

## САМООРГАНИЗАЦИЯ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ВИРУСОВ: НАНО-ПРОЦЕСС СБОРКИ ГОЛОВОК (КАПСИДОВ) И УКЛАДКИ ДНК НА ПРИМЕРЕ ХВОСТАТЫХ БАКТЕРИОФАГОВ (ЛЯМБДА, T4)

Ботин А.С.<sup>1,2</sup>, Пулин А.М.<sup>1</sup>, Гаврилов А.В.<sup>1</sup>, Попова Т.С.<sup>2</sup>, Кордова А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы  
ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ; e-mail: botin-as@rudn.ru

<sup>2</sup> ГБУЗ «НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»  
Большая Сухаревская площадь, 3, г. Москва, 129090, РФ; e-mail: BotinAS@sklif.mos.ru

Поступила в редакцию 29.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0651

**Аннотация.** Актуальность проблемы. Широкое и бесконтрольное применение антибактериальных препаратов не только в медицине, но и в сельском хозяйстве, животноводстве, пищевой промышленности привело к распространению мультирезистентных штаммов, устойчивых к наиболее распространенным антибактериальным препаратам. В поисках альтернативных стратегий профилактики и контроля бактериальной инфекции все чаще обращают внимание на бактериофаговую (фаговую) терапию. Располагая широким диапазоном возможностей генной инженерии, эти бактериальные вирусы могут быть модифицированы с целью достижения точного контроля и обнаружения бактерий и, таким образом, послужить новым источником антимикробных средств. Кроме применения в антимикробной терапии, фаги также могут быть использованы как транспортные системы для доставки препаратов, как вакцины или же могут быть использованы для наносборки новых материалов, так как сами фаги, их фрагменты и компоненты являются нанообъектами и функционирующими наномашинками, процесс сборки которых чрезвычайно актуален. Целью данной статьи является: проведение анализа и обобщение важнейшей информации по теме бактериофагов, методов их определения и эффективной трансформации в современной науке, оценка достижений современных исследований в области процесса сборки головок (капсидов) и укладки внутрикапсидной ДНК у хвостатых бактериофагов (фаг лямбда и фаг T4), производство генно-модифицированных фагов и обзор основных перспектив развития данного направления.

**Ключевые слова:** вирусы, бактериофаги, самосборка капсидов, укладка ДНК, нанообъекты, фаготерапия.

**Введение. Фундаментальная проблема бактериофагов.** Первое косвенное свидетельство существования бактериофагов получил английский учёный Эрнест Ханкин, который в 1896 году написал о целебных свойствах вод Ганга и Джамна в Индии. Ханкин выяснил, что вода обладала антибактериальными свойствами по отношению к возбудителю холеры, сохранявшимися после фильтрации, но пропадающими после кипячения. К тому моменту вирусы, как микроскопические патогены, обладающие способностью проникать через бактериальные фильтры, были уже известны, однако учёный не высказал никаких предположений относительно вирусной природы открытого им эффекта. Наряду с этим известно, что российский микробиолог Н. Ф. Гамалея в 1898 году, впервые наблюдал явление лизиса сибирезвённой палочки под влиянием перевиваемого агента, но он также не описал этот агент в качестве вируса бактерий и не продолжил его исследования. Поэтому открывателями бактериофагов принято считать англичанина Фредерика Туорта и канадско-французского учёного Феликса д'Эрелля. В 1915 году английский ветеринарный микробиолог Ф. Туорт (F.W. Twort) описал явление «стекловидной трансформации» стафилококка, которое было названо «феномен Туорта». В своей работе он наблюдал разрушение стафилококка перевиваемым фильтрующимся агентом. Таким образом он впервые открыл вирус бактерий [1]. Для развития исследований в области бактериофагии особое значение имели работы французского и канадского учёного Феликса д'Эрелля (F. d'Herelle). В 1917 г. он сообщил, что из фекальных масс больных дизентерией ему удалось выделить особый литический фактор (вирус), способный проходить через бактериальные фильтры, размножаться на дизентерийных бактериях и вызывать при этом их лизис. Для обозначения этого вируса д'Эрелль впервые предложил название бактериофаг. Им же впервые было показано присутствие бактериофагов в составе микрофлоры человека и животных [2]. Таким образом, факт участия бактериофагов в функционировании нормального микробиоценоза тела животных и человека известен на протяжении почти 100 лет, однако данные о взаимном влиянии популяций фагов и их хозяев, а также о роли фагов в функционировании сообщества все ещё очень скудны и разрознены. Понимание особенностей эколого-физиологических взаимоотношений в тройственной системе «бактерии - фаги – макроорганизм» должно служить теоретической основой для управления этой системой [3]. Исследования бактериофагов в 1930-1950х годах привели к формированию современной концепции вируса [4]. Фаговые исследования также дали начало молекулярной генетике и молекулярной биологии. Преимущественно на модели бактериофагов были впервые описаны молекулярные основы биологических процессов, особенно на ранних этапах развития молекулярной генетики и молекулярной микробиологии [5]. В настоящее время исследования по молекулярной биологии вирусов бактерий носят более специальный характер, будучи в основном направлены на изучение фагов как самостоятельного биологического явления, нежели на их использование в качестве модели для расшифровки универсальных биологических процессов.

**Жизненные циклы бактериофагов.** Можно выделить несколько этапов жизненного цикла прокариотических вирусов, которые характерны также и для большинства вирусов эукариот: адсорбция, высвобождение нуклеиновой кислоты из белковой оболочки, экспрессия и репликация нуклеиновой кислоты, сборка вириона, выход потомства вируса из инфицированной клетки [6]. Адсорбция фагов происходит в два этапа. Первый этап адсорбции это определение поверхностных клеточных структур, этот этап является обратимым и фаг имеет шанс диссоциировать от клетки без потери инфекционности. Во время второго этапа, происходит прочное связывание между структурой фага (например, осевой хвостовой фибриллой) и рецептором, которое запускает процесс необратимой перестройки вириона и высвобождение нуклеиновой кислоты. После адсорбции, механизмы вирусной частицы обеспечивают проникновение сквозь оболочки бактериальной клетки (к примеру, с помощью специфических фаговых ферментов, локализованных в хвосте или капсиде) и нуклеиновая кислота транспортируется в клетку, тогда как капсид остаётся на внешней поверхности клетки (только в случае семейства *Cystoviridae* происходит проникновение в клетку внутреннего нуклеокапсида вириона). После проникновения в клетку генетический материал вируса или встраивается в хозяйский геном, или остаётся в цитоплазме [7]. Существует несколько типов жизненных циклов бактериофагов: литический, лизогенный, псевдолизогенный и хронические инфекции [7, 8]. В литическом цикле фаг переключает клеточный метаболизм в направлении продукции новых фагов, которые освобождаются вследствие лизиса клетки. В лизогенном цикле, геном умеренного фага как правило интегрируется в геном хозяйской клетки и существует в нем неограниченное время в стадии покоя (профаг) и реплицируется вместе с хозяином. В некоторых клетках спонтанно или под воздействием внешних факторов может происходить индукция профага, при которой он вырезается из хромосомы и переходит к литическому развитию, заканчивающемуся синтезом вирусных частиц и лизисом клетки. При хронической инфекции потомство фагов постоянно выходит из заражённой хозяйской клетки посредством почкования или экстрезии без лизиса. Клетка при этом сохраняет жизнеспособность в течение более или менее длительного времени. Наименее изученный жизненный цикл вирусов – псевдолизогенный. Феномен псевдолизогении был описан [8] как явление, где есть постоянное производство фагов в присутствии избытка хозяйских клеток. То есть, фаговый лизис не приводит к смерти культуры, а скорее находится в состоянии, в котором высокая численность фага сосуществует с экспоненциальной фазой роста хозяйских клеток.

**Фаг лямбда (фаг  $\lambda$ )** – это умеренный бактериальный вирус *E. coli* двухцепочечной геномной ДНК. Был впервые обнаружен Э. Ледербергом (E.M. Lederberg) в 1950 году [10]. Через 3 года А. Львов при исследовании генетических элементов (плазмид и эписом) у бактерий открыл способность фага лямбда встраиваться в геном бактерии *E. coli* в состоянии профага и передаваться в ряду поколений как генетический элемент [9]. Встроенный фаг Львов назвал профагом, а бактерию, в которую был встроен геном – лизогенной.

Бактериофаг лямбда состоит из головки икосаэдрической формы и хвоста. На его конце имеются боковые нити. Имеется белковая оболочка, в состав которой входит около 15 белков. Они кодируются вирусным геномом. Интеграция фага происходит путем генетической рекомбинации на определенном сайте бактериального генома – сайт *attL*. Обмен генетической информацией осуществляется с образованием структуры Холлидея и в присутствии двух белков: бактериального IHF и фагового Int, которые, связываясь с определенным сайтом кольцевого генома фага (*attP*), образуют интрасому [11].

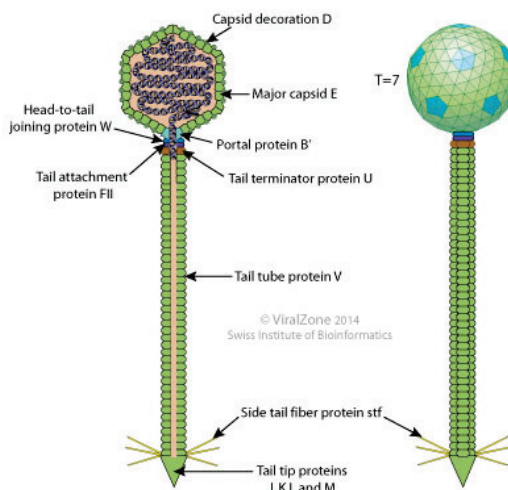
Фаг лямбда может развиваться по лизогенному и литическому пути в зависимости от характера взаимодействия клетки-хозяина и вируса. Литический жизненный цикл заключается в производстве новых фаговых частиц и высвобождении вирусного потомства в среду, влечет гибель клетки-хозяина. При лизогенном пути фаговый геном встраивается в хромосому *E. coli* и может передаваться следующим поколениям [12].

Фаг лямбда является одним из наиболее детально изученных живых организмов на Земле. В связи с этим его используют как модельный объект в генетических исследованиях. В генной инженерии данный фаг применяют в качестве вектора для клонирования, так как молекула ДНК бактериофага лямбда имеет участок, не являющийся необходимым для его развития. Поэтому его можно вырезать и заменить любым другим аналогичным по размеру фрагментом ДНК, а затем путем размножения рекомбинантного бактериофага осуществить клонирование. Для создания библиотек генов одними из самых распространенных и являются векторы на основе фага  $\lambda$ . В связи с тем, что жизненный цикл бактериофага лямбда может идти двумя путями, фагу «приходится делать выбор» в пользу либо лизогенного, либо литического пути. Выбор пути осуществляется на основе простого механизма переключения генов. Это делает бактериофаг удобным объектом для изучения регуляции генной экспрессии [12].

Данный бактериофаг также применяют для лечения некоторых бактериальных заболеваний (холеры, дизентерии) без риска для здоровья. Зачастую препаратами на основе бактериофагов заменяют антибиотики, особенно при резистентности бактерий к антибиотикам.

Бактериофаг лямбда ( $\lambda$ ), или колифаг  $\lambda$ , является фагом, специализированным на *E. coli*. Принадлежит к семейству *Siphoviridae*. Его частица, или вирион, состоит из капсида (головки), представляющего собой полый белковый кристалл, отростка и нитей (фибрилл) на конце отростка [13]. В капсиде заключен геном фага – двунигетевая линейная ДНК длиной 48502 п.н., обладающая липкими 5'-концами, которые еще называют *cos*-концами (*cosL* и *cosR*). Геном включает 32 гена, кодирующих белки капсида (7 белков), отростка (11 белков) и имеющих регуляторную роль (14 генов). Сегмент генома размером около 20 тыс. п.н. отвечает за процесс встраивания ДНК фага в геном хозяина (рис. 1.)

Enterobacteria phage λ

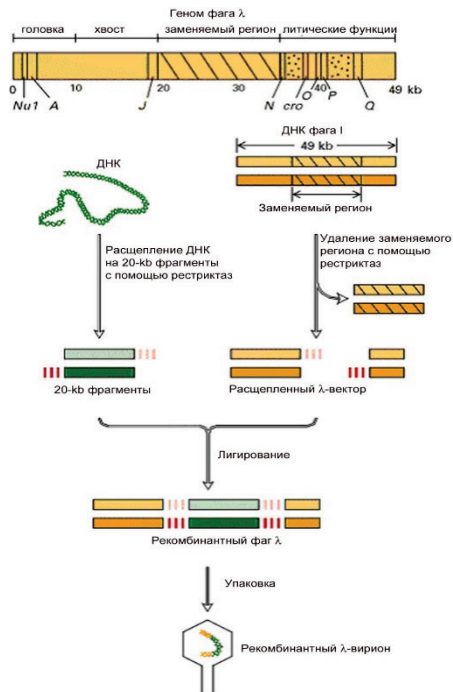


**Рисунок 1.** Бактериофаг лямбда ( $\lambda$ ), или колифаг  $\lambda$ , является фагом, специализированным на *E. coli*. Принадлежит к семейству Siphoviridae. Его частица, или вирион, состоит из капсида (головки), представляющего собой полый белковый кристалл, отростка и нитей (фибрилл) на конце отростка

Стратегия клонирования. Третья часть ДНК фага лямбда, около 20 кб, расположенных в середине, несущественна для размножения фага и ответственна за встраивание в хромосомную ДНК [14].

Этот сегмент можно заменить чужеродной ДНК. Рекомбинантная ДНК будет реплицироваться как фаговая ДНК по литическому пути развития. Фаговая ДНК упаковывается в головки в цитоплазме клеток *E. coli*. Упаковочная реакция лежит в основе клонирования: смешав в пробирке пустые головки, рекомбинантную ДНК и отростки можно получить зрелые фаговые частицы.

ДНК фага лямбда имеет два *SamHI*-сайта, фланкирующих участок размером около 20 кб. При гидролизе фаговой ДНК рестриктазой *SamHI* образуются три фрагмента – L-левое плечо, которое содержит информацию о



**Рисунок 2.** Структура генома фага и конструирование векторов на основе бактериофага лямбда [http://www.ncbi.nih.gov/book/Molecular Cell Biology /recombinant DNA and Genomics]. ДНК фага лямбда - это линейная двухцепочечная молекула размером около 48502 п.н. (пар нуклеотидов) с одноцепочечными 5'концами из 12 нуклеотидов. Их называют *cos*-концами (*cos*-сайтами), они взаимокomплементарны и могут спариваться друг с другом с образованием кольцевой молекулы. В зрелых вирионах ДНК находится в форме линейной молекулы, попадая в клетку, ДНК циклизуется по *cos*-сайтам и функционирует в кольцевой форме

головке и отростке фага лямбда, R-правое плечо, которое содержит информацию о репликации фаговой ДНК и лизисе бактериальной клетки (рис. 2). Средний сегмент ДНК кодирует белки, ответственные за интеграцию в хромосомную ДНК. Этот участок фаговой ДНК замещается чужеродной ДНК. ДНК, предназначенная для клонирования, предварительно расщепляется рестриктазой BamHI, рестрикты фракционируют и отбирают фрагменты размером до 20 кб (рис. 2). Оба препарата, фаговую и чужеродную ДНК смешивают в одной пробирке и обрабатывают ДНК-лигазой. Лигированная смесь будет содержать разные комбинации ДНК, в том числе и восстановленную ДНК фага лямбда [16]. Далее рекомбинантные молекулы смешивают с головками и отростками фага лямбда, и *in vitro* происходит самосборка зрелых фаговых вирионов. *Правило таково, что в фаговые головки упаковываются только фрагменты около 50 кб, ДНК по размеру более 52 кб не уместится в головку, ДНК по размеру менее 38 кб после упаковки дает не инфицирующие фаговые частицы.*

На следующем этапе необходимо отделить рекомбинантные фаги. Для этого ими инфицируют клетки *E. coli*, в хромосому которых интегрирован фаг P2. Клетки *E. coli*-P2 приобретают иммунитет на другие бактериофаги, способные встраиваться в хромосому. Поэтому инфицировать такие клетки способны только рекомбинантные бактериофаги с deletированной областью интеграции. Полноценные фаги лямбда не включаются в клетки *E. coli*-P2 [14].

**Структура фага T4.** Наиболее полная структурная информация на сегодняшний день имеется о фаге T4, дцДНК-содержащем вирусе, относящемся к семейству Myoviridae и инфицирующим *E. coli*. Вирион T4 состоит из капсида и сокращаемого хвоста, который оканчивается базальной пластинкой с 6 длинными фибриллами. По данным криомикроскопии капсид T4 имеет форму вытянутого икосаэдра длиной 1200 Å (120 nm) и шириной 860 Å (86 nm) [13]. Основной белок капсида, gp23 (48.7 кДа, 930 копий в капсиде), формирует гексагональную решетку с триангуляционными числами [14]  $T_{end} = 13$  для концов и  $T_{mid} = 20$  для середины [13]. Расстояние между соседними гексомерами gp23 составляет ~140 Å (14 nm). Одиннадцать вершин капсида занимают пентамеры специального вершинного белка gp24 (47.2 кДа), а двенадцатую вершину занимает додекамер gp20, который является порталным белком и служит для прикрепления хвоста и выхода ДНК [15].

Основными белками капсида T4 являются gp23, gp24, gp20, Hoc и Soc и для большинства из них известны кристаллические структуры [16]. Gp23 образует стенку капсида, gp24 расположен на вершинах, gp20 - порталный белок. Считается, что белок, занимающий вершины икосаэдра, gp24, является более поздним приобретением в ходе эволюции [17]. Hoc (highly antigenic outer capsid protein) имеет форму гантели и располагается в центре каждого гексона, образованного gp23, и Soc (small outer capsid protein) имеет палочкообразную форму и встраивается между гексонами. Оба эти белка необязательны и прикрепляются к капсиду после его сборки [17, 19]. Отсутствие этих белков не сказывается на воспроизводстве фагов и их способности инфицировать. Soc взаимодействует с 2 соседними молекулами gp24, склеивая соседние гексоны. Прикрепленные Soc тримеризуются с образованием олигомера из трёх молекул, формируя жесткий каркас, укрывающий структуру капсида. Hoc (highly antigenic outer capsid protein) не вносит изменений в стабильность капсида, однако, его Ig-подобный домен расположенный на поверхности может взаимодействовать с клеточной поверхностью, что способствует выживанию фага [17].

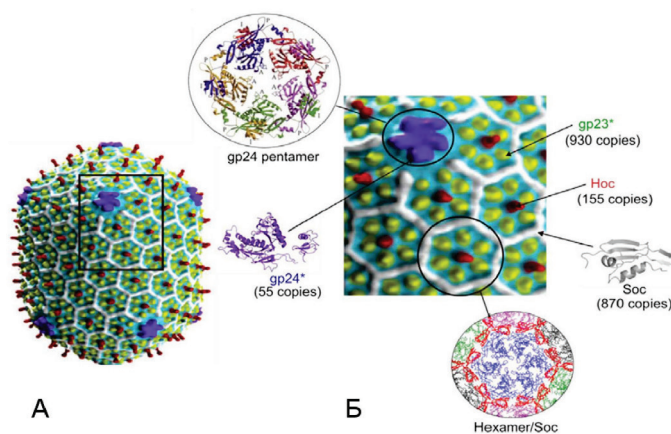
Упакованная ДНК T4 имеет много общих черт с ДНК других хвостатых фагов: ДНК конденсирована до плотности ~500 мг/мл, расстояние между тяжами ДНК составляет 2.5 nm. ДНК T4 упакована в ориентации, параллельной продольной оси капсида вокруг внутреннего белкового тела [20]. Один из внутренних белков T4, IP18, впрыскивается в клетку вместе с ДНК для ее защиты от эндонуклеаз *E. coli* [21,22]. Gp2 - белок, защищающий концы фаговой ДНК от эндонуклеаз клетки-хозяина, также находится внутри капсида [23].

ДНК внутри капсида преимущественно имеет В-форму [24]. Отрицательные заряды фосфатных групп уравниваются аминами, полиаминами, одно- и двувалентными катионами. Среди всех положительно заряженных аминокислот только лизин, находящийся в составе внутренних белков контактирует с фосфорами ДНК, что позволяет предполагать, что внутренние белки образуют с ДНК специальные структуры [17].

#### **Сравнительное строение вирусной частицы бактериофага T4 и бактериофага Лямбда.**

**Бактериофаг T4:** Этот бактериофаг, как и все T-четные колифаги относится к сложным вирусам, т.е. он состоит из икосаэдрической головки диаметром 650 Å (65nm) и длиной 950 Å (95nm), и отростка или хвоста. Капсид головки состоит из капсомеров, внутри него находится плотно упакованная двухцепочечная линейная ДНК и фермент транскриптаза в неактивном состоянии. Отросток фага имеет сложное строение. Он состоит из полого стержня, покрытого чехлом, который заканчивается базальной пластинкой с шипами и нитями. Все структуры отростка состоят из белков. В области базальной пластинки находится фермент бактериофаговый лизоцим, который способен разрушать пептидогликан муреин клеточной стенки бактерий. Здесь же имеется АТФ-аза, которая регенерирует энергию для сокращения чехла отростка бактериофага.

**Бактериофаг Лямбда:** Сложный фаг. Икосаэдрический капсид диаметром 50nm образован молекулами шести разных белков. Хвост длиной 135nm включает белки 11 типов. Содержит линейную двухцепочечную ДНК. На 5/-конце каждой ее цепи имеется одноцепочечная последовательность из 12 нуклеотидов - липкие концы (cos-сайты). Сразу же после проникновения фаговой ДНК в бактериальную клетку, липкие концы ДНК ковалентно соединяются ДНК-лигазой клетки хозяина и образуется кольцевая молекула.



**Рисунок 3.** Сборка головок (капсидов): у всех хвостатых фагов способ укладки полипеттидной цепи (фолд) капсидных белков идентичен (А - общий план, Б – ячейка). [[http://www.ncbi.nih.gov/book/Molecular Cell Biology/recombinant DNA and Genomics](http://www.ncbi.nih.gov/book/Molecular_Cell_Biology/recombinant_DNA_and_Genomics)]

**Сборка головок (капсидов) хвостатых бактериофагов.** В настоящее время накоплен большой массив данных, свидетельствующих о том, что у всех хвостатых фагов способ укладки полипеттидной цепи (фолд) капсидных белков идентичен. Это косвенно подтверждается общностью их происхождения [25].

Морфогенез капсида (головки) хвостатых фагов инициируется порталным белком, который может связываться с другими морфогенетическими белками вируса для образования инициирующего комплекса. Этот комплекс инициирует сборку более крупной промежуточной структуры – так называемой проголовки (или прокапсида), которая затем подвергается протеолитическому процессингу, упаковке ДНК и расширению, что приводит к образованию законченной головки фага [26].

У фага Т4 и родственных вирусов инициирующий комплекс проголовки, состоящий из порталного белка gp20 и морфогенетического фактора gp40, прикрепляется к внутренней стороне цитоплазматической мембраны. Однако это является скорее исключением, и у большинства бактериофагов сборка проголовок осуществляется в цитоплазме. Стенка капсида формируется как правило одним единственным белком — главным белком капсида, который образует как гексамеры, из которых сложены грани икосаэдра, так и пентамеры, расположенные в вершинах проголовки. В некоторых случаях эти функции могут быть разделены. Так у фага Т4 главный белок капсида gp23 образует только гексамеры, а вершины заняты отдельным белком - gp24, который, однако, гомологичен gp23 и также обладает характерным НК97-фолдом. Весьма важно, что хотя проголовки имеют такую же укладку субъединиц, как и зрелые капсиды, их форма менее угловатая, и часто ближе к сфере, чем к икосаэдру. Контакты между соседними олигомерами главного белка капсида менее жесткие, поэтому можно говорить об определенной кривизне поверхности этой структуры [27].

Рост стенки проголовки предположительно происходит «снизу вверх» – от порталного комплекса до противоположной ему вершины, однако окончательно это пока не выяснено. При этом субъединицы белка капсида могут присоединяться к растущей структуре как в виде мономеров, так и в виде предварительно сформированных пента- и гекса-меров. Так как головки фагов часто имеют достаточно большие размеры, то одних физико-химических свойств самих субъединиц главного белка капсида не достаточно для соблюдения правильного размера образующейся проголовки, и необходим контроль со стороны вспомогательной структуры. Этот контроль осуществляется при помощи внутреннего скаффолда (от англ. scaffold – строительные леса, каркас). Белок скаффолда может быть закодирован отдельным геном, обычно находящимся в геноме непосредственно перед геном белка оболочки, или представлять собой N-концевой домен белка оболочки.

Большинство фагов кодируют отдельный белок скаффолда. Эти белки обычно состоят из 2–3  $\alpha$ -спиралей, уложенных антипараллельно, в результате чего субъединицы белка скаффолда имеют палочкообразную форму. Субъединицы скаффолда образуют полимерную структуру, но детали ее организации неизвестны. Для фага Т4 по данным электронно-микроскопических исследований изолированных скаффолдов (naked scaffold), накапливающихся при инфекции мутантами, лишенными главного белка капсида (gp23), была предложена модель со спиральной симметрией. В соответствии с этой моделью скаффолд построен из нескольких (6-8) лент (напоминающих веревочные лестницы), собранных из палочковидных субъединиц белка скаффолда gp22, закрученных вокруг общей оси. Считается, что эта структура растет «вверх» от инициирующего порталного комплекса. Стенка капсида полимеризуется поверх скаффолда. Из-за вытянутой формы субъединиц и их спиральной укладки диаметр скаффолда оказывается достаточно точно детерминирован, что диктует строго определенный размер собирающейся проголовки (триангуляционное число Т) [27, 28].

Надо понимать, что на размер проголовки также оказывает существенное (часто и определяющее) влияние, и структура самого главного капсидного белка, гексамер которого имеет диаметр около 145 Å (14,5 нм), и небольшие отличия его формы могут диктовать наиболее выгодную кривизну поверхности проголовки (и, соответственно, определять ее триангуляционное число). Тем не менее, как правило, сам по себе капсидный

белок обычно способен собираться в структуры с различной кривизной (и, соответственно, размером), поэтому скаффолд может диктовать выбор правильного варианта сборки. Кроме этого, многие вирусы, например, фаг T4, а также фаги, phiEco32, 9g, phag29 и многие другие, обладают вытянутой головкой. Поэтому помимо механизма контроля диаметра существует необходимость контроля степени удлинения проголовки. Детали этого механизма не известны, однако имеющиеся не прямые данные указывают, что размер ограничивается в результате взаимодействия растущих скаффолда и стенки капсида [25].

По существующим представлениям в начале сборки формируется нижняя гемисферическая крышечка проголовки (5 равносторонних граней, окружающих порталную вершину), после чего структура растет в длину, сохраняя тот же диаметр. Наконец, в какой-то момент происходит событие, останавливающее рост проголовки и запускающее формирование верхней гемисферической крышечки. Косвенные данные указывают, что таким событием может быть критическое накопление сдвига фаз между молекулярными решетками скаффолда и стенки капсида, которые имеют различную симметрию и различную периодичность. Тем не менее, достоверно определить природу сигнала, останавливающего удлинение, пока не удается.

У некоторых небольших фагов отдельной полимерной структуры скаффолда, по-видимому, не образуется. В этих случаях субъединицы скаффолда связываются с соседними субъединицами полимеризующейся стенки капсида, и образуют контакты между собой, в результате чего скаффолд диктует определенное значение радиуса кривизны стенки проголовки, которое соответствует правильному значению числа T [29]. Так действует, например, белок скаффолда фага P2 gpO. Этот белок также обладает протеазной активностью, которая обеспечивает процессинг проголовки при созревании. Однако, по всей видимости, такой механизм пригоден лишь для формирования относительно небольших изометричных головок, таких как T=7 головка фага P2.

У некоторых, сравнительно немногих фагов, отдельные белки скаффолда отсутствуют. Вместо этого главный белок капсида имеет дополнительный N-концевой домен, формирующий длинный выступ в виде вытянутого треугольника – так называемый дельта-домен. Дельта-домены соседних субъединиц взаимодействуют друг с другом, в результате чего сформированная проголовка напоминает морского ежа, вывернутого наизнанку. В этой структуре вытянутые дельта-домены играют роль радиальных распорок, длина которых детерминирует диаметр прокапсида. Таким образом происходит сборка проголовок у колифагов T5 и HK97. Но если у T5 для образования капсида правильного размера необходимо участие порталного белка, то белок фага HK97 может собираться в икосаэдры такого же размера, что и головка фага (T=7), без помощи каких бы то ни было иных вирусных белков.

Вполне вероятно, что более детальное исследование структур скаффолдов, собранных из отдельного белка, обнаружит у многих фагов значительное сходство со структурой, образуемой дельта-доменами, однако пока такие данные отсутствуют.

Белки скаффолда или дельта-домены фагов являются также матрицей для присоединения различных внутренних белков, которые должны находиться внутри зрелого капсида. В большинстве случаев такие белки инжектируются вместе с ДНК или непосредственно перед ней и выполняют различные функции: от организации канала для транспорта генома через периплазматическое пространство (в основном у подовирусов) до первичного преобразования клетки для нужд репликации вируса – ингибирование антивирусных систем и/или клеточных макромолекулярных синтезов, завершение интернализации геномной ДНК и другие, не всегда понятные функции [25]. Так, например, у фагов, родственных T4, имеется несколько внутренних IP белков (от англ. internal protein). Интересно, что последовательности этих белков часто подвергаются латеральному переносу (модульные перестановки), но на N-конце все они несут весьма консервативную последовательность – так называемый сигнал упаковки. По-видимому, этот пептид взаимодействует с белком скаффолда gp22, что приводит к локализации IP белков внутри проголовки. Интересно, что используя данные сигналы упаковки, можно добиться упаковки в капсид T4 гетерологичных белков, например, флуоресцентного белка GFP.

Помимо небольших мономерных белков, в клетку бактерии некоторые фаги доставляют достаточно крупные и даже мультисубъединичные белки, такие как, например, вирионная РНК-полимераза подовируса №4. Загрузка их в капсид происходит также в момент сборки проголовки, до стадии упаковки ДНК [29, 30].

После завершения сборки оболочки проголовки происходит ее процессинг.

У большинства фагов для этого необходима активация протеазы проголовки, которая также является компонентом внутреннего скаффолда. У фага T4 протеаза gp21 образует сердцевинную часть скаффолда, у других фагов отдельные структуры, формируемые протеазой, не описаны. Протеаза активирует себя при помощи автопротеолиза. Активированные молекулы протеазы процессируют другие молекулы протеазы, вызывая и их активацию. Природа сигнала, запускающего процессинг первых субъединиц проголовочной протеазы, пока не установлена.

Протеаза производит расщепление белка скаффолда, а также удаление части аминокислотной последовательности белка оболочки [25]. Дельта-домены, если они используются в качестве скаффолда, также удаляются при протеолитическом процессинге. Поэтому у многих фагов молекулярная масса главного белка капсида в составе зрелых частиц оказывается заметно меньше, чем у полипептида, кодируемого соответствующим геном. Сами молекулы протеазы также расщепляются, и продукты гидролиза удаляются через поры в оболочке проголовки. Важно отметить, что несмотря на высокую активность, протеазы проголовки обладают строгой специфичностью к аминокислотной последовательности в участке расщепления (например, gp21 фага T4 узнает сайт (I или L)PPE), поэтому белки или их фрагменты, лишенные таких мотивов, остаются не расщепленными.

У фагов родственных T4 протеолитический процессинг сопряжен с отсоединением проголовки от поверхности цитоплазматической мембраны, где происходит ее сборка. Возможно, у некоторых других фагов, у которых процессы морфогенеза определенным образом локализованы в клетке, процессинг также может приводить к изменению локализации проголовок в клетке, однако точных данных об этом нет. У фага P22 разборка скаффолда не связана с протеолитическим расщеплением. Структура деполимеризуется в процессе упаковки ДНК, причем палочкообразные субъединицы белка скаффолда удаляются сквозь отверстия в оболочке проголовки и могут использоваться повторно для сборки новых фаговых частиц [31].

После сборки и протеолитического процессинга собранные проголовки становятся пригодны для упаковки фаговой ДНК. Упаковка осуществляется через канал портового белка за счет энергии АТФ. Здесь же важно отметить, что процесс упаковки *in vivo* является триггером расширения проголовки. Обычно расширение происходит, когда упаковано около 1/3 генома. При расширении субъединицы оболочки капсида поворачиваются, претерпевая лишь небольшие изменения в третичной структуре, и формируют более прочную укладку. При этом диаметр проголовки увеличивается примерно в 1,4 раза, а объем - примерно в 2 раза [32].

Икосаэдрическая форма капсида делается более четко выраженной, а стенка расширенной проголовки становится тоньше, хотя ее устойчивость к различным физическим и химическим воздействиям резко возрастает.

У фага НК97 именно в момент расширения проголовки происходит продевание полипептидной цепи субъединиц главного белка головки через петли соседних субъединиц и ковалентное перешивание, что создает структуру, похожую на кольчугу (chainmail structure). Поэтому капсиды фага НК97, а также их искусственные аналоги, получаемые из рекомбинантного белка головки gp5, очень прочны и для их разборки требуется использовать гидролиз протеазами. Эти свойства создают ряд интересных возможностей для применения белка капсида фага НК97 в бионанотехнологиях [32].

Процесс расширения проголовки напоминает сборку конструкций, элементы которых сначала устанавливаются под углом, а потом с усилием приводят в окончательное положение «в распор». Так, например, собирают многие типы складных лодок, по похожему принципу открывается купол зонтика. Однако, в отличие от раскрытия зонтика, процесс расширения проголовки является энергетически выгодным. Если *in vivo* его запускает, по-видимому, давление упакованной ДНК, то *in vitro* расширение можно вызвать небольшим нагреванием препарата процессированных проголовок. Оно может происходить и спонтанно.

После расширения на поверхности капсида образуются сайты для присоединения декорирующих белков головки. Их присоединение обычно не связано с другими процессами, поэтому декорирующие белки могут быть присоединены и позднее, к уже собранным частицам, в том числе *in vitro* [32, 33].

После завершения упаковки ДНК к головке присоединяется белок, завершающий головку (head completion protein, иногда называемый привратником (gate keeper protein)). Этот белок образует додекамерное кольцо снизу портового белка. Его присоединение завершает морфогенез головки и препятствует самопроизвольному выходу ДНК.

**Упаковка ДНК хвостатых бактериофагов.** Морфогенетический процесс, при котором ДНК упаковывается в АТФ-зависимой реакции в предварительно собранные прокапсиды, является общим свойством всех хвостатых бактериофагов, а также герпес-вирусов животных, которые, как считается, имеют с хвостатыми фагами отдаленного общего предка. Таким образом, процесс упаковки вирусной ДНК является очень древним [25]. Синтез ДНК большинства фагов приводит к образованию конкатемерных молекул, состоящих из нескольких копий геномной последовательности вируса, объединенных «голова к хвосту». Поэтому упаковка сопряжена с разрезанием конкатемера на индивидуальные геномные молекулы. Различные способы этого разрезания (стратегии упаковки) приводят к образованию различных вариантов организации вирионной ДНК [34].

Процесс упаковки катализируется белковым комплексом - терминазой. Это название связано с тем, что первые найденные нульмутанты по гену терминазы в непремиссивных условиях формировали пустые головки, то есть имели незаконченный, «нетерминированный» процесс сборки капсидов. Терминазы являются неструктурными (то есть не включаемыми в состав вириона) морфогенетическими белками. У подавляющего большинства фагов они состоят из субъединиц двух типов, большой и малой. Малая субъединица (TerS) терминазы обычно имеет размер 130-250 а.к. и обеспечивает узнавание сайта начала упаковки, в то время как большая субъединица (TerL) - белок размером 500-700 а.к. является АТФазой и нуклеазой, вносящей иницирующий и терминирующий разрывы в конкатемерную ДНК. В искусственных системах упаковки *in vitro* некоторых фагов процесс можно осуществить с помощью только большой субъединицы, хотя это и приводит к сильному снижению эффективности.

И TerS, и TerL обычно формируют олигомеры в виде колец. Олигомер малой субъединицы (часто октамер или додекамер) связывается с ДНК-субстратом (в редких случаях распознавании сайта упаковки могут участвовать и другие белки; так, у фага T7, по-видимому, вирусная РНКП gp1 в комплексе с gp3.5 при транскрипции с конкатемера делает паузу в районе правого конца генома и рекрутирует упаковочный комплекс, который начинает упаковку ДНК справа налево, против направления транскрипции) [35].

При этом ДНК не продевается через канал TerS, но, возможно, оборачивается вокруг него. Связавшись с ДНК, олигомер TerS рекрутирует молекулу большой субъединицы терминазы TerL, эндонуклеазная активность которой служит для внесения иницирующего разрыва. У фага T4 в инициации участвуют сразу два додекамера малой субъединицы gp16. Они связываются с ДНК и взаимодействуют между собой и после этого рекрутируют большую субъединицу gp17. В результате образуется два комплекса ДНК - (gp16)<sub>2</sub>gp17, способные связываться с проголовкой [25]. После взаимодействия с портовым белком проголовки комплекс присоединяет еще 4

молекулы большой субъединицы терминазы gp17, которые образуют пентамерное кольцо вокруг нити ДНК. На этом формирование упаковочного комплекса завершается.

По-видимому, участие в инициации упаковки одновременно двух додекамеров gp16 связано с тем, что у T4, в отличие от большинства других фагов, сайт начала упаковки и ее направление относительно генома выбираются практически произвольно (не детерминированы специфическими последовательностями). Поэтому один иницирующий разрыв можно использовать для формирования сразу двух упаковочных комплексов. Организация упаковочного аппарата в виде кольцевой пентамерной структуры, присоединенной снизу к додекамерному поральному белку проголовки, является общей чертой всех изученных в этом отношении хвостатых бактериофагов. У подовируса *Vacillus subtilis* φ29 для формирования комплекса необходимо еще кольцо из пяти молекул так называемой упаковочной РНК (pRNA), которое присоединяется снизу к поральному белку. У других фагов РНК в состав упаковочного комплекса не входит.

Сформированный комплекс проталкивает ДНК внутрь проголовки за счет энергии гидролиза АТФ, расходуя одну молекулу АТФ на 2 п.н. упаковываемой ДНК. Интересно, что расход АТФ не зависит от того, какое количество ДНК уже упаковано (и, соответственно, насколько сильно преодолеваемое сопротивление) [25]. Относительно механизма генерации силы, проталкивающей ДНК, идут активные дискуссии. В настоящее время наиболее убедительно описывает имеющиеся структурные и экспериментальные данные модель «радиального поршневого мотора», в соответствии с которой ДНК-связывающие домены молекул большой субъединицы терминазы поочередно присоединяются к ДНК, подтягиваются примерно на 0,7 нм (две пары нуклеотидов) вверх и освобождают ДНК. Различные фазы процесса сопровождаются связыванием АТФ, его гидролизом и высвобождением АДФ и фосфата. При этом все перемещения доменов обусловлены электростатическими силами, возникающими вследствие сближения или удаления разноименно заряженных аминокислотных остатков, которое происходит вследствие связывания АТФ или диссоциации продуктов его гидролиза. После того как объем головки оказывается заполнен, эндонуклеазная активность большой субъединицы терминазы вносит в ДНК терминирующий разрыв [36].

Точный механизм, который позволяет упаковочному мотору чувствовать заполнение головки, пока не известен, однако мутации, влияющие на плотность упаковки ДНК некоторых фагов (например, SPP1), обнаруживаются в поральном белке и затрагивают аминокислотные остатки, экспонированные в полость канала. Необходимость заполнения капсида для успешного завершения упаковки (headful mechanism) лежит в основе стратегий, приводящих к формированию протяженной концевой избыточности (концевых повторов) вирионной ДНК и/или к кольцевым перестановкам. Однако даже у фагов, имеющих строго определенные концы вирионной ДНК, таких как фаг лямбда, большие делеции, пусть даже несущественных для литического размножения генов, вызывают сильное снижение жизнеспособности вируса, поскольку у мутантов при достижении упаковочным комплексом *cos*-сайта, определяющего границы соседних копий генома на конкатемере, проголовка еще не заполнена, что сильно подавляет внесение терминирующего разрыва.

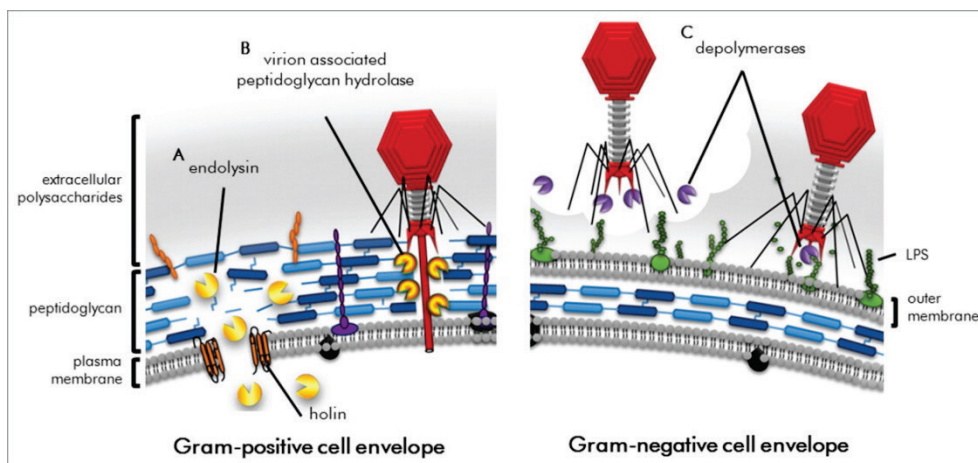
**Cos-сайты** *Cos*-сайт бактериофага λ представляет собой длинный сегмент ≈200 bp, который необходим как для иницирования, так и для завершения упаковки генома из конкатемерной ДНК [36]. Участок, где терминаза вводит ступенчатые ники для генерации связных концов, называется *cosN*. Ранее считалось, что наличие *cosN* сайта достаточно для упаковки ДНК [37]. Однако более поздние исследования показали, что *cos*-сайт является сложным и состоит из трех и, возможно, четырех различных подсайтов. Как инициация, так и прекращение упаковки требуют дуплексного никирования на *cosN*-сайте [38, 39]. Кроме того, эффективная инициализация требует наличия дочернего сайта *cosB*, который находится после *cosN* сайта. Терминация требует наличия *cosQ*, дочернего сайта, который расположен перед *cosN* [40, 41]. Последовательность I2 расположена между *cosN* и *cosB*, также играет особую роль в эффективной упаковке ДНК [36]. Таким образом, полная *cos*-последовательность состоит из нескольких подсайтов, каждый из которых играет определенную роль в распознавании, обработке и упаковке вирусной ДНК.

Сайт *cosN* - участвует в разрезании цепи ДНК за счет активности терминазы. Сайт *cosB* удерживает терминазу, пока она отсекает и разделяет цепи [37]. Сайт *cosQ* следующей космиды (поскольку репликация катящегося круга часто приводит к линейным конкатемерам) удерживается терминазой после того, как предыдущая космида была упакована, чтобы предотвратить деградацию клеточными ДНКазами [41].

**Фаготерапия.** Вирусная фаготерапия или фаготерапия - терапевтическое использование бактериофагов для лечения патогенных бактериальных инфекций. Фаговые ферменты – основной фактор воздействия на бактерию-мишень. Фаговые лизины - это гидролитические ферменты, которые разрушают пептидогликаны клеточной стенки, способствуя высвобождению фага при уничтожении бактерий. Лизины обладают эффективностью по отношению к специфическим пептидогликанам в клеточной стенке, их специфичность зависит от вида или рода, эта характеристика является существенной. Многие из сконструированных лизинов обладают лучшей антимикробной активностью, чем большинство антибиотиков ранее и не обладали [42].

Эндолизины - это ферменты, используемые бактериофагами в конце их цикла репликации для разрушения пептидогликана бактерии-хозяина изнутри, что приводит к лизису клеток и высвобождению вирионов-потомков. Из-за отсутствия внешней мембраны в клеточной стенке грамположительных бактерий эндолизины могут получать доступ к пептидогликану и уничтожать эти организмы при наружном применении, что делает их интересными кандидатами в противомикробные препараты, особенно в свете растущей устойчивости бактерий





**Рисунок 4.** Схема лизиса грамположительных бактериальных клеток экзогенно введенными эндолизинами. Эндолизин расщепляет связи внутри пептидогликана, и высокое внутреннее давление клетки выталкивает плазматическую мембрану, что приводит к осмосису (лизису извне). Обобщенная структура пептидогликана иллюстрирует участки расщепления по типам эндолизина: гликоцидазы (а именно глюкозаминидаза и мурамидазы), амидазы и эндопептидазы [43, 44]

к лекарственным средствам. В данное время рассматривается модульная структура этих ферментов, в которой разделены функции связывания с клеточной стенкой и каталитические функции, а также их механизм действия, литическая активность и потенциал в качестве противомикробных средств [43].

Продолжается дальнейший скрининг новых эндолизинов или разработка ферментов на основе эндолизина с переносчиками через внешнюю мембрану, что, как ожидается, расширит применение эндолизинов в качестве терапевтических средств как для здоровья человека, так и для здоровья животных. Тем не менее, завершающиеся клинические испытания двух стафилолитических эндолизинов в ближайшее время смогут обеспечить необходимую эффективность и безопасность этого класса противомикробных средств для борьбы с бактериями с множественной лекарственной устойчивостью у пациентов (рис. 4) [43,44].

#### **Заключение.**

Жизненный цикл бактериофагов состоит из двух стадий: литической стадии, когда фаги размножаются внутри бактерий и лизируют бактерии, и лизогенной стадии, когда фаг находится в стационарной стадии, где размножение фагов отсутствует. Понимание жизненного цикла фагов имеет фундаментальное значение для понимания преимуществ фагов в качестве средств биологического контроля и того, как работают сконструированные фаги.

Бактериофаги являются альтернативой в конкуренции с противомикробными препаратами, поскольку фаги обладают такими преимуществами, как очень высокая специфичность к бактерии-мишени, способность к долгосрочному воздействию, они активны в отношении делящихся или не делящихся бактериальных клеток, обеспечивают эффективное уничтожение бактериальных биопленок и являются способными транспортерами для адресной доставки нуклеиновых кислот.

В эпоху растущего числа патогенов с множественной лекарственной устойчивостью и нехватки новых антибиотиков, растет потребность в обновлении старых и открытии новых противомикробных препаратов для лечения бактериальных инфекций. В этом контексте, полученные доклинические и клинические данные убедительно доказывают полезность фаговых эндолизинов против целого ряда преимущественно грамположительных бактериальных патогенов, причем количество эндолизинов, которые могут воздействовать и на грамотрицательные патогены, также растет.

Особое внимание уделяется молекулярной инженерии как средству оптимизации эндолизинов для конкретных применений, создаются новые разработки, которые могут сделать эти белки активными в отношении грамотрицательных и внутриклеточных патогенов, и обобщаются самые последние применения эндолизинов в области медицины, безопасности пищевых продуктов, сельского хозяйства и биотехнологии.

Специфичность бактериофагов уникальна. Бактериофаги селективно заражают специфические бактерии специализированными рецепторными молекулами, расположенными в клеточной стенке или мембране, такими как липополисахариды, тейхоевые кислоты и порины. Сконструированные фаги, понимание биологии бактериофагов и разработка новых инженерных инструментов для модификации ДНК позволяют разрабатывать новые стратегии уничтожения патогенов

Кроме того, особая способность бактериофага вводить нуклеиновые кислоты была использована и для создания совершенно новых стратегий, таких как введение генов для обеспечения бактериостаза, синтеза вредных соединений или вставки генов для восстановления устойчивости к антибиотикам.

Развитие методов геной инженерии в сочетании с нанотехнологиями приводит к пониманию того, что кроме применения в антимикробной терапии, фаги также могут быть использованы как транспортные системы для адресной доставки препаратов, таких как вакцины, или же могут быть использованы для наносборки новых

макромолекулярных структур и наноконструкций, так как сами фаги, их фрагменты и компоненты являются нанообъектами и функционирующими наномашинками, освоение процесса сборки которых позволяет развивать принципиально новые подходы, используя преимущества специфичности фагов.

С другой стороны, большой объем капсида фага Т4 позволяет осуществлять одновременную доставку нескольких генов и белков в клетку человека. В настоящее время уже подтверждена вместимость вектора на основе бактериофага Т4, в который удалось упаковать ген дистрофина. После этого было показано, что груз вектора можно использовать и для редактирования генома. С этой целью был выбран терапевтически значимый сайт – ген бета-гемоглобина (HBB) на 11-й хромосоме человека. Работа проведена на клеточной линии HEK293T (эмбриональная почка человека). Конструкция, представляющая собой комплекс Cas9-HBB гидРНК, успешно выполнила редактирование 20–25% клеток. Также был получен вектор, с помощью которого можно выполнить одновременное редактирование в двух разных, не связанных между собой участках генома [45].

В подобного рода исследованиях был продемонстрирован широкий спектр молекул, который может быть включен в искусственный вирусный вектор (ИВВ). К ним относятся белки размером от 27 до 516 кДа, нуклеиновые кислоты от 100 п.н. до 20–40 т.п.н., РНК-белковые, ДНК-белковые, белок-белковые комплексы, что означает новую эру фаговой инженерии и молекулярного конструирования на наномасштабах для применения бактериофагов, и разработки новых генно- и нано- инженерных инструментов и методов для медицины, биотехнологии, фармацевтики, безопасности пищевых продуктов, сельского хозяйства.

#### Список литературы / References:

1. Twort F.W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 1915, vol. 186, no. 4814, pp. 1241-1243.
2. d'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. *CR Acad. Sci.*, 1917, Paris, vol. 165, pp. 373-375.
3. Letarov A.V., Golomidova A.K., Tarasyan K.K. Ecological basis for rational phage therapy. *Acta Naturae*, 2010, vol. 2, no. 1, pp. 60-72.
4. Summers W.C. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2012, vol. 2, no. 2, pp. 130-133, doi: 10.4161/bact.20757.
5. Calendar R. *The bacteriophages*. Springer Science & Business Media., 2012, vol. 1, 596 p.
6. Duckworth D.H. History and basic properties of bacterial viruses. In *Phage ecology*, 1987, Singapore: John Wiley and Sons, pp. 1-44.
7. Weinbauer M.G. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2004, vol. 28, no. 2, pp. 127-181, doi: 10.1016/j.femsre.2003.08.001.
8. Ackermann H.W. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.*, 2007, vol. 152, no. 2, pp. 227-243, doi: 10.1007/s00705-006-0849-1.
9. Lwoff A. Lysogeny. *Bacterid. Rev.*, 1953, vol. 17, pp. 269-237.
10. Lederberg E.M. Lysogenicity in *Escherichia coli* strain K-12, *Microbial Genetics Bulletin*, 1950, vol. 1.
11. Тощкий В.Н. *Генетика*. Одесса: Астропринт, 2002 [Totsky V.N. *Genetics*. Odessa: Astroprint, 2002 (In Russ.)].
12. Пташне М. *Переключение генов: Регуляция генной активности и фаг лямбда*. Москва: Мир, 1988 [Ptashne M. *Gene switching: Regulation of gene activity and the lambda phage*. Moscow: Mir, 1988 (In Russ.)].
13. Fokine A., Chipman P.R., Leiman, P.G., Mesyanzhinov V.V., Rao V.B., Rossmann M.G. Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, vol. 101, pp. 6003-6008.
14. Caspar D.L., Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1962, p. 27.
15. Driedonks R.A., Engel A., Ten-Heggeler B., Driell V. Gene 20 product of bacteriophage T4 its purification and structure. *J. Mol. Biol.*, vol. 152, pp. 641-662.
16. Fokine A., Leiman P.G., Shneider M.M., Ahvazi B., Boeshans K.M., Steven A.C., Black L.W., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97 point to a common ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, vol. 102, pp. 7163-7168.
17. Rao V.B., Black L.W. Structure and assembly of bacteriophage T4 head. *Virol. J.*, 2010, vol. 7.
18. Ishii T., Yanagida M. The two dispensable structural proteins (soc and hoc) of the T4 phage capsid; their purification and properties, isolation and characterization of the defective mutants, and their binding with the defective heads in vitro. *J. Mol. Biol.*, 1977, vol. 109.
19. Ishii T., Yamaguchi Y., Yanagida M. Binding of the structural protein soc to the head shell of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, 1978, vol. 120, pp. 533-544.
20. Cerritelli M.E., Cheng N., Rosenberg A.H., McPherson C.E., Booy F.P., and Steven A.C. Encapsidated conformation of bacteriophage T7 DNA. *Cell*, 1997, vol. 91, pp. 271-280.
21. Bair C.L., Black L.W. A type IV modification dependent restriction nuclease that targets glucosylated hydroxymethyl cytosine modified DNAs. *J. Mol. Biol.*, 2007, vol. 366, pp. 768-778.
22. Bair C.L., Rifat D., Black L.W. Exclusion of glucosyl- hydroxymethylcytosine DNA containing bacteriophages is overcome by the injected protein inhibitor IPI\*. *J. Mol. Biol.*, 2007, vol. 366, pp. 779-789.
23. Wang G.R., Vianelli A., Goldberg, E.B. Bacteriophage T4 self- assembly: in vitro reconstitution of recombinant gp2 into infectious phage. *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, pp. 672-679.

24. Yu T.-Y., Schaefer J. REDOR NMR characterization of DNA packaging in bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, 2008, vol. 382, pp. 1031-1042.
25. Letarov A. V. *Modern Concepts of Bacteriophage Biology*. DeLi, Moscow, 2019.
26. Fokine A., Rossmann M.G. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*, 2014, vol. 4, e28281.
27. Leiman P.G., Arisaka F., van Raaij M.J., Kostyuchenko V.A., Aksyuk A.A., Kanamaru S., Rossmann M.G. Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. *Virol. J.*, 2010, vol. 7, pp. 355, doi: 10.1186/1743-422X-7-355.
28. Young R. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J. Microbiol.*, 2014, vol. 52, pp. 243-258, doi: 10.1007/s12275-014-4087-z.
29. Chaikeratisak V., Nguyen K., Egan M.E., Erb M.L., Vavilina A., Pogliano J. The Phage Nucleus and Tubulin Spindle Are Conserved among Large Pseudomonas Phages. *Cell Rep.*, 2017, vol. 20, pp. 1563-1571, doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.064.
30. Sun S., Kondabagil K., Gentz P.M., Rossmann M.G., Rao V.B. The structure of the ATPase that powers DNA packaging into bacteriophage T4 procapsids. *Mol. Cell.*, 2007, vol. 25, pp. 943-949.
31. Taylor N.M.I., van Raaij M.J., Leiman P.G. Contractile injection systems of bacteriophages and related systems. *Mol. Microbiol.*, 2018, vol. 108, pp. 6-15, doi: 10.1111/mmi.13921.
32. Taylor N.M., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R.C., Shneider M.M., Browning C., Goldie K.N., Stahlberg H., Leiman P.G. Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. *Nature*, 2016, vol. 533, pp. 346-52, doi: 10.1038/nature17971. PubMed PMID: 27193680.
33. Davidson A.R., Cardarelli L., Pell L.G., Radford D.R., Maxwell K.L. Long noncontractile tail machines of bacteriophages. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012, vol. 726, pp. 115-142, doi: 10.1007/978-1-4614-0980-9\_6.
34. Casjens S.R., Molineux I.J. Short noncontractile tail machines: adsorption and DNA delivery by podoviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012, vol. 726, pp. 143-179, doi: 10.1007/978-1-4614-0980-9\_7.
35. Duda R.L., Teschke C.M. The amazing HK97 fold: versatile results of modest differences. *Curr. Opin. Virol.*, 2019, vol. 36, pp. 9-16, doi: 10.1016/j.coviro.2019.02.001.
36. Cue D., Feiss M. Bacteriophage  $\lambda$  DNA packaging: DNA site requirements for termination and processivity. *J. Mol Biol.*, 2001, vol. 311, pp. 233-240.
37. Feiss M., Kobayashi I., Widner W. Separate sites for binding and nicking of bacteriophage lambda DNA by terminase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, vol. 80, no. 4, pp. 955-959.
38. Feiss M., Widner W., Miller G. et al. Structure of the bacteriophage lambda cohesive end site: Location of the sites of terminase binding (cosB) and nicking (cosN). *Gene.*, 1983, vol. 24, no. 2-3, pp. 207-18.
39. Hohn B. DNA sequences necessary for packaging of bacteriophage  $\lambda$  DNA. *Proc Nat Acad Sci USA.*, 1983, vol. 80, pp. 7456-7460.
40. Miwa T., Matsubara K. Lambda phage DNA sequences affecting the packaging process. *Gene.*, 1983, vol. 24, pp. 199-206.
41. Cue D., Feiss M. A site required for termination of packaging of the phage lambda chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1993, vol. 90, no. 20, pp. 9290-9294.
42. Laglaguano J.C., Cordova A.V. Bacteriophages applications in agriculture. *Bionatura Conference Series, Bionatura Latin American Journal of Biotechnology and Life Sciences*, 2019, vol 2, no. 1, doi: 10.21931/RB/CS/2019.02.01.24.
43. Roach D.R., Donovan D.M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*, 2015, vol. 5, no. 3, doi: 10.1080/21597081.2015.1062590
44. Schmelcher M., Donovan D.M., Loessner M.J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.*, 2012, vol. 7, no. 10, pp. 1147-1171.
45. Zhu J. et al. Design of bacteriophage T4-based artificial viral vectors for human genome remodeling. *Nature Communications*, 2023, vol. 14, p. 2928, doi: 10.1038/s41467-023-38364-1.

**SELF-ORGANIZATION IN VIRUSES FORMATION: THE NANO-PROCESS OF ASSEMBLING HEADS (CAPSIDS) AND LAYING DNA ON THE EXAMPLE OF TAILED BACTERIOPHAGES (LAMBDA, T4)****Botin A.S.<sup>1,2</sup>, Pulin A.M.<sup>1</sup>, Gavrilov A.V.<sup>1</sup>, Popova T.S.<sup>2</sup>, Cordova A.V.<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Peoples' Friendship University of Russia n.a. P. Lumumba (RUDN)  
*Miklukho-Maklaya str., 6, Moscow, 117198, Russia; e-mail: botin-as@rudn.ru*<sup>2</sup> N.V. Sklifosovsky Institute of Emergency Medicine  
*Bolshaya Sukharevskaya sq., 3, Moscow, 129090, Russia; e-mail: BotinAS@sklif.mos.ru*  
Received 26.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0651

**Abstract.** The relevance of the problem. The widespread and uncontrolled use of antibacterial drugs not only in medicine, but also in agriculture, animal husbandry, and the food industry has led to the spread of multi-resistant strains resistant to the most common antibacterial drugs. In search of alternative strategies for the prevention and control of bacterial infection, attention is increasingly being paid to bacteriophage (phage) therapy. With a wide range of genetic engineering capabilities, these bacterial viruses can be modified to achieve precise control and detection of bacteria and thus serve as a new source of antimicrobial agents. In addition to being used in antimicrobial therapy, phages can also be used as transport systems for drug delivery, as vaccines, or can be used for nanosembly of new materials, since phages themselves, their fragments and components are nanoobjects and functioning nanomachines, the assembly process of which is extremely relevant. The purpose of this article is: to analyze and summarize the most important information on the topic of bacteriophages, methods of their determination and effective transformation in modern science, to evaluate the achievements of modern research in the process of assembling heads (capsids) and laying intracapsid DNA in caudate bacteriophages (phage lambda and phage T4), the production of genetically modified phages and a review of the main prospects for the development of this direction.

**Key words:** *viruses, bacteriophages, self-assembly of capsids, DNA stacking, nanoobjects, phage therapy.*