნმ-ის ფრაგმენტში და ფრაგმენტის pPW19 პლაზმიდის დნმ-თან გადაბმის ადგილებში არ შეიცავს არცერთ რეალურ მუტაციას (SNPs), რომელსაც შესაძლოა შეეცვალა საკვლევი გენის/გენების ფუნქცია.

აღსანიშნავია, რომ ფაგის გენომის სეკვენსის ანალიზმა ასევე დაადასტურა, რომ რეკომბინანტული კლონი ფაგის ორი გენის მომცველი ფრაგმენტით ნამდვილად იყო ორმაგად ჩასმული pPW19 პლაზმიდის გენომში და ბაქტერიული კლონები *E. coli* DH5(pPS4) და *E. coli* DH5(pPS10), ნამდვილად შეიცავენ ინტეგრირებულ ფრაგმენტს 3'-5' (რევერსი) მიმართულებით.

კვლევის შედეგებმა აჩვენა, რომ ყველა რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონის რეკომბინანტული პლაზმიდის დნმ 100% იდენტურობას ავლენდა ხელოვნურად შექმნილი რეკომბინანტული პლაზმიდის დნმ-ის თანმიმდევრობასთან.

მიღებული შედეგების საფუძველზე, დავრწმუნდით რა ყველა რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონის სწორად კონსტრუირებაში, კვლევის შემდეგ საფეხურს წარმოადგენდა რეციპიენტ-ბაქტერიულ უჯრედებში რეკომბინანტული პლაზმიდების ექსპრესიით გამოწვეული ცვლილებების შესწავლა. კერძოდ, კლონირებული გენის ან გენების პროდუქტის ინჰიბიტორული აქტივობის დადგენა პატრონი ბაქტერიების მიმართ.

კლონირებული გენის ექსპრესიის პირობებში რეკომბინანტული ბაქტერიების პოპულაციაში სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების რაოდენობრივი შეფასებისათვის კვლევა ჩავატარეთ მყარ და თხევად საკვებ არეზე, ინდუქტორიან და უინდუქტორო

პირობებში. ფაგოსპეციფიური გენის პროდუქტის ანტიბაქტერიული მოქმედების ეფექტურობას ვაფასებდით ინდუქტორიან არეზე წარმოქმნილი კოლონიების რაოდენობის შეფარდებით უინდუქტორო არეზე წარმოქმნილი კოლონიების რაოდენობასთან (კოლონიები [+]*IPTG*/კოლონიები [-]*IPTG*).

მიღებული შედეგების მიხედვით, რეკომბინანტულმა ბაქტერიულმა კლონებმა *Sb-1* ბაქტერიოფაგის ინდივიდუალური გენებით: *DH5(pPS3)*: გენი 113 და *DH5(pPS9)*: გენი 116 - გამოავლინეს 98-99% ბატერიოციდული აქტივობა როგორც მყარ, ისე თხევად საკვებ არეში; ხოლო ფაგის ორი და ოთხ გენიანი ფრაგმენტების მომცველი რეკომბინანტული კლონები *DH5(pPS1)*: გენები 113, 114 და *DH5(pPS2)*: გენები 113, 114, 115, 116 ავლენენ თითქმის 100% ციტოტოქსიურ ეფექტს რეციპიენტ ბაქტერიულ უჯრედებზე.

მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით შეგვიძლია ვთქვათ, რომ *Sb-1* ბაქტერიოფაგის ერთი ადრეული პრომოტორით (*PE19*) ინიცირებული ოთხი გენიდან, 113 და 116 გენები აკოდირებენ ძლიერ ბატერიოციდულ ცილას და აღნიშნული გენების ერთი ოპერონის ქვეშ გაერთიანებული აქტივობა 100%-ით ლეთალურია უჯრედებისათვის.

ვინაიდან, ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგებმა აჩვენა, რომ რეკომბინანტული ბაქტერიული შტამები ფაგის კლონირებული პირობით-ლეთალური გენის ექსპრესიის პირობებში ავლენენ რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედების ზრდის ინჰიბირებას, საინტერესო იყო დაგვედგინა რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედების მეტაბოლიზმის დათრგუნვის მექანიზმი.

ამ მიზნით, განსაზღვრული იქნა ფაგოსპეციფიური რეკომბინანტული ცილის უჯრედული სამიზნეები, რისთვისაც გამოვიყენეთ რადიოაქტიული იზოტოპებით მონიშვნის მეთოდი.

რეკომბინანტულ ბაქტერიულ კლონებს: *E.coli DH5(pPS1)*, *E.coli DH5(pPS2)*, *E.coli DH5(pPS3)*, *E.coli DH5(pPS9)*, რომლებმაც გამოავლინეს მკვეთრი ინჰიბიტორული აქტივობა რეციპიენტი ბატერიული უჯრედების მიმართ, რადიოაქტიული იზოტოპებით მონიშვნის პროცედურა ჩატარდათ უჯრედის სამ სასიცოცხლო კომპონენტზე [დნმ, რნმ, ცილა], ეს საშუალებას გვაძლევდა შეგვესწავლა თუ რომელი უჯრედული ფუნქციის ხარჯზე ხდებოდა მასპინძელი უჯრედების ბიოსინთეზის

დათრგუნვა ან დაბლოკვა. კერძოდ, რეკომბინანტული ბაქტერიების უჯრედული ცილების, დნმ-ისა და რნმ-ის სინთეზირების სიხშირის გაზომვას ვახდენდით წყალბადის რადიოაქტიული იზოტოპით ტრიტიუმით [^3H]. უჯრედული ცილები ინიშნებოდა წყალბადის იზოტოპი [^3H] - ლეიცინით, ნუკლეინის მჟავები [^3H] - თიმიდინით და 5[^3H] - ურიდინით.

საგულისხმოა, რომ მხოლოდ გამრავლების უნარის მქონე უჯრედების სასიცოცხლო კომპონენტები (დნმ, რნმ და ცილები) იკავშირებს რადიოაქტიული იზოტოპის პრეკურსორებს; შესაბამისად, გამოყენებული მეთოდი ზუსტი ინდიკატორია სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების რაოდენობრივი შეფასებისათვის. აღნიშნული მეთოდი სარწმუნო სტანდარტადაა მიჩნეული სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების რაოდენობის შესაფასებლად.

Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ფრაგმენტების შემცველი პლაზმიდების მატარებელი უჯრედების სასიცოცხლო კომპონენტების რადიოიზოტოპებით მონიშვნის კვლევებმა აჩვენა, რომ გენის ექსპრესიის პირობებში არცერთი რეკომბინანტული კლონის რეკომბინანტული ცილა არ ავლენდა ინჰიბიტორულ აქტივობას რეციპიენტი *E. coli* უჯრედების დნმ-ისა და რნმ-ის ბიოსინთეზზე; უფრო მეტიც, რეციპიენტი უჯრედების ნუკლეინის მჟავების რადიოაქტიული იზოტოპებით მონიშვნის შემდეგ სინთეზირებული დნმ-ის და რნმ-ის მოლეკულებში რადიოაქტიული სიგნალი მატულობდა ისევე, როგორც უარყოფით საკონტროლო სინჯში სინთეზირებული დნმ-ის და რნმ-ის მოლეკულებში, ანუ რაც მეტი ნუკლეინის მჟავა სინთეზირდებოდა, მით მეტი პრეკურსორი უკავშირდებოდა სამიზნეს.

რაც შეეხება რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონების უჯრედული ცილების რადიოიზოტოპებით მონიშვნის შედეგებს - კლონირებული გენის ექსპრესიიდან 30 წუთის განმავლობაში ფაგის ორი და ოთხი გენის მომცველი რეკომბინანტული კლონების შემთხვევაში [*E. coli* DH5(pPS1) და *E. coli* DH5(pPS2)] სრულად იბლოკებოდა რეციპიენტი უჯრედების ცილების ბიოსინთეზის პროცესი; ხოლო ფაგის ინდივიდუალური გენების მომცველი კლონები *E. coli* DH5(pPS3) და *E. coli*

DH5(pPS9), პატრონი უჯრედების ცილების ბიოსინთეზის სრულ დაბლოკვას ახდენდნენ ინდუქციიდან 180 წთ-ს განმავლობაში.

წარმოდგენილი კვლევის შედეგების საფუძველზე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ფაგის ერთი ადრეული პრომოტორით (P_{E19}) ინიცირებული ოთხი გენიდან: 113, 114, 115, 116 - ორი გენი 113 და 116 ავლენს მკვეთრად გამოხატულ ციტოტოქსიურ აქტივობას *E.coli* DH5 რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედების მიმართ. აღნიშნული გენების ექსპრესიის პირობებში რეკომბინანტული ცილა gp113 და gp116 იწვევს უჯრედების ზრდის ინჰიბირებას უჯრედული ცილების სწრაფი დეგრადაციის ხარჯზე. ეს უკანასკნელი მიუთითებს იმაზე, რომ Sb-1 ბაქტერიოფაგის ადრეული გენების პროდუქტების (gp113 და gp116) უჯრედულ სამიზნეს რეციპიენტ ბაქტერიულ უჯრედში (*E.coli* DH5) წარმოადგენს ცილის სინთეზი.

Sb-1 ფაგის დნმ-ის გაშიფრულ ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობაში ადრეული გენებით კოდირებული ცილები გაანალიზებულ იქნა ბიოტექნოლოგიური ინფორმაციის ნაციონალური ცენტრის (NCBI) ვებ-გვერდით ხელმოსაწვდომი პროგრამებით (BLASTn, BLASTp, tBLAST). აღნიშნული გენებით კოდირებული ცილებიდან gp113 წარმოაგენს სავარაუდოდ ეგზონუკლეაზას, ხოლო gp 116 კი, ჰიპოტეტურ კონსერვატულ ცილას (ცხრილი 14.).

ცხრილი 14. Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის P_{E19} ადრეული პრომოტორით ინიცირებული გენებით კოდირებული ცილები

გენი	პოზიცია გენომში	გენის ზომა (ნწ)	კოდირებული ცილა	ცილის საიდენტ. ნომერი
113	83899-84936	1038	სავარაუდო ეგზონუკლეაზა	AEJ79750.1
114	84936-85313	378	ჰიპოტეტური ცილა	AEJ79751.1
115	85313-87232	1920	სავარაუდო ეგზონუკლეაზა	AEJ79752.1
116	87232-87828	597	ჰიპოტეტური ცილა	AEJ79753.1

მიღებული შედეგების მიხედვით, Sb-1 ბაქტერიოფაგის ორი და ოთხი გენის მომცველი რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონები *E.coli* DH5(pPS1) და *E.coli* DH5(pPS2) ავლენენ უფრო ძლიერ ინჰიბიტორულ აქტივობას პატრონი-რეციპიენტი უჯრედების (*E.coli* DH5) მიმართ, ვიდრე ფაგის ერთი ინდივიდუალური გენის

მომცველი კლონები: *E.coli* DH5(pPS3) და *E.coli* DH5(pPS9). რეკომბინანტული კლონისათვის *E.coli* DH5(pPS2) რეკომბინანტული ცილის 100%-ით ციტოტოქსიური ეფექტი შესაძლოა აიხსნას რეკომბინანტული ცილის ორმაგი დოზით, რადგან ეს კლონი მოიცავს PE19 ოპერონით ინიცირებულ ოთხივე გენს, საიდანაც ორი გენი ინდივიდუალური ექსპრესიის პირობებშიც ანტიბაქტერიულ ცილას აკოდირებს. რაც შეეხება ფაგის ორი გენის მომცველი რეკომბინანტული კლონის *E.coli* DH5(pPS1) ბაქტერიოციდულ ეფექტს, ამ შემთხვევაშიც ფაგოსპეციფიურმა რეკომბინანტულმა ცილამ გამოავლინა სრული ინჰიბიტორული აქტივობა, თუმცა თეორიულად ლეთალური ეფექტი უნდა ყოფილიყო რეკომბინანტული ცილა gp113-ის ეფექტის მსგავსი. თუმცადა, ფაგის ორი გენის მომცველი კლონის შემთხვევაშიც საქმე გვაქვს რეკომბინანტული ცილის ორმაგ დოზასთან, რეკომბინანტულ პლაზმიდაში დუბლიცირებულად ჩასმული ფაგის ფრაგმენტის გამო.

წარმოდგენილი კვლევის შედეგების საფუძველზე შეგვიძლია ვთქვათ, რომ ვირულენტული Sb-1 ფაგის ლეთალური გენების ექსპრესია *E.coli*-ს უჯრედებში იწვევს რეციპიენტი უჯრედების ზრდის ინჰიბირებას (უჯრედის მეტაბოლიზმის დაბლოკვას) უჯრედული ცილების ბიოსინთეზის მექანიზმის დაზიანებით. აღნიშნული მექანიზმის შესწავლა შესაძლოა რეალურ საფუძველს წარმოადგენდეს ახალი ანტიბაქტერიული საშუალებების შესწავლასა და განვითარებაში.

ამრიგად, ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა Sb-1 ბაქტერიოფაგის ერთი ადრეული პრომოტორით (PE19) ინიცირებული ოთხი გენის პროდუქტის ანტიბაქტერიული ეფექტი რეციპიენტ ბაქტერიულ უჯრედებზე; განსაზღვრული იქნა, რეკომბინანტული ცილის უჯრედული სამიზნეები, ანუ მოქმედების ის მექანიზმები, რის ხარჯზეც ხდება რეკომბინანტული ბაქტერიული უჯრედების მეტაბოლიზმის დათრგუნვა. ციტოტოქსიური ეფექტი, რომელიც გამოვლენილი იქნა Sb-1 ბაქტერიოფაგის კლონირებული გენების ექსპრესიის პირობებში, შესაძლოა რეალურ საფუძველს წარმოადგენდეს ახალი ანტიბაქტერიული საშუალებების შემუშავებისა და განვითარებისათვის.

დასკვნები

1. ვირულენტული სტაფილოკოკური Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობაში განსაზღვრულია ღია წაკითხვის ჩარჩოების, ადრეული პრომოტორების, ტრანსკრიფციის ტერმინატორების რაოდენობა და ლოკალიზაცია;
2. pPW19-*E.coli* DH5 ვექტორულ სისტემაში კლონირებულია Sb-1 ბაქტერიოფაგის გენომის ერთი ადრეული პრომოტორით (PE19) ინიცირებული ოთხი გენი: 113, 114, 115, 116; მიღებულია როგორც ინდივიდუალური, ასევე ორი (113, 114) და ოთხი გენის (113, 114, 115, 116) ერთდროულად მომცველი რეკომბინანტული პლაზმიდები;
3. რეკომბინანტული პლაზმიდების გამოყენებით მიღებულია ექვსი რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონი, პლაზმიდაში ჩასმული ფაგის ფრაგმენტის 5'-3' მიმართულებით: *E. coli* DH5(pPS1), *E. coli* DH5(pPS2), *E. coli* DH5(pPS3), *E. coli* DH5(pPS5), *E. coli* DH5(pPS7), *E. coli* DH5(pPS9); ორი რეკომბინანტული კლონი ჩასმული ფრაგმენტის რევერსი (3'-5') ორიენტაციით: *E. coli* DH5(pPS4) და *E. coli* DH5(pPS10);
4. დადგენილია, რომ კლონირებული გენის ექსპრესიის პირობებში Sb-1 ბაქტერიოფაგის ადრეული გენების (113 და 116) მომცველი რეკომბინანტული ბაქტერიული კლონები: *E. coli* DH5(pPS1), *E. coli* DH5(pPS2), *E. coli* DH5(pPS3) და *E. coli* DH5(pPS9) ავლენენ რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედების ზრდის ინჰიბირებას;
5. შესწავლილია Sb-1 ბაქტერიოფაგის ადრეული გენების პროდუქტების უჯრედული სამიზნეები *E. coli* პატრონ-რეციპიენტ უჯრედებში.
6. დადგენილია, რომ Sb-1 ბაქტერიოფაგის 113 და 116 ადრეული გენების ექსპრესიის შედეგად სინთეზირებული რეკომბინანტული ცილები gp113 და

gp116 იწვევენ რეციპიენტი ბაქტერიული უჯრედის მეტაბოლიზმის ბლოკირებას უჯრედული ცილების სინთეზის მექანიზმის დაზიანებით.

ვინაიდან, ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა Sb-1 ბაქტერიოფაგის მხოლოდ რამოდენიმე ადრეული გენი, რომლებმაც გამოავლინეს ანტიბაქტერიული მოქმედების მაღალი აქტივობა, მომავალი კვლევები დაგეგმილია Sb-1 ფაგით კოდირებული ბიოლოგიურად აქტიური სხვა ცილების იდენტიფიკაციისათვის, რომლებიც ავლენენ ფაგოსპეციფიური ანტიბაქტერიული მოქმედების განსხვავებულ მექანიზმს. ასეთი მიდგომა, სავარაუდოდ, ხელს შეუწყობს ახალი ანტიბაქტერიული საშუალებების შექმნას ინფექციური, მათ შორის ანტიბიოტიკორეზისტენტული შტამებით გამოწვეული დაავადებების მკურნალობისათვის.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Adamia R. General mechanisms of phage – host bacterial cell’s genomes interaction. Doctoral Dissertation, 1999.
2. Abedon ST. Bacteriophage Ecology- Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses. AMCM. CAMBRIDGE University Press, 2008.
3. Amini, S. and Tavazoie, S. Antibiotics and the post-genome revolution. Curr. Op. Microbiol., 2011, 14: 513-518.
4. Ackermann, HW., Eisenstark A. The present state of phage taxonomy. J. Intervirology, 1974, 20:1093-1099.
5. Ackermann, HW. Tailed bacteriophages-the order *Caudovirales*. Adv. Virus Res., 1998, 51:135-201.
6. Ackermann, HW. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Arch. Virology, 2001, 146:843-857.
7. Ackermann, HW. Bacteriophage observations and evolution. Research in Microbiology, 2003, 154:245-251.
8. Ackermann, HW., Abedon, ST. Bacteriophage names 2000.
9. Barrett, CT., Barrett, JF. Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? Curr. Opin. Biotechnol., 2003, 14:621–626.
10. Bernhardt, TG., Wang, IN., Struck, DK., Young, RY. A protein antibiotic in the phage Q β virion: diversity in lysis targets. Science, 2001, 292:2326–2329.
11. Bernhardt, TG., Struck, DK., Young, R. The lysis protein E of phiX174 is a specific inhibitor of the MraY-catalyzed step in peptidoglycan synthesis. J. Biol. Chem., 2001, 276:6093-6097.
12. Bernhardt, TG., Wang, IN., Struck, DK., Young, R. A protein antibiotic in the phage Q β virion: diversity in lysis targets. Science, 2001, 292:2326-2329.
13. Bogaert, D., de Groot, R., Hermans. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. Lancet Infect. Dis., 2004, 4:144–154.
14. Borisovski, J., Weber-Dabrowska B., Gorski, A. Bacteriophage endolisins as a novel class of antibacterial agents. Exp. Biol. Med., 2006, 231: 366-377.

15. Botstein, D. A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1980, 354:484-490.
16. Boucher, HW., Corey, GR. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, 46: S344–S349.
17. Breitbart, M., Wegley, L., Leeds, S., Schoenfeld, T. & Rohwer, F. Phage community dynamics in hot springs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 1633–1640.
18. Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., Mahaffy, J. M., Segall, A. M., Mead, D., Azam, F. & Rohwer, F. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, 14250–14255.
19. Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, JM., Nulton, J., Salamon, P. & Rohwer, FJ. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *Bacteriol.*, 2003, 185: 6220–6223.
20. Brussow, H., Canchaya, C., and Hardt, WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2004, 68:560–602.
21. Brussow, H., and Desiere, F. Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: insights from dairy phages. *Mol. Microbiol.*, 2001, 39:213-222
22. Brussow, H., Bruttin, A., Desiere, F., Lucchini, S. & Foley, S. Molecular ecology and evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages-a review. *Virus Genes*, 1998, 16: 95–109.
23. Butler, MS. and Cooper, MA. Screening strategies to identify new antibiotics. *Curr. Drug Targets*, 2012, 13: 373-387.
24. Calendar, R. *The Bacteriophages*. OXFORD. University Press, 2006.
25. Casjens, SR. Comparative genomics and evolution of the tailed bacteriophages. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2005, 8:451–458.
26. Casjens, S., G. Hatfull, and R. Hendrix. Evolution of dsDNA tailed-bacteriophage genomes. *Semin. Virol.*, 1992, 3:383-397.
27. Casjens, S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol. Microbiol.*, 2003, 49:277-300.

28. Chanishvili, N., R. Sharp. Bacteriophage therapy: experience from the Eliava Institute, Georgia. *Australia Microbiology*, 2008, 20: 96-101.
29. Chao, A. Non parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.*, 1984, 11:783–791.
30. Cheng, Q., Nelson, D., Zhu, S., Fischetti, VA. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2005, 49:111–117.
31. Cheng, X., Zhang, X., Pflugrath, JW., Studier, FW. The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci.*, 1994, 91: 4034–4038.
32. Chibani-Chennoufi, S., Sidoti, J., Bruttin, A., Kutter, E., Sarker, S. & Brussow, H. In vitro and in vivo bacteriolytic activities of Escherichia coli phages: implications for phage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48:2558–2569.
33. Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, ML., Brussow, H. Phage-host interaction: an ecological perspective. *Jour. Bacteriol.*, 2004, 186:3677–3686.
34. Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, ML., Marvin-Guy, L., Rami-Shojaei, S., and Brussow, H. Lactobacillus plantarum bacteriophage LP65: a new member of the SPO1-like genus of the family Myoviridae. *J. Bacteriol.*, 2004, 186: 7069–7083.
35. Climo, MW., Patron, LR., Goldstein, BP., Archer, GL. Lysostaphin treatment of experimental methicillin-resistant Staphylococcus aureus aortic valve endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, 42:1355–1360.
36. Cole, ST. and Riccardi, G. New tuberculosis drugs on the horizon. *Curr. Op. Microbiol.*, 2011, 14:570-576.
37. Dajcs, JJ., Hume, EBH., Moreau, JM., Caballero, AR., Cannon, BM., O'Callaghan, RJ. Lysostaphin treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus keratitis in the rabbit. *Invest Ophthalmol.*, 2000, 41:1432–1436, 2000.
38. Datta, A., Hendrix, M., Lipsitch, M. & Jinks-Robertson, S. Dual roles for DNA sequence identity and the mismatch repair system in the regulation of mitotic crossing-over in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, 94:9757–9762.

39. Deghorain, M. and Van Melderren, L. The Staphylococci Phages Family: An Overview. *Viruses*, 2012, 4: 3316-3335.
40. Desiere, F., Lucchini, S., Canchaya, C., Ventura, M., and Brussow, H. Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, 2002, 82:73-91.
41. Desiere, F., Mahanivong, C., Hillier, AJ., Chandry, PS., Davidson, BE., and Brussow, H. Comparative genomics of lactococcal phages: insight from the complete genome sequence of *Lactococcus lactis* phage BK5-T. *Virology*, 2001, 283:240-252.
42. Desiere, F., McShan, WM., Sinderen, D., Ferretti, JJ., and Brussow, H. Comparative genomics reveals close genetic relationships between phages from dairy bacteria and pathogenic Streptococci: evolutionary implications for prophage-host interactions. *Virology*, 2001, 288:325-341.
43. Desiere, F., Lucchini, S. & Brussow, H. Comparative sequence analysis of the DNA packaging, head, and tail morphogenesis modules in the temperate cos-site *Streptococcus thermophilus* bacteriophage Sfi21. *Virology*, 1999, 260: 244–253.
44. Deutsch, SM., Guezenec, S., Piot, M., Foster, S., Lortal, S. The broad-spectrum endolysin of *Lactobacillus helveticus* temperate bacteriophage phi-0303. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70:96-103.
45. Diaz, E., Lopez, R., Garcia, JL. Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, 87:8125–8129.
46. Diaz, E., Lopez, R., Garcia, JL. Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266:5464–5471.
47. Djurkovic, S., Loeffler, JM., Fischetti, VA. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49:1225–1228.
48. Eydal Hallgerd SC. Microbial ecology in deep granitic groundwater– activity and impact of viruses. thesis, 2009.
49. Fischetti, VA. Bacteriophage Lysins as Effective Antibacterials. *Curr. Opinion Microbiology*. 2008, 11(5): 393–400.

50. Fischetti, VA. The use of phage lytic enzymes to control bacterial infections. In: Kutter, E., Sulakvelidze, A. Ed. *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2004, 321–334.
51. Fischetti, VA. Novel method to control pathogenic bacteria on human mucous membranes. *Ann N Y Acad. Sci.*, 2003, 987:207–214.
52. Fox, JL. Alarm sounded over totally drug-resistant tuberculosis, gonorrhea. *Microbe.*, 2012, 7:159-160.
53. Fox, TD., and J.Pero. New phage SPO1-induced polypeptides associated with *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Proc. Natl.*, 1974.
54. Gaeng, S., Scherer, S., Neve H., Loessner MJ. Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66:2951-2958.
55. Gargano, L., and Hughes, J. Emerging Microbial Threats: Communication Challenges and Opportunities. *Microbe.*, 2013, 8:205-211.
56. Garcia, E., Garcia, JL., Garcia, P., Arraras, A., Sanchez-Puelles, JM., Lopez, R. Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, 85:914–918.
57. Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty *et al.* Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 2001, 294:849–852.
58. Gu, J., Liu, X., Lu, R., Li, Y., Song, J., Lei, L., Sun, C., Feng, X., Du, C., Yu, H., Yang, Y., Han, W. Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* bacteriophage GH15. *J. Virol.*, 2012, 86:8914–8915.
59. Haidinger, W., Mayr, UB., Szostak, MP., Resch, S., Lubitz, W. *Escherichia coli* ghost production by expression of lysis gene E and staphylococcal nuclease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69:6106-6113.
60. Hambly, E., Suttle, CA. The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. *Curr. Opinion Microbiol.*, 2005, 8:444–450.
61. Heintz, N., and D.A. Shub. Transcriptional regulation of bacteriophage SPO1 protein synthesis in vivo and in vitro. *J. Virol.*, 1982, 42:951-962.

62. Hendrix, RW., Hatfull, GF. & Smith, MC. Bacteriophages with tails: chasing their origins and evolution. *Res. Microbiol.*, 2003, 154:253–257.
63. Hendrix, RW. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor. Popul. Biol.*, 2000, 61:471–480.
64. Hendrix, RW. Bacteriophage Genomics. *Cur. Opin. Microbiol.*, 2003, 6:506–511.
65. Hendrix, RW., GF. Hatfull, and MC. Smith. Bacteriophages with tails: chasing their origins and evolution. *Res. Microbiol.*, 2003, 154:253–257.
66. Hodgson, DA. Generalized transduction of serotype 1/2 and serotype 4b strains of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.*, 2000, 35:312–323.
67. Hotchin, JE. The influence of acridines on the interaction of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus K* phage. *J. Gen. Microbiol.*, 1951, 5:609-618.
68. Hotchin, JE. The purification and electron microscopical examination of the structure of staphylococcal bacteriophage K. *J. Gen. Microbiol.*, 1954, 10:250-260.
69. Hotchin, JE., IM. Dawson and WJ. Elford. The use of empty bacterial membranes in the study of the adsorption of *Staphylococcus K* phage upon its host. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1952, 33:177-182.
70. Jacob, F., Fuerst, CR. The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 1958, 18:518–526.
71. Jado, I. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003, 52:967–973.
72. Jabes, D. The antibiotic R&D pipeline: an update. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2011, 14:564-569.
73. Jarvis, AW., LJ. Collins and HW. Ackermann. A study of five bacteriophages of the Myoviridae family which replicate on different grampositive bacteria. *Arch. Virol.*, 1993, 133:75–84.
74. Juhala, RJ., Ford, ME., Duda, RL., Youlton, A., Hatfull, GF. & Hendrix, RW. *J. Mol. Biol.*, 2000, 299:27–51.

75. Kakikawa, M., Yokoi, KJ., Kimoto, H., Nakano, M., Kawasaki, K., Taketo, A., Kodaira, K. Molecular analysis of the lysis protein Lys encoded by *Lactobacillus plantarum* phage phi1e. *Gene.*, 2002, 299:227-234.
76. Kanamaru, S., Ishiwata, I., Suzuki, T., Rossmann, MG., Arisaka, F. Control of bacteriophage T4 lysozyme activity during the infection process. *J. Mol. Biol.*, 2005, 346:1013–1020
77. Kelly, D., McAuliffe, O., Ross, RP., Coffey, A. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2012, 54:286 –291.
78. Kim, WS., Salm, H., Geider, K. Expression of bacteriophage phiEa1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*. *Microbiology*, 2004, 150:2707-2714.
79. Kim, MS., Myung, H. Complete genome of *Staphylococcus aureus* phage SA11. *J. Virol.*, 2012, 86:10232.
80. Klumpp, J., Lavigne, R., Loessner, MJ., Ackermann, HW. The SPO1- related bacteriophages. *Arch. Virol.*, 2010, 155:1547–1561.
81. Klumpp, J., Dorscht, J., Lurz, R., Biemann, R., Wieland, M., Zimmer, M., Calendar, R., Loessner, M. The Terminal Redundent, Nonpermitted Genome of *Listeria* Bacteriophage A511: a Model for the SPO1- Like Myoviruses of Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriology*, 2008, 190:5753-5765.
82. Kretzer, W., Lehmann, R., Schmelcher, M., Banz, M., Kim, K., Korn, C., Loessner, MJ. Use of High-Affinity Cell Wall-Binding Domains of Bacteriophage Endolysins for Immobilization and Separation of Bacterial Cells. *App. Envir. Microb.*, 2007, 1992-2000.
83. Kutateladze, M., Adamia, R. Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Medecineet Maladies Infectieuses*, 2008, 38:8:426-430.
84. Kutter Elizabeth, Alexander sulakvelidze. *Bacteriophages: biology and applications.* Burton Guttman, Raul Raua, Elizabeth Kutter. *Basic Phage Biology*, 2005.

85. Kutter, E., White, T., Kashlev, M., McKinney, J., and Guttman, B. Effects on host genome structure and expression. In Karam, J.D. (ed.) *Molecular biology of bacteriophage T4*, ASM Press, Washington, DC., 1994, 357-368.
86. Kutter, E., Kellenberger, E., Carlson, K., Eddy, S., Neitzel, J., Messinger, L., North, J., Guttman, B. Effects of bacterial growth conditions and physiology on T4 infection. In: "Molecular Biology of Bacteriophage T4" (J.D.Karam, Ed.). Amer. Soc. for Microbiology, Washington, DC, 1994, 406-418.
87. Kvachadze, L., Balarjishvili, N., Meskhi, T., Tevdoradze, E., Skhirtladze, N., Pataridze, T., Adamia, R., Topuria, T., Kutter, E., Rohde, C., Kutateladze, K. Evaluation of lytic activity of staphylococcal bacteriophage Sb-1 against freshly isolated clinical pathogens. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(5):643-650.
88. Kutter Elizabeth, Alexander Sulakvelidze. *Bacteriophages: biology and applications*. Hans-W.Ackermann. *Bacteriophage classification*, 2005.
89. Kvachadze LI. Physical and chemical features and reproduction peculiarities of staphylococcal bacteriophage Sb-1. Ph.D. Thesis, Tbilisi University, 1986.
90. Kwan T., Liu J., DuBow M., Gros P., Pelletier J., The complete genomes and proteoms of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *The National Academy of Sciences of the USA*, 2005, 102 : 5174-5179
91. Kwiatek, M., Parasion, S., Mizak, L., Gryko, R., Bartoszcze, M., Kocik, J. Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains. *Arch. Virol.*, 2012, 157:225– 234.
92. Labrie, S., Vukov, N., Loessner, MJ., Moineau, S. Distribution and composition of the lysis cassette of *Lactococcus lactis* phages and functional analysis of bacteriophage ul36 holin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, 233:37-43.
93. Larkin, M. Vincent Fischetti-following phages for life. *Lancet Infect. Dis.*, 2004, 4:246–249.
94. Lavigne, R., Darius, P., Summer, E., Seto, D., Mahadevan, P., Nilsson, A., Ackermann, H., Kropinski, A. Classification of Myoviridae bacteriophages using protein sequence similarity. *BMC Microbiol.*, 2009, 9:224.

95. Lawrence, JG., Hatfull, GF. & Hendrix, RW. Imbroglions of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. *J. Bacteriol.*, 2002, 184:4891–4905.
96. Lewis, K. Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. *Nature*, 2012, 485:439-440
97. Liu, J., Dehbi, M., Moeck, G., Arhin, F., Bauda, P., Bergeron, D., Callejo, M., Ferretti, V., Ha, N., Kwan, T., et al. Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. *Nature Biotechnology*, 2004, 22:185–191.
98. Łobocka, M., Hejnowicz, MS., Dańbrowski, K., Gozdek, A., Kosakowski, J., Witkowska, M., Ulatowska, MI *et al.* Genomics of staphylococcal Twort-like phages-potential therapeutics of the post-antibiotic era. *Adv. Virus Res.*, 2012, 83:143–216.
99. Loeffler, JM., Nelson, D., Fischetti, VA. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*, 2001, 294: 2170–2172.
100. Loeffler, JM., Djurkovic, S., Fischetti, VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun.*, 2003, 71: 6199–6204.
101. Loeffler, JM., Fischetti, VA. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47:375–377.
102. Loessner, MJ. Bacteriophage endolysins-current state of research and applications. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2005, 8:480–487.
103. Loessner, MJ. Improved procedure for bacteriophage typing of *Listeria* strains and evaluation of new phages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57: 882–884.
104. Loessner, MJ., RB. Inman, P. Lauer, and R. Calendar. Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes*: implications for phage evolution. *Mol. Microbiol.*, 2000, 35:324–340.
105. Loessner, MJ., A. Schneider, and S. Scherer. Modified *Listeria* bacteriophage lysin genes (ply) allow efficient overexpression and one-step purification of biochemically active fusion proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62:3057–3060.
106. Loessner, MJ. and S. Scherer. Organization and transcriptional analysis of the *Listeria* phage A511 late gene region comprising the major capsid and tail sheath protein genes *cps* and *tsh*. *J. Bacteriol.*, 1995, 177:6601–6609.

107. Loessner, MJ., Maier, SK., Daubek-Puza, H., Wendlinger, G., Scherer, S. Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. *J. Bacteriol.*, 1997, 179:2845-2851.
108. Loessner, MJ., Gaeng, S., Wendlinger, G., Maier, SK., Scherer, S. The two-component lysis system of *Staphylococcus aureus* phage Twort: a large TTG-start holin and an associated amidase endolysin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, 162:265-274.
109. Loessner, MJ., Gaeng, S., Scherer, S. Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out-of-frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187. *J. Bacteriol.*, 1999, 181:4452-4460.
110. Loessner, MJ., Kramer, K., Ebel, F., Scherer, S. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.*, 2002, 44:335-349.
111. Loessner, MJ., Rees, CED. *Listeria* phages: basics and applications. In *Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*. Edited by Waldor, MK., Friedmann, DI., Adhya, SL. Washington DC: ASM Press; 2005, 362-379.
112. Lucchini, S., F. Desiere, and H. Brussow. Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* phage species supports a modular evolution theory. *J. Virol.*, 1999, 73:8647-8656.
113. Maniatis, T., Fritsch, EF., Sambrook, J. In: *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, 1982.
114. Matsuzaki, S., Yasuda, M., Nishikawa, H., Kuroda, M., Ujihara, T., Shuin, T., Shen, Y., Jin, Z., Fujimoto, S., Nasimuzzaman, MD., Muraoka, A., Imai, S. Experimental protection of Mice against Lethal *Staphylococcus aureus* infection by Novel Bacteriophage MR11. *J. infectious diseases*, 2003, 187: 613-624.
115. Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T. et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J. Infect. Chemother.*, 2005, 11:211-9.

116. Merabishvili, M., Pirnay, J-P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., et al. Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials. *PLoS ONE*, 2009, 4(3): e4944.
117. Miller, ES., E. Kutter, G. Mosig, F. Arisaka, T. Kunisawa, and W. Ruger. Bacteriophage T4 genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003, 67:86–156.
118. Nau, R., Eiffert, H. Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitidis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, 15: 95–110.
119. Navarre, WW., Ton-That, H., Faull, KF., Schneewind, O. Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage phi11. Identification of a D-alanylglycine endopeptidase activity. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274:15847-15856.
120. Nelson, D., Loomis, L., Fischetti, VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, 98:4107–4112.
121. Nechaev, S., Severinov, K. The elusive object of desire-Interactions of bacteriophages and their hosts. *Curr. Op. Microbiol.*, 2008, 11:186-193.
122. Nilsson, O., Lundqvist, T., Hahne, S. & Sjöberg, BM. Structure-function studies of the large subunit of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.*, 1988, 16:91–94.
123. O’Flaherty, S., Coffey, A., Edwards, R., Meaney, W., Fitzgerald, GF., Ross, RP., Genome of Staphylococcal Phage K: a New Lineage of *Myoviridae* Infecting Gram-Positive Bacteria with a Low G+C Content. *American Society for Microbiology. J. Bacteriol.*, 2004, 160: 2862–2871.
124. O’Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W., Fitzgerald, GF., Ross, RP. The recombinant phage lysine LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2005, 187:7161–7164.
125. Panthel, K., Jechlinger, W., Matis, A., Rohde, M., Szostak, M., Lubitz, W., Haas, R. Generation of *Helicobacter pylori* ghosts by PhiX protein E-mediated inactivation and their evaluation as vaccine candidates. *Infect. Immun.*, 2003, 71:109-116.

126. Park, P.W., Senior, R.M., Griffin, G.L., Broekelmann, T.J., Mudd, M.S., Mecham, R.P. Binding and degradation of elastin by the staphylolytic enzyme lysostaphin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1995, 27:139–146.
127. Payne, D., Tomasz, A. Antimicrobials. The challenge of antibiotic resistant bacterial pathogens: the medical need, the market and prospects for new antimicrobial agents. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2004, 7:435–438.
128. Pedulla, M.L., Ford, M.E., Houtz, J.M., Karthikeyan, T., Wadsworth, C., Lewis, J.A., Jacobs-Sera, D., Falbo, J., Gross, J., Pannunzio, N.R., et al. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell* 2003, 113 :171–182.
129. Pero, J., NM. Hannett, and C. Talkington. Restriction cleavage map of SPO1 DNA: general location of early, middle, and late genes. *J. Virol.*, 1979, 31:156-171.
130. Pritchard, D.G., Dong, S., Baker, J.R., Engler, J.A. The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology*, 2004, 150:2079–2087.
131. Proux, C., van Sinderen, D., Suarez, J., Garcia, P., Ladero, V., Fitzgerald, G.F., Desiere, F. & Brussow, H. The dilemma of phage taxonomy illustrated by comparative genomics of Sfi21-like Siphoviridae in lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, 2002, 184:6026–6036.
132. Rees, P.J., and B.A. Fry. The morphology of staphylococcal bacteriophage K and DNA metabolism in infected *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Virol.*, 1981, 53:293–307.
133. Rohwer, F., and R. Edwards. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *J. Bacteriol.*, 2002, 184:4529-4535.
134. Romero, P., Lopez, R., Garcia, E. Characterization of LytA-like N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases from two new *Streptococcus mitis* bacteriophages provides insights into the properties of the major pneumococcal autolysin. *J. Bacteriol.*, 2004, 186:8229-8239.
135. Rountree, P.M. The serological differentiation of Staphylococcal bacteriophages. *J. Gen Microbiol.* 1949, 3:164-173.
136. De Ruyter, P.G.G.A., Kuipers, O.P., Meijer, W.C., de Vos, W.M. Foodgrade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nat. Biotechnol.*, 1997, 15:976-979.

137. Sagermann, M., Matthews, BW. Crystal structures of a T4-lysozyme duplication-extension mutant demonstrate that the highly conserved beta-sheet region has low intrinsic folding propensity. *J. Mol. Biol.*, 2002, 316:931-940.
138. Saiz, JL., Lopez-Zumel, C., Monterroso, B., Varea, J., Arrondo, JL., Iloro, I., Garcia, JL., Laynez, J., Menendez, M. Characterization of Ejl, the cell-wall amidase coded by the pneumococcal bacteriophage Ej-1. *Protein Sci.*, 2002, 11:1788-1799.
139. Sambrook, J., Fritsch, EF. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
140. Sampath, A. and CR. Stewart. Roles of genes 44, 50, and 51 in Regulating Gene Expression and Host Takeover during Infection of *Bacillus Subtilis* by Bacteriophage SPO1. *J. Bacteriol.*, 2004, 186:1785-1792.
141. Sao-Jose, C., Parreira, R., Vieira, G., Santos, MA. The N-terminal region of the *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in *Escherichia coli* and as a cis-inhibitory element, preventing lytic activity on oenococcal cells. *J. Bacteriol.*, 2000, 182:5823-5831.
142. Sass, P., Bierbaum, G. Lytic Activity of Recombinant Bacteriophage {phi}11 and {phi}12 Endolysins on Whole Cells and Biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**: 347-352.
143. Shibayama, Y., Dabbs, ER. Phage as a source of antibacterial genes-Multiple inhibitory productes encoded by *Rhodococcus* phage YF1. *Bacteriophage*, 2011, 1:4, 195-197.
144. Schuch, R., Nelson, D., Fischetti, VA. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*, 2002, 418:884-889.
145. Schurr, T., E. Nadir, and H. Margalit. Identification and characterization of *E. coli* ribosomal binding sites by free energy computation. *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21:4019-4023.
146. Service, RF. Orphan drugs of the future. *Science*, 2004, 303:1798-1798.
147. Sheehan, MM., Garcia, JL., Lopez, R., Garcia, P. The lytic enzyme of pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysine of intergeneric origin. *Mol. Microbiol.*, 1997, 25:717-725.

148. Stanton, TB. A call for antibiotic alternatives research. *Trends in Microbiol.*, 2013, 21: 111-113.
149. Stewart, CR. SPO1 and related bacteriophages. In "Bacillus subtilis and other gram-positive Bacteria, Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics." (AL. Sonenshein et al., Eds.) Am. Soc. for Microbiol., Washington, DC., 1993, 813-829.
150. Stewart, CR., I. Gaslightwala, K. Hinata, KA. Krolikovski, DS. Needleman, AS-Y. Peng, MA. Peterman, A. Tobias, and P. Wei. Genes and regulatory sites of the "Host-takeover module" in the terminal redundancy of Bacillus subtilis bacteriophage SPO1. *Virology*, 1998, 246:329-340.
151. Stewart, CR., Casjens, SR., Cresawn, SG., Houtz, JM., Smith, AL., Ford, ME., Peebles, CL., Hatfull, GF., Hendrix, RW., Huang, WM., Pedulla, MI. The genome of Bacillus subtilis bacteriophage SPO1. *J. Mol. Biol.*, 2009, 388: 48-70.
152. Studier, FW. Use of bacteriophage T7 Lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.*, 1991, 219: 37-44.
153. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Glenn Morris, Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, 45:649-659.
154. Takáč, M., Blási, U. Phage P68 Virion-Associated Protein 17 Displays Activity against Clinical Isolates of Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(7):2934-2940.
155. Thacker, PD. Set a microbe to kill a microbe. Drug resistance renews interest in phage therapy. *JAMA*, 2003, 290:3183-3185.
156. The Lancet. Urgently needed: new antibiotics. *Lancet*, 2009, 374:1868.
157. Tuler, TR., Callanan, MJ., Klaenhammer, TR. Overexpression of peptidases in Lactococcus and evaluation of their release from leaky cells. *J. Dairy Sci.*, 2002, 85:2438-2450.
158. Vandersteegen, K., Kropinski, AM., Nash, JHE., Noben, J., Hermans, K., Lavibnea, R. Romulus and Remus, Two Phage Isolates Representing a Distinct Clade within the Twortlikevirus Genus, Display Suitable Properties for Phage Therapy Applications. *J. Virol.*, 2013, 87(6):3237.

159. Vandersteegen, K., Mattheus, W., Ceysens, P-J., Bilocq, F., De Vos, D., Pirnay, J-P., Noben, J-P., Merabishvili, M., Lipinska, U., Hermans, K., Lavigne, R.. Microbiological and molecular assessment of bacteriophage ISP for the control of *Staphylococcus aureus*. PLoS One, 2011, 6:e24418.
160. Van der Mee-Marquet, N., M. Loessner, and A. Audurier. Evaluation of seven experimental phages for inclusion in the international phage set for the epidemiological typing of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63:3374–3377.
161. Van Regenmortel, MHV., CM. Fauquet, DHL. Bishop, EB. Carstens, MK. Estes, SM. Lemon, J. Maniloff, MA. Mayo, DJ. McGeoch, CR. Pringle, and RB. Wickner. Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, Calif., 2000.
162. Varea, J., Monterroso, B., Saiz, JL., Lopez-Zumel, C., Garcia, JL., Garcia, P., Memendez, M. Structural and thermodynamic characterization of Pal, a phage natural chimeric lysin active against pneumococci. J. Biol. Chem., 2004, 279:43697–43707.
163. Vasala, A., Valkkila, M., Caldentey, J., Alatosava, T. Genetic and biochemical characterization of the *Lactobacillus* subsp. *lactis* bacteriophage LL-H lysin. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61:4004–4011.
164. De Vries, J., Harms, K., Broer, I., Kriete, G., Mahn, A., Du"ring, K., Wackernagel, W. The bacteriolytic activity in transgenic potatoes expression a chimeric T4 lysozyme gene and the effect of T4 lysozyme on soil- and phytopathogenic bacteria. Syst. Appl. Microbiol., 1999, 22:280-286.
165. Vukov, N., Moll, I., Blaesi, U., Scherer, S., Loessner, MJ. Functional regulation of the *Listeria monocytogenes* bacteriophage A118 holin by an intragenic inhibitor lacking the first transmembrane domain. Mol. Microbiol., 2003, 48:173-186.
166. Vybiral, D., Takac, M., Loessner, M., Witte, A., von Ahsen, U., Blasi, U. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of two lytic *Staphylococcus aureus* phages: 44AHJD and P68. FEMS Microbiol. Lett., 2003, 219:275-283.

167. Wei, P., and CR. Stewart. A cytotoxic early gene of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPO1. *J. Bacteriol.*, 1993, 175:7887-7900.
168. Wei, P., and CR. Stewart. Genes that protect against the host-killing activity of the E3 protein of *B. subtilis* bacteriophage SPO1. *J. Bacteriol.*, 1995, 177:2933-2937.
169. Weinbauer, MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2004, 28:127-181.
170. Wilhelm, SW., Brigden, SM. & Suttle, CA. A dilution technique for the direct measurement of viral production: a comparison in stratified and tidally mixed coastal waters. *Microb. Ecol.*, 2002, 43:168-173.
171. Wommack, KE. & Colwell, RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, 64:69-114.
172. Xu, M., Arulandu, A., Struck, DK., Swanson, S., Sacchettini, JC., Young, R. Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. *Science*, 2005, 307:113-117.
173. Yoong, P., Schuch, R., Nelson, D., Fischetti, VA. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J. Bacteriol.*, 2004, 186:4808-4812.
174. Young, RY., Wang, I-N., Roof, WD. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.*, 2000, 8:120-128.
175. Young, RY. Bacteriophage holins: deadly diversity. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 4:21-36.
176. Young, R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.*, 1992, 56:430-81.
177. Zhang, X., Studier, FW. Multiple roles of T7 RNA polymerase and T7 lysozyme during bacteriophage T7 infection. *J. Mol. Biol.*, 2004, 340:707-730.
178. Ziedaite, G., Daugelavicius, R., Bamford, JKH., Bamford, DH. The holin protein of bacteriophage PRD1 forms a pore for small-molecule and endolysin translocation. *J. Bacteriol.*, 2005, 187:5397-5405.

179. Zimmer, M., Vukov, N., Scherer, S., Loessner, MJ. The murein hydrolase of the bacteriophage f3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68:5311–5317.
180. Zimmer, M., Sattelberger, E., Inman, RB., Calendar, R., Loessner, MJ. Genome and proteome of *Listeria monocytogenes* phage PSA: an unusual case for programmed +1 translational frameshifting in structural protein synthesis. *Mol. Microbiol.*, 2003, 50:303-317.
181. Zink, R., and MJ. Loessner. Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58:296–302.

პუბლიკაციები

Bactericidal Genes of Staphylococcal Bacteriophage Sb-1. Ekaterine Tevdoradze, Leila Kvachadze, Mzia Kutateladze, Charles R. Stewart. Current Microbiology. DOI 10.1007/s00284-013-0456-9. Accepted: 11 June 2013

Evaluation of lytic activity of staphylococcal bacteriophage Sb-1 against freshly isolated clinical pathogens. Kvachadze, L., Balarjishvili, N., Meskhi, T., Tevdoradze, E., Skhirtladze, N., Pataridze, T., Adamia, R., Topuria, T., Kutter, E., Rohde, C., Kutateladze, M. Microbial Biotechnology. (2011) vol.4, issue 5, pp. 643-650

Proteins with antimicrobial activity, coded by the genome of staphylococcal bacteriophages Sb-1. Kvachadze, L., Kutateladze, M., Balarjishvili, N., Pataridze, R., Nikolaishvili, N., Tevdoradze, E., Adamia, R. (2011) Molecular Medicine, vol. N5, pp.41-46.