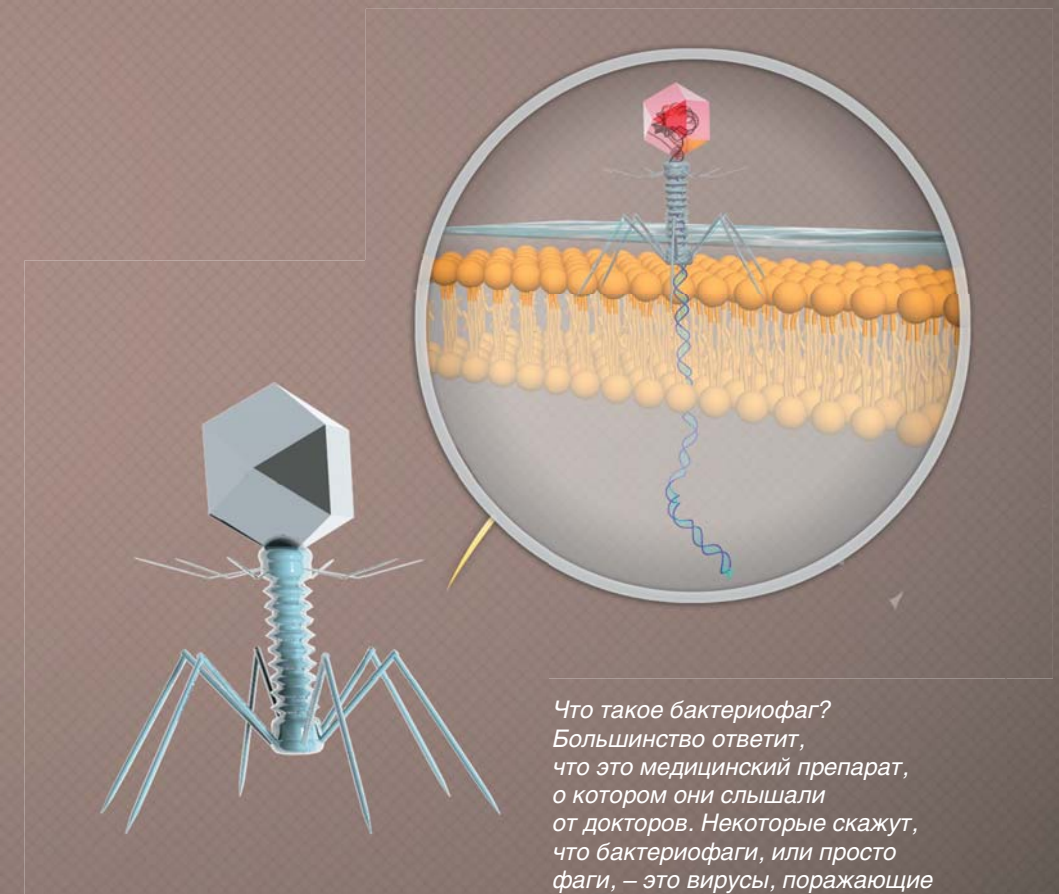
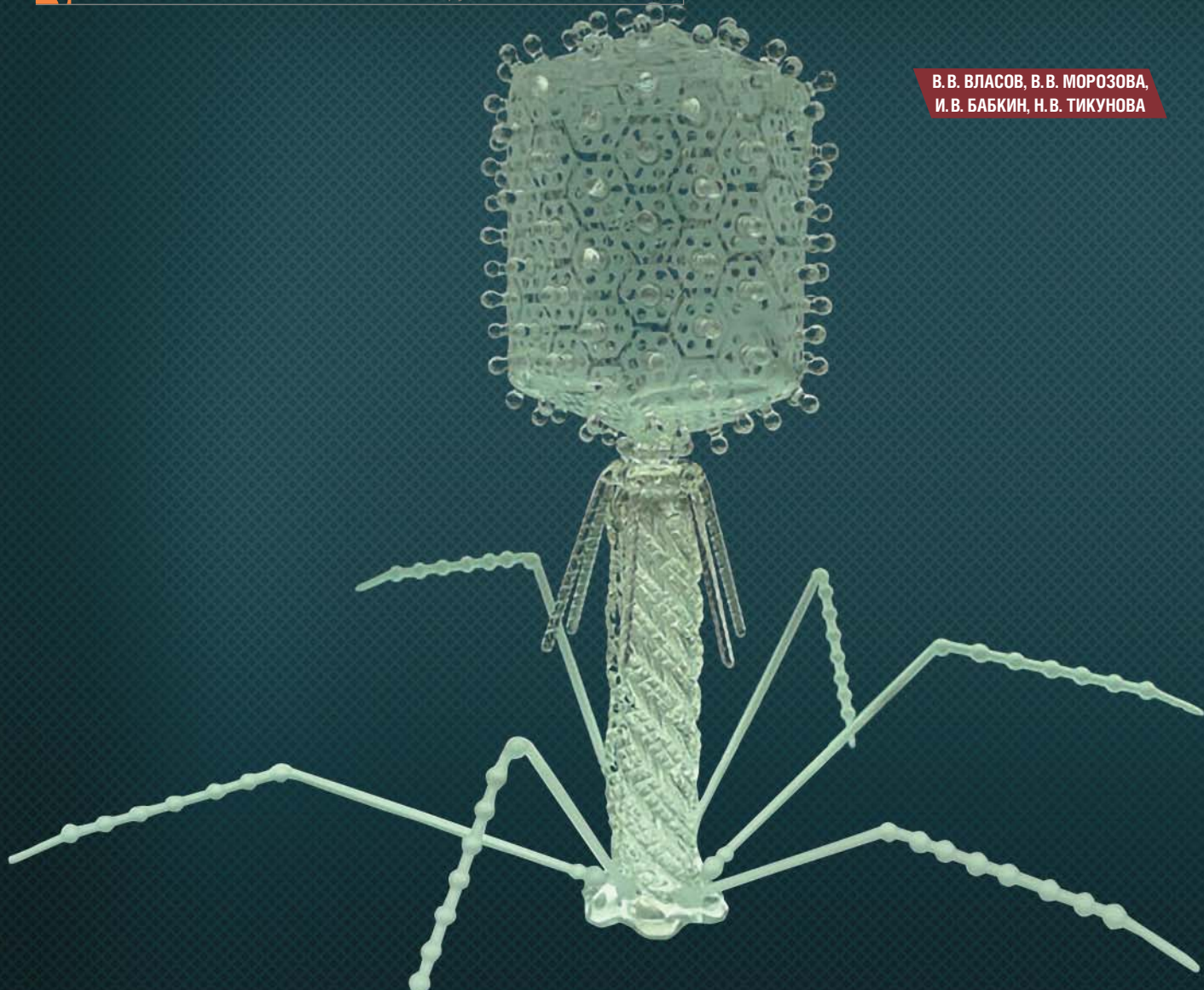


НА ЛИНИИ СОПРИКОСНОВЕНИЯ



Что такое бактериофаг? Большинство ответит, что это медицинский препарат, о котором они слышали от докторов. Некоторые скажут, что бактериофаги, или просто фаги, – это вирусы, поражающие бактерии, а биологи поведают много удивительных историй о том, как были открыты эти мельчайшие организмы, какую важную роль сыграли они в развитии науки и какие перспективы сулят современные технологии на их основе



В. В. ВЛАСОВ, В. В. МОРОЗОВА,
И. В. БАБКИН, Н. В. ТИКУНОВА

БАКТЕРИОФАГИ: 100 ЛЕТ НА СЛУЖБЕ ЧЕЛОВЕЧЕСТВУ

В середине прошлого века биологическая наука сделала революционный шаг вперед, установив молекулярные основы функционирования живых систем. Огромную роль в успешных исследованиях, которые привели к определению химической природы наследственных молекул, расшифровке генетического кода и созданию технологий манипуляций генами, сыграли бактериофаги, открытые еще в начале прошлого столетия. На сегодняшний день эти бактериальные вирусы освоили много полезных для человека «профессий»: их используют не только как безопасные антибактериальные препараты, но и как дезинфектанты и даже в качестве основы для создания электронных наноустройств

На фото: один из самых изученных вирусов – бактериофаг Т4, поражающий кишечную палочку. Стекло. Галерея Люка Джеррама

Когда в 1930-х гг. группа ученых занялась проблемами функционирования живых систем, то в поиске простейших моделей они обратили внимание на *бактериофаги* – вирусы бактерий. Ведь среди биологических объектов нет ничего проще, чем бактериофаги, к тому же их можно легко и быстро выращивать и анализировать, а вирусные генетические программы невелики.

Фаг – это самая маленькая природная структура, содержащая плотно упакованную генетическую программу (ДНК или РНК), в которой нет ничего лишнего. Эта программа заключена в белковую оболочку, снабженную минимальным набором устройств для ее доставки внутрь бактериальной клетки. Бактериофаги не могут размножаться сами по себе, и в этом смысле их нельзя считать полноценными живыми объектами. Их гены начинают работать только в бактерии, используя имеющиеся в бактериальной клетке биосинтетические системы и запасы молекул, необходимых для синтеза. Однако генетические программы этих вирусов принципиально не отличаются от программ более сложных организмов, поэтому эксперименты с бактериофагами позволили установить основополагающие принципы устройства и работы генома.

В дальнейшем эти знания и разработанные в ходе исследований методы стали фундаментом для развития биологической и медицинской науки, а также широкого спектра биотехнологических приложений.

Ключевые слова: бактериофаг, фаготерапия, ферменты, фаговый дисплей, наноматериалы.

Key words: bacteriophage, phage therapy, enzymes, phage display, nano materials



ВЛАСОВ Валентин Викторович – академик РАН, доктор химических наук, профессор, научный руководитель Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Лауреат Государственной премии РФ (1999), Национальной премии «Призвание» (2015), кавалер ордена Александра Невского (2022). Автор и соавтор более 600 научных работ и 30 патентов



МОРОЗОВА Вера Витальевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор более 70 научных работ и 11 патентов



БАБКИН Игорь Викторович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор более 60 научных работ и 2 патентов



ТИКУНОВА Нина Викторовна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор более 250 научных работ и 17 патентов

© В. В. Власов, В. В. Морозова, И. В. Бабкин, Н. В. Тикунова, 2024

Бактериофаги – наши друзья, когда речь идет о бактериях, патогенных для человека. Однако есть и другие, дружественные нам бактерии, которые используются в современных биотехнологических производствах, а также в традиционных производствах пищевой промышленности, таких как сыроварение и т. п. В этих случаях фаги могут приносить большой вред, поскольку в больших популяциях микроорганизмов, находящихся в стадии интенсивного роста, создаются благоприятные условия для размножения фагов, что приводит к лизису производственных бактериальных культур. При производстве сыра проблема не столь серьезна, так как при этом обычно применяют закваски, состоящие из многих культур, часть которых выдержит фаговую атаку и продолжит процесс молочно-кислого брожения. Серьезные неприятности возникают, если весь процесс основан на применении одного конкретного бактериального штамма, как, например, при производстве антибиотиков или терапевтических белков

Борцы с патогенами

Первые попытки использовать бактериофаги для лечения инфекционных заболеваний были предприняты практически сразу после их открытия, однако недостаток знаний и несовершенные биотехнологии того времени не позволили достичь полного успеха. Тем не менее дальнейшая клиническая практика показала принципиальную возможность успешного применения бактериофагов при инфекционных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, при острых гнойно-септических состояниях, для лечения хирургических инфекций и т. д.

По сравнению с антибиотиками бактериофаги имеют ряд преимуществ: они не вызывают побочных эффектов, к тому же строго специфичны для определенных видов бактерий, поэтому при их использовании не нарушается нормальный микробиом человека. Однако такая высокая избирательность создает и проблемы: чтобы успешно лечить пациента, нужно точно знать инфекционный агент и подбирать бактериофаг индивидуально.

Фаги можно использовать и профилактически. Так, Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского разработал профилактический продукт «ФУДФАГ» на основе коктейля из бактериофагов, снижающий риск заражения острыми кишечными инфекциями. Клинические исследования показали, что недельный прием препарата позволяет избавиться от гемолизующей *кишечной палочки* и других патогенных и условно-патогенных бактерий, вызывающих дисбактериоз кишечника.

Бактериофагами лечат инфекционные болезни не только людей, но и домашних и сельскохозяйственных животных: *мастит* у коров, *колибактериоз* и *эшерихиоз* у телят и свиней, *сальмонеллез* у кур... Особенно удобно применять фаговые препараты в случае *аквакультуры* – для лечения промышленно выращиваемых рыб и креветок, так как в воде они долго сохраняются. Бактериофаги помогают защитить и растения, хотя применение фаговых технологий в этом случае затруднено из-за воздействия природных факторов, таких как солнечный свет и дождь, губительных для вирусов.

Фаги могут сыграть большую роль в поддержании микробиологической безопасности продуктов питания, так как применение антибиотиков и химических агентов в пищевой отрасли не решает эту проблему, одновременно снижая уровень экологической чистоты продукции. О серьезности самой проблемы говорят статистические данные: например, в США и России ежегодно регистрируется до 40 тыс. заболевших сальмонеллезом, из которых 1% умирает. Распространение этой инфекции в значительной степени связано с выращиванием, переработкой и потреблением различных видов птицы, и попытки применить для борьбы с ней бактериофаги дали многообещающие результаты.

Так, американская компания *Intralytix* производит фаговые препараты для борьбы с *листериозом*, *сальмонеллезом* и бактериальным загрязнением кишечной палочкой. Они разрешены к применению как добавки, предотвращающие размножение бактерий на продуктах питания, – их распыляют на продукты из мяса и домашней птицы, а также на овощи и фрукты. Эксперименты показали, что коктейль из бактериофагов может быть успешно применен и при транспортировке и реализации живой прудовой рыбы для снижения бактериального загрязнения не только воды, но и самой рыбы.

Очевидным применением бактериофагов является *дезинфекция*, т. е. уничтожение бактерий в тех местах, где их не должно быть: в больницах, на пищевых производствах и т. п. Для этой цели британская компания *Fixed-Phage* разработала метод фиксации фаговых препаратов на поверхностях, обеспечивающий сохранение биологической активности фагов до трех лет.

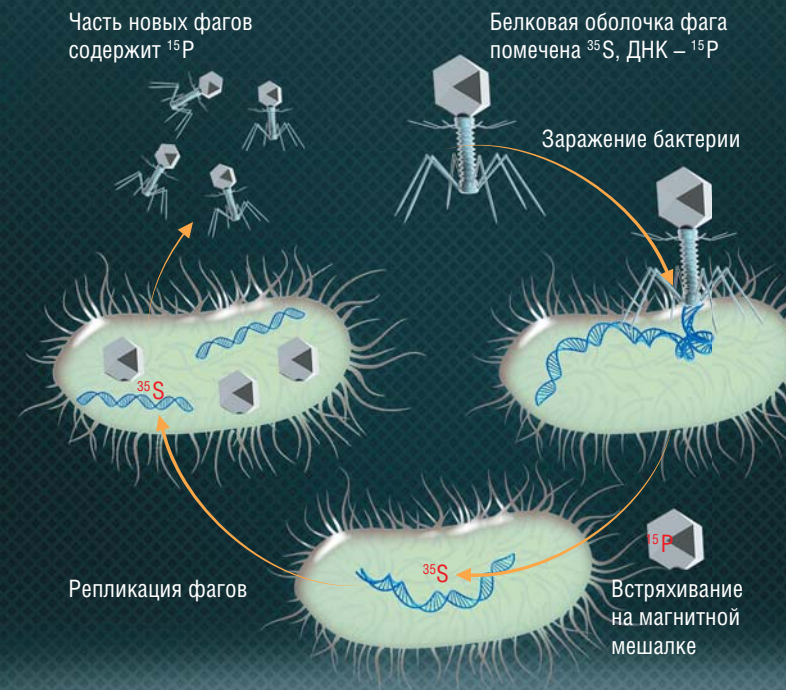
Семь дней творения

Современные методы синтетической биологии позволяют не только вносить различные модификации в фаговые геномы, но и создавать полностью искусственные активные фаги. Технологически это несложно, нужно только синтезировать фаговый геном и ввести его в бактериальную клетку, а там он уже сам запустит все процессы, необходимые для синтеза белков и сборки новых фаговых частиц. В современных лабораториях на эту работу уйдет всего несколько дней.

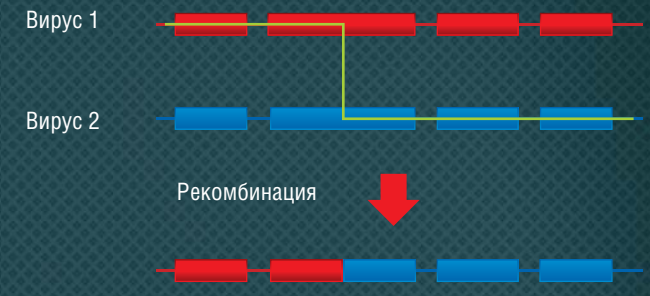
БАКТЕРИОФАГИ – «ДРОЗОФИЛЫ» МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

В 1946 г. на 11-м симпозиуме в знаменитой американской лаборатории в Колд Спринг Харборе была провозглашена теория «один ген – один фермент». Бактериолог А. Херши и «бывший» физик, молекулярный биолог М. Дельбрюк доложили об обмене генетическими признаками между различными фагами при одновременном заражении ими клеток кишечной палочки. Это открытие, сделанное в то время, когда физический носитель гена еще не был известен, свидетельствовало, что явление «рекомбинации» – перемешивания генетических признаков, свойственно не только высшим организмам, но и вирусам. Обнаружение этого феномена в дальнейшем дало возможность детально исследовать молекулярные механизмы репликации. Позднее эксперименты с бактериофагами позволили установить принципы устройства и работы генетических программ.

В 1969 г. А. Херши, М. Дельбрюк и их коллега С. Луриа стали Нобелевскими лауреатами «за открытия, касающиеся механизма репликации и генетической структуры вирусов»



Эксперименты американских исследователей А. Херши и М. Чейза с использованием бактериофагов, меченных изотопами серы и фосфора, доказали роль ДНК как основного носителя генетической информации



В качестве объектов для своих исследований М. Дельбрюк и его сотрудники использовали мутантные бактериофаги так называемой Т-серии, поражающие кишечную палочку

В 1952 г. А. Херши и М. Чейз экспериментально доказали, что наследственная информация бактериофага Т2 закодирована не в белках, как считали многие ученые, а в молекулах ДНК (Hershey and Chase, 1952). Исследователи проследили за процессом воспроизводства в двух группах бактериофагов, одна из которых несла меченные радиоактивной меткой белки, а другая – молекулы ДНК. После инфицирования бактерий такими фагами оказалось, что в зараженную клетку передается только вирусная ДНК, что и послужило доказательством ее роли в хранении и передаче наследственной информации.

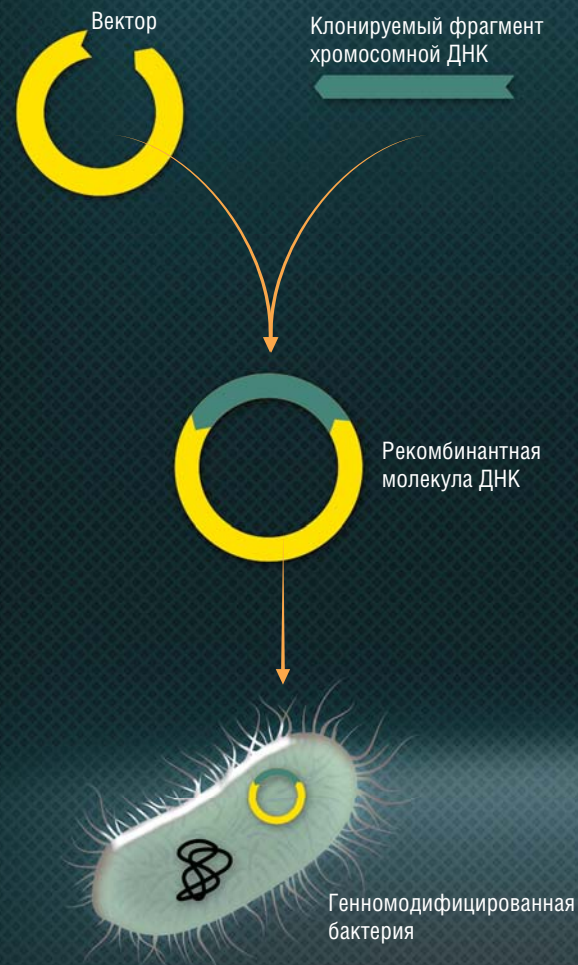
В том же году американские генетики Д. Ледерберг и Н. Циндлер в эксперименте с участием двух штаммов сальмонелл и бактериофага Р22 установили, что бактериофаг способен в процессе размножения включать в себя фрагменты ДНК бактерии-хозяина и передавать их другим бактериям при заражении (Zinder and Lederberg, 1952). Это явление переноса генов от бактерии-донора к реципиенту было названо «трансдукцией». Результаты эксперимента стали очередным подтверждением роли ДНК в передаче наследственной информации.

В 1972 г. Р. Берд с коллегами при изучении процесса репликации (копирования клеточной информации) ДНК кишечной палочки использовали бактериофаги в качестве зондов, способных встраиваться в геном бактериальной клетки, и обнаружили, что процесс репликации идет в двух направлениях вдоль хромосомы (Стент, 1974)

ФЕРМЕНТЫ «ОТ БАКТЕРИОФАГА»

Большое число ферментов, сегодня широко используемых в молекулярной биологии и генетической инженерии, было открыто в результате исследований бактериофагов.

Одним из таких примеров являются ферменты рестриктазы – группа бактериальных нуклеаз, расщепляющих ДНК. Еще в начале 1950-х гг. было обнаружено, что бактериофаги, выделенные из клеток одного штамма бактерий, зачастую плохо размножаются в близкородственном штамме. Обнаружение этого феномена означало, что у бактерий есть система подавления размножения вирусов (Luria and Human, 1952). В результате была открыта ферментативная система рестрикции-модификации, с помощью которой бактерии разрушали попавшую в клетку чужеродную ДНК. Выделение рестриктаз (эндонуклеаз рестрикции) дало в руки молекулярных биологов бесценный инструмент, позволивший манипулировать ДНК: встраивать одни последовательности в другие или вырезать необходимые фрагменты цепи, что в итоге привело к разработке технологии создания рекомбинантной ДНК.



Первым полностью секвенированным ДНК-геномом стал геном фага φ174 длиной свыше 5 тыс. нуклеотидов (Sanger et al., 1977). Эту расшифровку осуществила группа английского биохимика Ф. Сэнгера, создателя известного одноименного метода секвенирования ДНК

Еще один широко используемый в молекулярной биологии фермент – ДНК-лигаза бактериофага T4, которая «сшивает» «липкие» и «тупые» концы двуцепочечных молекул ДНК и РНК. А недавно появились генномодифицированные варианты этого фермента с большей активностью.

От бактериофагов ведет свое происхождение и большинство используемых в лабораторной практике РНК-лигаз, которые «сшивают» одноцепочечные молекулы РНК и ДНК. В природе они в основном служат для починки сломанных молекул РНК. Исследователи наиболее часто используют РНК-лигазу бактериофага T4, с помощью которой можно «пришить» одноцепочечные полинуклеотиды к РНК-молекулам, чтобы пометить их. Такой прием применяется для анализа структуры РНК, поиска мест связывания РНК с белками, олигонуклеотидного синтеза и т. д. Недавно среди рутинно используемых ферментов появились термостабильные РНК-лигазы, выделенные из бактериофагов tm378 и TS2126 (Nordberg Karlsson et al., 2010; Hjorleifsdottir, 2014).

Из бактериофагов получены и некоторые ферменты из еще одной чрезвычайно важной группы – полимераз. Например, очень «точная» ДНК-полимераза бактериофага T7, которая нашла применение в различных областях молекулярной биологии, таких как сайт-направленный мутагенез, но в основном ее используют для определения первичной структуры ДНК.

Химически модифицированная ДНК-полимераза фага T7 была предложена как идеальный инструмент для секвенирования ДНК еще в 1987 г. (Tabor and Richardson, 1987). Модификация этой полимеразы увеличила эффективность ее работы в несколько раз: скорость полимеризации ДНК при этом достигает более 300 нуклеотидов в секунду, поэтому ее можно использовать для амплификации больших

Традиционная схема клонирования (встраивания чужеродной ДНК) с использованием в качестве «вектора» плазмиды (внехромосомного генетического элемента, присущего многим штаммам бактерий) начинается с разрезания плазмидной ДНК и вырезания «нужного» участка хромосомной ДНК с помощью фермента рестриктазы. Затем фрагмент клонируемой ДНК встраивается в плазмиду, которая вводится в бактерию, благодаря чему она становится способной производить чужеродный белок, закодированный во встроеном фрагменте

фрагментов ДНК. Этот фермент стал предшественником секвеназы – генно-инженерного фермента, оптимизированного для секвенирования ДНК в реакции Сэнгера. Секвенза отличается высокой эффективностью и способностью включать в последовательность ДНК нуклеотидные аналоги, используемые для улучшения результатов секвенирования.

Происхождение от бактериофагов ведут и используемые в молекулярной биологии основные РНК-полимеразы (ДНК-зависимые РНК-полимеразы) – ферменты, которые катализируют процесс транскрипции (считывание РНК-копий с матрицы ДНК). К ним относятся SP6-, T7- и T3-РНК-полимеразы, названные в честь соответствующих бактериофагов SP6, T7 и T3. Все эти ферменты используются для синтеза «в пробирке» антисмысловых РНК-транскриптов, меченых РНК-зондов и т. д.

Полинуклеотидкиназы катализируют перенос фосфатной группы от молекулы АТФ к 5'-концу молекулы нуклеиновой кислоты, обмен 5'-фосфатных групп или фосфорилирование 3'-концов мононуклеотидов. В лабораторной практике наибольшее распространение получила полинуклеотидкиназа бактериофага T4. Она обычно используется в экспериментах для мечения ДНК радиоактивным изотопом фосфора. Полинуклеотидкиназа также применяется для поиска сайтов рестрикции, ДНК и РНК дактилоскопии, синтеза субстратов для ДНК или РНК-лигаз.

В рутинных молекулярно-биологических экспериментах также используются такие ферменты бактериофагов, как эндонуклеазы (ферменты, расщепляющие ДНК), например, эндонуклеаза фага T4 (резолваза) и фага T7. Эти ферменты используются для получения одноцепочечных ДНК-матриц для секвенирования или анализа нуклеотидного полиморфизма

Генетические модификации применяют, чтобы изменить специфичность фагов и повысить эффективность их терапевтического действия. Для этого наиболее агрессивные фаги снабжают узнающими структурами, связывающими их с целевыми бактериями. Также в вирусные геномы дополнительно встраивают гены, кодирующие токсические для бактерий белки, нарушающие метаболизм, – такие фаги более смертоносны для бактерий.

Бактерии имеют несколько механизмов защиты от антибиотиков и бактериофагов, один из которых – разрушение вирусных геномов ферментами рестрикции, действующими на определенные нуклеотидные последовательности. Для увеличения терапевтической активности фагов можно за счет вырожденности генетического кода так «перформатировать» последовательности их генов, чтобы минимизировать число нуклеотидных последовательностей, «чувствительных» к ферментам, одновременно сохранив их кодирующие свойства.

Универсальный способ защиты бактерий от всех внешних воздействий – так называемые биофильмы (пленки) из ДНК, полисахаридов и белков, которые бактерии создают совместными усилиями и куда не проникают ни антибиотики, ни терапевтические белки. Такие биофильмы – головная боль врачей, так как они способствуют разрушению зубной эмали, образуются на поверхности имплантов, катетеров, искусственных суставов, а также в дыхательных путях, на поверхности кожи и т. п. Для борьбы с биофильмами были сконструированы особые бактериофаги, содержащие ген, кодирующий специальный литический фермент, разрушающий бактериальные полимеры.

Методами синтетической биологии удалось разработать и бактериофаги, вооруженные самым изощренным оружием, которое бактерии используют против самих фагов. Речь идет о бактериальных системах CRISPR-Cas, представляющих собой комплекс фермента нуклеазы, расщепляющей ДНК, и специального «указателя», направляющего действие фермента на определенный фрагмент вирусного генома. Суть в том, что после встречи с вирусом бактерия сохраняет «на память» кусочек его ДНК в специальном гене. На основе этого ДНК-фрагмента бактерия синтезирует соответствующую РНК, которая и становится частью белково-нуклеотидного комплекса. Комплекс с нуклеазой распознает и атакует ДНК фага, проникающую в клетку, и разрушает ее.

Разобравшись с механизмом работы систем CRISPR-Cas, исследователи попробовали снабдить подобным «оружием» и самих фагов, для чего в их геном ввели комплекс генов, кодирующий нуклеазу и адресующие последовательности РНК, комплементарные специфическим участкам генома бактерий. «Мишенью» могут выступать гены, ответственные за множественную лекарственную устойчивость. Эксперименты увенчались полным успехом – такие фаги с большой эффективностью поражали бактерии, на которые были «настроены».

Фаговые антибиотики

В терапевтических целях фаги необязательно использовать напрямую. За миллионы лет эволюции бактериофаги разработали арсенал специфических белков – инструментов для распознавания целевых микроорганизмов и манипуляций с биополимерами жертвы, на основе которых можно создавать противобактериальные препараты. Наиболее перспективными белками такого типа являются ферменты *эндолизин*ы, которые фаги используют для разрушения клеточной стенки

при выходе из бактерии. Сами по себе эти вещества являются мощными антибактериальными средствами, нетоксичными для человека. Эффективность и направленность их действия можно повысить, изменив в них адресующие структуры – белки, специфически связывающиеся с определенными бактериями.

Большинство бактерий делятся по устройству клеточной стенки на *грамположительные*, мембрана которых покрыта очень толстым слоем пептидогликанов, и *грамотрицательные*, у которых слой пептидогликана расположен между двумя мембранами. Использование природных эндолизинов особенно эффективно в случае грамположительных бактерий (стафилококков, стрептококков и др.), поскольку пептидогликановый слой у них расположен снаружи. Грамотрицательные бактерии (синегнойная палочка, сальмонеллы, кишечная палочка и др.) являются менее доступной мишенью, поскольку ферменту, чтобы добраться до внутреннего пептидогликанового слоя, необходимо проникнуть сквозь внешнюю бактериальную мембрану.

Для преодоления этой проблемы были созданы так называемые *артилизины* – модифицированные варианты природных эндолизинов, содержащие поликатионные или амфипатические пептиды, которые дестабилизируют внешнюю мембрану и обеспечивают доставку эндолизина непосредственно к пептидогликановому слою. Артилизины обладают высокой бактерицидной активностью и уже показали свою эффективность при лечении отитов у собак (Briers *et al.*, 2014).

Примером модифицированного эндолизина, избирательно действующего на определенные бактерии, является препарат P128 канадской компании *GangaGen*. Он представляет собой биологически активный фрагмент эндолизина, соединенный с *лизостафином* – адресующей белковой молекулой, которая связывается с поверхностью клеток стафилококков. Полученный химерный белок обладает высокой активностью против разных штаммов стафилококка, в том числе со множественной лекарственной устойчивостью.

«Счетчики» бактерий

Бактериофаги служат не только разносторонним терапевтическим и «дезинфицирующим» средством, но и удобным и точным аналитическим инструментом микробиолога. К примеру, благодаря своей высокой специфичности они являются природными аналитическими реагентами для выявления бактерий определенного вида и штамма.

В простейшем варианте такого исследования в чашку Петри с питательной средой, засеянную бактериальной культурой, добавляют по капле различные диагностические бактериофаги. Если бактерия окажется чувствительной к фагу, то на этом месте бактериального

«газона» образуется «бляшка» – прозрачный участок с убитыми и лизированными бактериальными клетками.

Анализируя размножение фагов в присутствии целевых бактерий, можно количественно определить численность последних. Так как количество фаговых частиц в растворе возрастает пропорционально числу содержащихся в нем бактериальных клеток, то для оценки численности бактерий достаточно определить титр бактериофага.

Специфичность и чувствительность такой аналитической реакции достаточно высока, а сами процедуры просты в исполнении и не требуют сложного оборудования. Важно, что диагностические системы, основанные на бактериофагах, сигнализируют о наличии именно живого патогена, тогда как другие методы, такие как ПЦР и иммуно-аналитические, свидетельствуют лишь о наличии биополимеров, принадлежащих этой бактерии. Такого типа диагностические методы особенно удобны для использования в экологических исследованиях, а также в пищевой индустрии и сельском хозяйстве.

Сейчас для выявления и количественного определения разных штаммов микроорганизмов применяют специальные *референсные виды* фагов. Очень быстрые, работающие практически в режиме реального времени аналитические системы могут быть созданы на основе генетически модифицированных бактериофагов, которые при попадании в бактериальную клетку запускают в ней синтез репортерных флуоресцирующих (или способных к люминесценции) белков, таких как *люцифераза*. При добавлении к подобной среде необходимых субстратов в ней будет появляться люминесцентный сигнал, величина которого соответствует содержанию бактерий в образце. Такие «меченные светом» фаги были разработаны для детекции опасных патогенов – возбудителей чумы, сибирской язвы, туберкулеза, а также инфекций растений.

Вероятно, с помощью модифицированных фагов удастся решить и давнюю задачу глобальной важности – разработать дешевые и быстрые методы детекции возбудителей туберкулеза на ранней стадии заболевания. Задача эта очень сложна, поскольку микобактерии, вызывающие туберкулез, отличаются крайне медленным ростом при культивировании в лабораторных условиях. Поэтому диагностика заболевания традиционными методами может затягиваться на срок до нескольких недель.

Фаговая технология позволяет упростить эту задачу. Суть ее в том, что к образцам анализируемой крови добавляют бактериофаг D29, способный поражать широкий спектр микобактерий. Затем бактериофаги отделяют, и образец перемешивают с быстрорастущей непатогенной культурой микобактерий, также

чувствительной к этому бактериофагу. Если в крови первоначально имелись микобактерии, которые были инфицированы фагами, то в новой культуре будет также наблюдаться наработка бактериофага. Таким образом можно выявить единичные клетки микобактерий, а сам процесс диагностики с 2–3 недель сокращается до 2–5 дней (Swift and Rees, 2016).

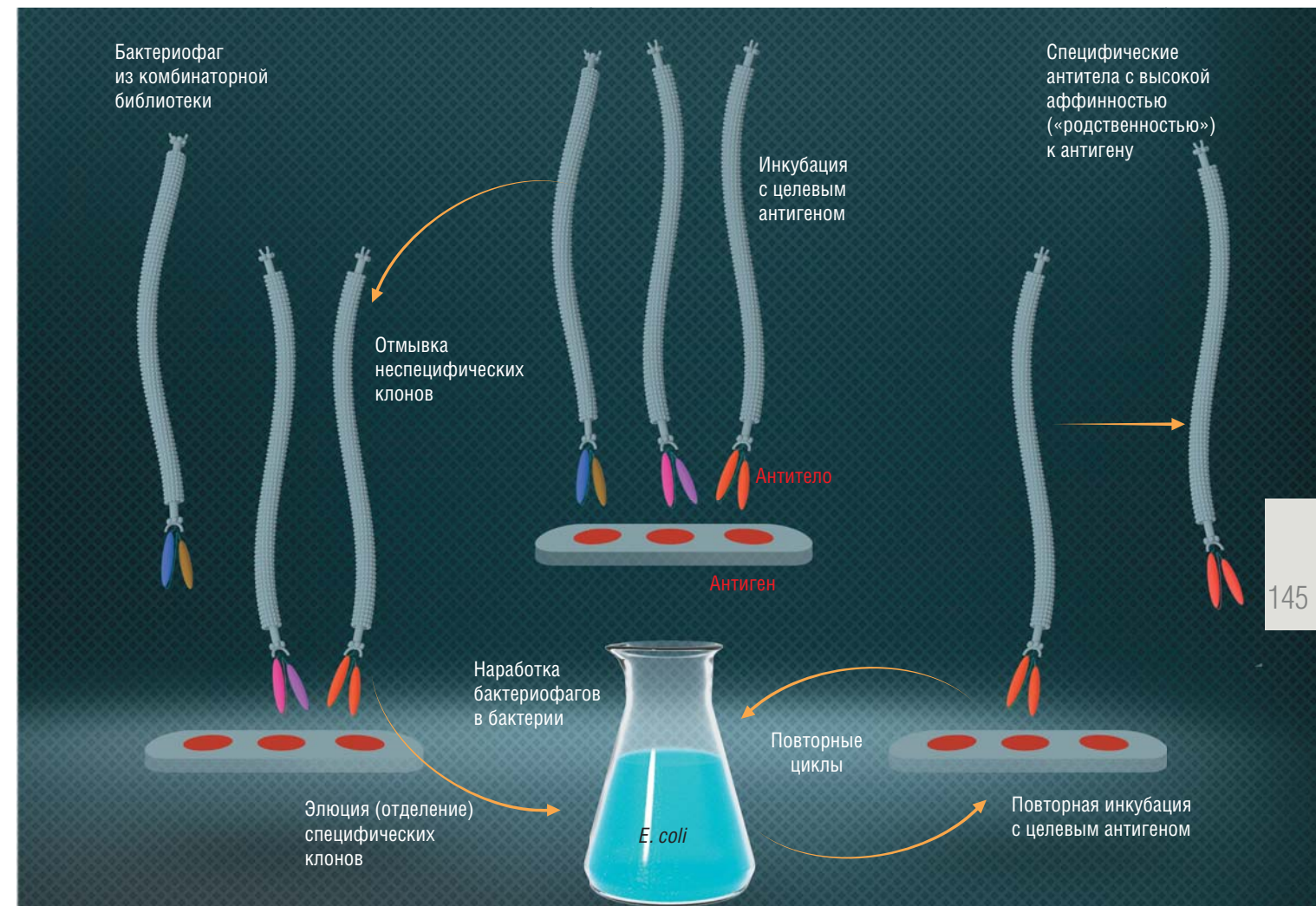
Фаговый дисплей

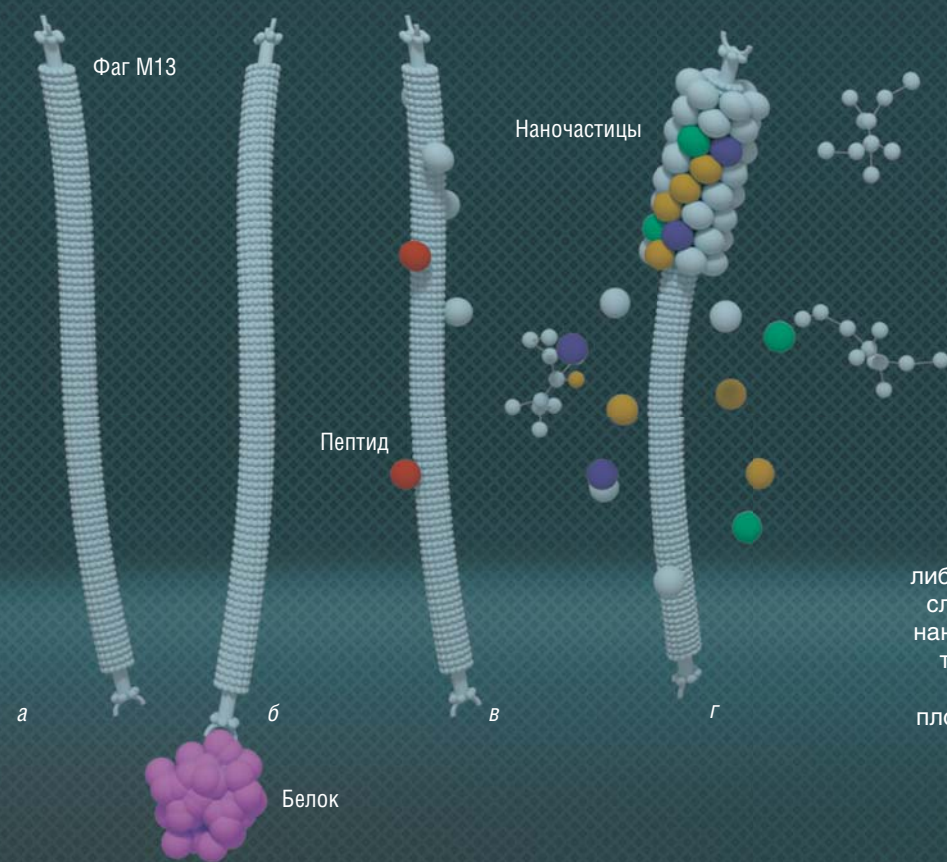
В наши дни бактериофаги широко применяются также в качестве простых систем для наработки белков с заданными свойствами. Речь идет о разработанной в 1980-х гг. крайне эффективной молекулярно-селекционной методике – *фаговом дисплее*. Этот термин был предложен американцем Дж. Смитом, который доказал, что на основе бактериофагов кишечной палочки можно создать жизнеспособный модифицированный вирус, несущий на своей поверхности чужеродный белок. Для этого в фаговый геном внедряется

соответствующий ген, который сливается с геном, кодирующим один из поверхностных вирусных белков. Такие модифицированные бактериофаги можно выделить из смеси с фагами дикого типа благодаря способности «чужого» белка связываться со специфическими антителами (Smith, 1985).

Из экспериментов Смита последовало два важных вывода: во-первых, используя технологию рекомбинантных ДНК, можно создавать огромные по разнообразию популяции численностью 10^6 – 10^{14} фаговых частиц, каждая из которых несет на своей поверхности разные варианты белков. Такие популяции назвали *комбинаторные фаговые библиотеки*. Во-вторых, выделив из популяции конкретный фаг (например, обладающий

Принципиальная схема процедуры биопеннинга – отбора высокоспецифичных рекомбинантных антител к конкретной мишени-антигену из комбинаторной библиотеки фагового дисплея на основе нитчатых бактериофагов. По: (Тикунова, Морозова, 2009)





Нитчатый бактериофаг M13, размножающийся в обычной кишечной палочке (а), может нести на своей поверхности рекомбинантные чужеродные белки, такие как антитела (б) либо пептиды (в). Он также может служить шаблоном для создания наноструктур и наноматериалов, таких как нанокристаллический катализатор с известной площадью поверхности и нужным распределением пор (г)

способностью связываться с определенным белком или органической молекулой), можно этот фаг размножить в бактериальных клетках и получить неограниченное число потомков с заданными свойствами.

С помощью фагового дисплея сегодня производят белки, которые могут избирательно связываться с терапевтическими мишенями. Примером могут служить экспонированные на поверхности фага M13 белки, способные узнавать и взаимодействовать с опухолевыми клетками. Роль этих белков заключается в «упаковке» нуклеиновой кислоты, поэтому они хорошо подходят и для создания препаратов генотерапии, только в этом случае они формируют частицу уже с терапевтической нуклеиновой кислотой.

На сегодня можно выделить два основных направления применения фагового дисплея. Технология на основе пептидов используется для исследования рецепторов и картирования сайтов связывания антител, создания иммуногенов и нановакцин, а также картирования сайтов связывания субстратов у белков-ферментов. Технология на основе белков и белковых доменов – для отбора антител с заданными свойствами, изучения белок-лигандных взаимодействий, скрининга экспрессируемых фрагментов комплементарной ДНК и направленных модификаций белков.

С помощью фагового дисплея можно вносить узнающие группировки во все виды поверхностных вирусных белков, а также в основную белок, формирующую тело бактериофага. Вводя в поверхностные белки пептиды с заданными свойствами, можно получить целый спектр ценных биотехнологических продуктов. Например, если этот пептид будет имитировать белок опасного вируса или бактерии, узнаваемый иммунной системой, то такой модифицированный бактериофаг представляет собой вакцину, которую можно просто, быстро и безопасно наработать.

Если же концевой поверхностный белок бактериофага «адресовать» на раковые клетки, а к другому поверхностному белку присоединить репортерные группы (например, флуоресцирующие или магнитные), то получится средство для обнаружения опухолей. А если к частице присоединить еще и цитотоксический препарат (а современная биоорганическая химия позволяет легко это сделать), то получится лекарство, направленно действующее на раковые клетки.

Одним из важных применений метода фагового дисплея белков является создание *фаговых библиотек рекомбинантных антител*, где антигенсвязывающие фрагменты иммуноглобулинов расположены на поверхности фаговых частиц fd или M13. Особый интерес

Разработаны методы, позволяющие располагать нитчатые бактериофаги один за другим («хвост к хвосту»). Получающиеся в результате мультифаговые структуры представляют собой упорядоченные наноматрицы, которые могут быть использованы для создания транзисторных и диодных устройств

представляют библиотеки антител человека, поскольку такие антитела могут быть использованы в терапии без ограничения. В последние годы только на фармацевтическом рынке США продается около полутора десятка терапевтических антител, сконструированных с использованием этого метода.

«Промышленные» фаги

Методология фагового дисплея нашла себе и совершенно неожиданное применение. Ведь бактериофаги в первую очередь являются наноразмерными частицами определенной структуры, на поверхности которых располагаются белки, которые с помощью фагового дисплея можно «снабдить» свойствами специфически связываться с нужными молекулами. Такие наночастицы открывают широчайшие возможности для создания материалов с заданной архитектурой и «умных» молекулярных наноструктур, при этом технологии их производства являются экологически чистыми.

Так как вирус представляет собой достаточно жесткую конструкцию с определенным соотношением размерностей, это обстоятельство позволяет использовать его для получения пористых наноструктур с известной площадью поверхности и нужным распределением пор в структуре. Как известно, именно площадь поверхности катализатора является критическим параметром, определяющим его эффективность. А существующие на сегодня технологии формирования на поверхности бактериофагов тончайшего слоя металлов и их оксидов позволяют получать катализаторы с чрезвычайно развитой регулярной поверхностью заданной размерности. (Lee *et al.*, 2012).

Исследователь из Массачусетского технологического института А. Бельхер использовала бактериофаг M13 как шаблон для роста наночастиц и нанопроводов родия и никеля на поверхности оксида церия. Полученные наночастицы катализатора способствуют «конвертации» этанола в водород, таким образом, этот катализатор может оказаться весьма полезным для модернизации существующих и создания новых водородных топливных ячеек. Катализатор, выращенный на шаблоне вируса, отличается от аналогичного по составу «обычного» катализатора более высокой стабильностью, он менее подвержен старению и дезактивации поверхности (Nam *et al.*, 2012).

Путем покрытия нитчатых фагов золотом и двуокисью индия были получены электрохромные материалы – пористые нанопленки, меняющие цвет при изменении электрического поля, способные реагировать на изменение электрического поля в полтора раза быстрее известных аналогов. Подобного рода материалы перспективны для создания энергосберегающих ультратонких экранных устройств (Nam *et al.*, 2012).

В Массачусетском технологическом институте бактериофаги стали основой для производства очень мощных и чрезвычайно компактных электрических батарей. Для этого использовали живые, генетически модифицированные фаги M13, неопасные для человека и способные присоединять к поверхности ионы различных металлов. В результате самосборки этих вирусов были получены структуры заданной конфигурации, которые при покрытии металлом сформировали достаточно длинные нанопровода, ставшие основой анода и катода. При самоформировании материала анода использовался вирус, способный присоединять золото и оксид кобальта, для катода – способный присоединять фосфат железа и серебро. Последний фаг также обладал способностью за счет молекулярного распознавания «подхватывать» концы углеродной нанотрубки, что необходимо для обеспечения эффективного переноса электронов.

На основе комплексов бактериофага M13, двуокиси титана и одностенных углеродных нанотрубок были также созданы материалы для солнечных батарей (Dang *et al.*, 2011).

Последние годы ознаменовались широкими исследованиями бактериофагов, которые находят себе все новые применения не только в терапии, но и в био- и нанотехнологиях. Их очевидным практическим результатом должно стать возникновение нового мощного направления персонализированной медицины, а также создание целого спектра технологий в пищевой промышленности, ветеринарии, сельском хозяйстве и в производстве современных материалов. Мы ждем, что второе столетие исследований бактериофагов принесет не меньше открытий, чем первое.

Литература

Бактериофаги: биология и применение / Ред.: Э. Камтер, А. Сулаквелидзе. М.: Научный мир. 2012.

Стент Г., Кэлиндар Р. Молекулярная генетика. М.: Мир. 1974. 614 с.

Тикунова Н. В., Морозова В. В. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител // *Acta Naturae*. 2009. № 3. С. 6–15.

Mc Grath S., van Sinderen D. *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. Horizon Scientific Press, 2007.