

Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii

Jerzy Kamiński
Nr albumu: 362818

Wstępna charakterystyka
bakteriofaga *Serratia* ϕ OS10.

Initial characteristics of *Serratia* ϕ OS10
bacteriophage.

Praca magisterska
na kierunku Biotechnologia
w zakresie Mikrobiologii Stosowanej / Wirusologii

Praca wykonana pod kierunkiem
dr hab. Moniki Radlińskiej
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa, październik 2019

Oświadczenie kierującego pracą

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie tytułu zawodowego.

Data

Podpis kierującego pracą

Oświadczenie autora (autorów) pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca dyplomowa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem tytułu zawodowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora (autorów) pracy

Streszczenie

Celem niniejszej pracy była wstępna charakterystyka bakteriofaga łagodnego *Serratia* φOS10 oraz analiza bioinformatyczna jego genomu. Wirusowe DNA wyizolowano, poddano analizie restrykcyjnej oraz sekwencjonowaniu. Otrzymane wyniki sekwencjonowania poddano analizie bioinformatycznej. Określono sekwencję lepkich końców wygenerowanych przez enzym terminazę w miejscu *cos*. Ustalono szybkość adsorpcji faga do komórek gospodarza. Określono także czas latencji faga oraz wielkość jego plonu.

Abstract

The aim of this study was the initial characterization of the temperate *Serratia* bacteriophage φOS10 and bioinformatic analysis of its genome. The viral DNA was isolated, examined by restriction analysis and sequencing. The obtained sequencing results were examined by bioinformatic analysis. The sequence of the cohesive ends generated by the enzyme terminase at the *cos* site was determined. The rate of phage adsorption to host cells was determined. The latent period of φOS10 and its burst size were also determined.

Słowa kluczowe

Serratia, φOS10, bakteriofag łagodny, *Myoviridae*, *Caudovirales*, Złoty Stok, sekwencja *cos*, MOI, plateau

Key words

Serratia, φOS10, temperate bacteriophage, *Myoviridae*, *Caudovirales*, Złoty Stok, *cos* sequence, MOI, plateau

Dziedzina pracy (kody wg programu Socrates-Erasmus)

13.4 – Biotechnologia

SPIS TREŚCI

Strona tytułowa	1
<i>Oświadczenie autora i promotora</i>	2
Streszczenie	3
Spis treści	4
Podziękowania	7
1. Wstęp	8
1.1 Informacje ogólne o wirusach	8
1.1.1 Wirusy infekujące bakterie – bakteriofagi	11
1.1.2 Klasyfikacja i taksonomia wirusów	11
1.2 Budowa wirionów bakteriofagów z rzędu <i>Caudovirales</i>	14
1.3 Modułarna struktura genomów bakteriofagów	16
1.4 Opis cyklu infekcyjnego bakteriofagów z rzędu <i>Caudovirales</i>	17
1.5 Cykl lizogeny, stan pseudolizogenii, infekcja chroniczna	21
1.5.1 Cykl lizogeny	21
1.5.2 Stan pseudolizogenii	24
1.5.3 Infekcja chroniczna	24
1.5.4 Wpływ sekwencji profagowych na funkcjonowanie gospodarza	24
1.6 Analiza bioinformatyczna genomów fagowych	26
1.6.1 RAST	27
1.6.2 Artemis	27
1.6.3 BLAST	28
1.6.4 HMMER	29
1.6.5 Virfam	29
1.6.6. Serial Cloner	30
1.6.7. ARAGORN	30
1.7 Bakterie rodzaju <i>Serratia</i> i infekujące je bakteriofagi	31
1.8 Pochodzenie szczepów psychrofilnych <i>Serratia</i> spp. badanych w tej pracy	33
2. Cel	35
3. Materiały	36
3.1 Próbką badana	36
3.2 Szczepy bakteryjne	36
3.3 DNA	36

3.3.1 Startery do reakcji PCR.....	36
3.3.2 Wykorzystany wektor plazmidowy.....	36
3.3.3 Marker wielkości.....	37
3.4 Podłoża bakteryjne	37
3.5 Bufory i roztwory	37
3.5.1 Bufory i odczynniki do elektroforezy DNA.....	37
3.5.2 Bufor SM.....	37
3.5.3 Bufory do przygotowywania komórek kompetentnych metodą rubidowo-wapniową ...	38
3.5.4 Bufor STE	38
3.6 Enzymy.....	38
3.7 Inne.....	38
3.8 Zestawy	39
3.9 Aparatura.....	39
3.10 Oprogramowanie.....	40
4. Metody	41
4.1 Określanie miana zawiesiny fagowej metodą nakropień i metodą testu pełnoszalkowego	41
4.2 Izolacja cząstek fagowych.....	41
4.3 Izolacja DNA fagowego.....	42
4.4 Trawienia enzymami restrykcyjnymi.....	42
4.5 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	43
4.6 Reizolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego	43
4.7 Wypełnianie jednoniciowych końców DNA z użyciem Fragmentu Klenowa	43
4.8 Wypełnianie jednoniciowych końców DNA z użyciem Polimerazy faga T4.....	44
4.9 Reakcja ligacji.....	44
4.10 Pomiar gęstości optycznej hodowli płynnej.....	44
4.11 Przygotowanie komórek kompetentnych metodą rubidowo-wapniową	44
4.12 Transformacja DNA do bakterii chemokompetentnych	45
4.13 Izolacja plazmidowego DNA metodą minilizy alkalicznej.....	45
4.14 Reakcja PCR	46
4.15 Przygotowanie matrycy do kolonijnego PCR.....	47
4.16 Sekwencjonowanie.....	48
4.17 Analiza bioinformatyczna	48
4.17.1 Identyfikacja otwartych ramek odczytu	48
4.17.2 Adnotacja otwartych ramek odczytu.....	48
4.17.3 Przyporządkowanie taksonomiczne bakteriofaga do rodziny.....	49
4.17.4 Wirtualne cięcie genomu bakteriofaga enzymami restrykcyjnymi.....	49
4.17.5 Wyszukiwanie genów kodujących tRNA	49

4.18 Badanie kinetyki adsorpcji bakteriofaga	50
4.19 Badanie jednego etapu replikacji (One-Step Growth) faga ϕ OS10	51
4.19.1 Określenie miana hodowli gospodarza dla $OD_{600} = 0,5$	51
4.19.2 Określenie wartości MOI i odsetku jednokrotnych infekcji	51
4.19.3 Określenie czasu latencji i plonu fagowego	53
5. Wyniki i dyskusja	56
5.1 Uzyskanie czystych kultur fagowych z próbki środowiskowej metodą szalek dwuwarstwowych i określenie ich morfologii	56
5.2 Analiza restrykcyjna izolatów DNA z badanych czystych kultur fagowych.....	57
5.3 Analiza bioinformatyczna	58
5.3.1 Analiza genomu bakteriofaga ϕ OS10	59
5.3.2 Adnotacja otwartych ramek odczytu w genomie bakteriofaga ϕ OS10.....	67
5.3.3 Określenie przynależności taksonomicznej	76
5.4 Określenie sekwencji <i>cos</i>	77
5.5 Weryfikacja zdolności do wejścia w stan lizogenii ϕ OS10	79
5.6 Badanie kinetyki adsorpcji bakteriofaga ϕ OS10 do gospodarza	80
5.7 Badanie jednego etapu replikacji (ang. One-Step Growth) faga ϕ OS10	82
5.7.1 Badania pilotażowe	82
5.7.2 Badanie czasu latencji i wielkości wyrzutu fagowego	83
5.8 Proponowane kierunki dalszych badań	89
6. Podsumowanie	90
7. Bibliografia	91

Podziękowania

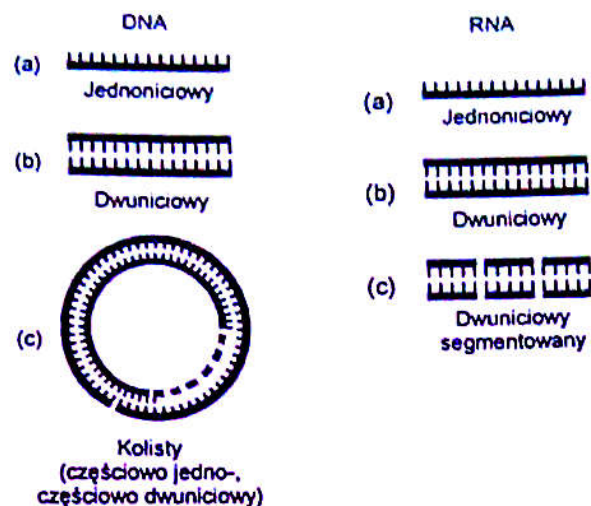
W tym miejscu chciałbym podziękować wszystkim osobom, które wspierały mnie podczas pisania mojej pracy magisterskiej. W pierwszej kolejności chciałbym złożyć serdeczne podziękowania mojej Pani Promotor dr. hab. Monice Radlińskiej, która zawsze wspierała mnie merytorycznie i uczyła laboratoryjnego fachu już na studiach licencjackich: począwszy od kursu Mikrobiologii Ogólnej, następnie podczas zajęć z Biologii Molekularnej, Wirusologii Molekularnej i towarzyszyła aż do wypromowania napisanej przeze mnie pracy licencjackiej; później zaś podczas studiów magisterskich nauczyła niezbędnych w moich czynnościach technik badawczych, recenzowała prezentacje wygłaszane podczas seminariów magisterskich i na bieżąco, dokładnie oraz profesjonalnie recenzowała pisaną przeze mnie pracę dyplomową, okazując przy tym dużą cierpliwość w trudnych momentach. Jestem Jej bardzo wdzięczny, że zaufała mi jako członkowi Jej zespołu badawczego, że uwierzyła w moje osobiste możliwości oraz mimo występujących u mnie wrodzonych trudności komunikacyjnych szukała konstruktywnych rozwiązań, dzięki czemu na pierwszym planie pozostawały przede wszystkim: wytrwała praca studenta, jego samodzielność i gotowość wsparcia przez niego reszty zespołu – gdy była ku temu potrzeba. Składam podziękowania pozostałym członkom zespołu, w którym miałem okazję działać przez minione 2 lata – w szczególności Kasi Bujak, która w wolnych chwilach doradzała oraz inspirowała swoim optymizmem. Dziękuję Piotrowi Golcowi za porady oraz objaśnienia zgłębionych przez siebie technik badania kinetyki adsorpcji oraz badania cyklu replikacji. Dziękuję bliskim spoza środowiska akademickiego – mojej rodzinie za wsparcie duchowe oraz przyjaciółom z harcerstwa za zainteresowanie tematyką prowadzonych przeze mnie badań.

Dzięki Wam wszystkim, którym dedykuję niniejszą pracę magisterską, mogę z satysfakcją powiedzieć, iż było warto!

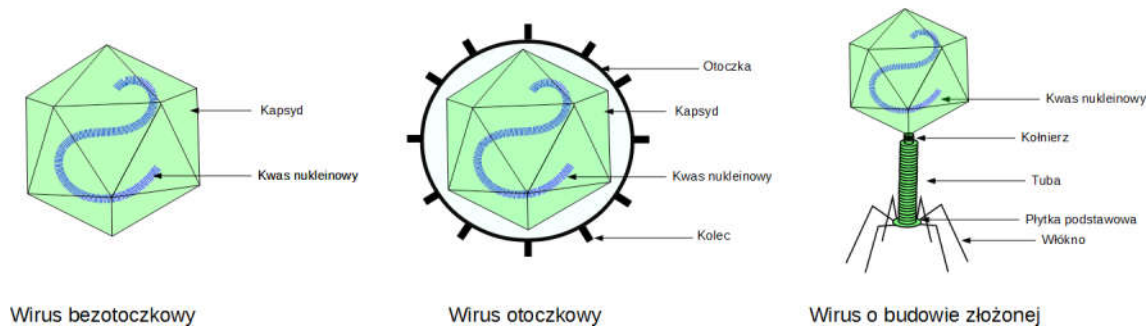
1. Wstęp

1.1 Informacje ogólne o wirusach

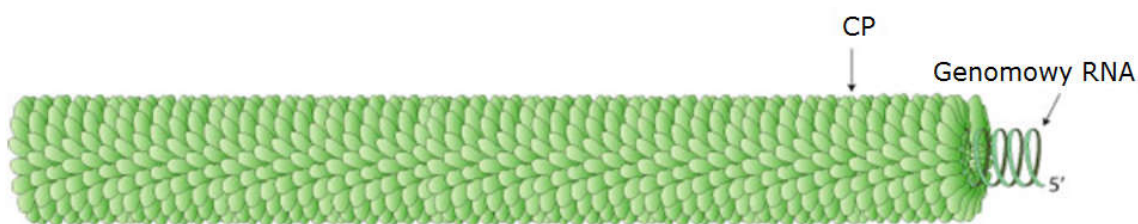
Wirusy to jednostki biologiczne reprodukcujące się w komórkach organizmów żywych. Ich istnienie jest nierozłącznie związane z infekowanym organizmem (gospodarzem). Przyjmuje się, że każdy organizm może ulec infekcji wirusowej [Baj, 2018]. Są one obligatoryjnymi pasożytami aparatu translacyjnego – nie posiadają własnych rybosomów, więc w produkcji ich białek zawsze uczestniczą rybosomy gospodarza [Mohr i in., 2007]. W budowie wszystkich wirusów wyróżnić można cząsteczkę genomową w postaci jednoniciowego lub dwuniciowego kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. *deoxyribonucleic acid, DNA*) kolistego lub liniowego lub kwasu rybonukleinowego (ang. *ribonucleic acid, RNA*) jednoniciowego, dwuniciowego, albo dwuniciowego segmentowanego (Rycina 1). U większości wirusów genom osłonięty jest białkowym kapsydem (niektóre wirusy grzybowe utraciły geny kodujące białka kapsydu), zaś niektóre z wirusów posiadających kapsyd zawierają też osłonkę lipidową. Kapsydy wirusów mogą mieć różną strukturę, jej najpowszechniejszymi formami są: struktura ikozaedralna, helikalna i złożona (Ryciny 2 i 3).



Rycina 1. Genomy wirusów DNA i RNA [Collier & Oxford, 2001].



Rycina 2. Budowa cząstki wirusowej [na podstawie: Baj, 2018].



Rycina 3. Wirus o budowie helikalnej [viralzone.expasy.org, 2019, zmienione].

Nie ulega wątpliwości, iż wirusy w znaczący sposób wpływają na ewolucję życia na Ziemi. Dzieje się tak, gdyż między wirusami a ich gospodarzami ma miejsce nieustanny wyścig zbrojeń oraz ze względu na fakt, że wirusy są jednym z czynników horyzontalnego transferu genów, co wyjaśniono w dalszych rozdziałach pracy. Wspomniany powyżej wyścig zbrojeń jest zjawiskiem polegającym na ciągłych zmianach zachodzących zarówno u wirusa, jak i u infekowanego przez niego gospodarza: presja selekcyjna powoduje osiągnięcie większego sukcesu reprodukcyjnego przez gospodarza z takimi mutacjami, za sprawą których jego nowy fenotyp utrudnia lub wręcz uniemożliwia przeprowadzenie pełnego cyklu infekcyjnego przez infekujące go wirusy. W odpowiedzi na zmiany fenotypu gospodarza (wynikające ze zmian w jego genotypie), presja selekcyjna promuje wirusy z takimi mutacjami, które umożliwiają przełamanie bariery w postaci nowo uzyskanej cechy u komórek gospodarza. Proces ten zachodzi jednocześnie i u gospodarza, i u wirusa, powodując ich wzajemną koewolucję [Stern & Sorek, 2011].

Odkrycie wirusów miało miejsce w 1892 roku. Dokonał go rosyjski naukowiec Dmitri Ivanovski, który zauważył że znajdujący się w wodzie czynnik wywołujący zmiany chorobowe u roślin przenika przez porcelanowe filtry (o rozmiarach porów zatrzymujących bakterie) [Wilson, 2014]. Podobne badanie wykonał Martinus Beijerinck, który w trakcie badań choroby mozaiki tytoniu w 1889 zauważył ścisły związek między kontaktem zdrowych roślin z ekstraktem komórkowym roślin wykazujących zmiany chorobowe, a pojawieniem się u nich objawów chorobowych. Ekstrakt komórkowy zachowywał w sobie czynnik wirulentny

nawet po przesączeniu go przez filtry Chamberlanda, (za pomocą których z cieczy usuwano komórki bakteryjne). Czynnikiem ten określił mianem "virus" (łac. *jad, trucizna*) [Creager, 1999]. Od tego czasu dynamicznie prowadzono kolejne badania nad wirusami. W roku 1898 badacze Loeffler oraz Frosch dokonali pierwszego odkrycia wirusa zwierzęcego, wywołującego pryszczycę (ang. *foot-and-mouth disease*) [Loeffler & Frosch, 1898] oraz opracowali koncepcję wirusa jako czynnika chorobotwórczego, wedle której wirus jest nie tylko małą cząstką, ale wymaga wejścia do komórki gospodarza, by w niej się namnożyć (samo umieszczenie wirusa w pożywce nie wystarczy do namnożenia go) [Loeffler & Frosch, 1898]. W ciągu 2 lat od tego wydarzenia nastąpiło pierwsze odkrycie wirusa ludzkiego, którym był wirus żółtej febry. Odkrył go w roku 1901 amerykański chirurg Walter Reed [Reed i in., 1901]. Kolejnym odkrytym wirusem ludzkim był wirus ospy prawdziwej (ang. *variola virus*), zobrazowany w 1906 roku przez Enrique Paschen'a poprzez barwienie fuksyną [Fenner i in., 1988; Paschen, 1906]. Dekadę później odkryto wirusy bakteryjne, czego dokonali niezależnie w roku 1915 Fryderyk Twort – brytyjski lekarz i naukowiec badający zjawisko lizy komórek *Vibrio cholerae* po kontakcie z próbkami wód Gangesu [Twort, 1915] oraz w roku 1917 Feliks d'Herelle – francuski mikrobiolog i pomysłodawca terapii fagowej¹, badający czynniki zapobiegające dyzenterii [d'Herelle, 1917; Vandamme i in., 2019]. Termin „bakteriofag” zaproponowany przez Feliksa d'Herelle pochodzi od dwóch słów: łacińskiego „*bacteria*” oraz greckiego „*φαγεῖν*” (*phagein*) oznaczającego „pożerać”. Nazwa ta wynika z widocznych gołym okiem skutków infekcji wirusowej, czyli przezroczystych przejaśnień na murawce bakterii zwanych „łysinkami” (fr. *plaques*), wyglądających jakby w tych miejscach pewien drobnoustrój był zdolny do spożywania komórek bakteryjnych [d'Herelle, 1917].

1 Obecnie w Europie działają dwa ośrodki wykorzystujące bakteriofagi w medycynie: Centrum Terapii Fagowej (ang. Phage Therapy Center) w Tbilisi powstałe w 2003 roku [phagetherapycenter.com] oraz Ośrodek Terapii Fagowej przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu powstały w 1952 roku [iitd.pan.wroc.pl].

1.1.1 Wirusy infekujące bakterie – bakteriofagi

Bakteriofagi są najliczniejszymi jednostkami biologicznymi na Ziemi. Szacuje się, że ich całkowita liczebność sięga wartości 10^{31} [Suttle, 2005; Wommack i in., 2000]. Szacuje się też, że średnio w każdym mililitrze wody oceanicznej znajduje się od 10^7 do 10^8 cząstek wirusowych, zaś w glebie ich liczebność wynosi w przybliżeniu $2,7 * 10^8$ cząstek/g [Fortier & Sekulovic, 2013; Srinivasian i in., 2008; Weinbauer, 2004]. Liczby te są wartościami uśrednionymi. Faktyczne zagęszczenie populacji bakteriofagów w danej niszy uwarunkowane jest wieloma czynnikami środowiskowymi w zestawieniu z zakresem tolerancji danego wirusa na te czynniki, np. temperatura otoczenia versus zakres tolerancji temperaturowej bakteriofaga [Fortier & Sekulovic, 2013; Weinbauer, 2004]. Bakteriofagi pośrednio, ale w znaczący sposób wpływają na obieg pierwiastków w przyrodzie: liza komórek bakteryjnych pod koniec cyklu litycznego bakteriofaga skutkuje uwolnieniem cytoplazmy bakterii do środowiska, a wraz z nią wszystkich zawartych w niej substancji. Skala tego zjawiska, wynikająca z liczby bakteriofagów na świecie, oraz częstości infekcji (w ciągu doby dochodzi do około 10^{29} infekcji bakteriofagami), przekłada się na istotną rolę bakteriofagów w przepływie energii i wszystkich pierwiastków w przyrodzie [Abedon, 2001]. Ponadto bakteriofagi mają też wpływ na inne procesy biologiczne, do których zaliczamy: utrzymywanie bioróżnorodności i równowagi ilościowej między populacjami bakteryjnymi [Fortuna i in., 2019] oraz horyzontalny transfer genów [Davidson, 2018].

1.1.2 Klasyfikacja i taksonomia wirusów

Przez klasyfikację wirusów rozumie się ich przyporządkowanie do właściwych taksonów. Instytucją koordynującą klasyfikację oraz nomenklaturę wirusów jest ustanowiony w roku 1966 Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ICTV, ang. *International Committee in Nomenclature of Viruses*), który aktualizuje taksonomię wirusów w postaci raportów [<https://talk.ictvonline.org>]. Podstawowe kryteria klasyfikacji wirusów wymieniono w Tabeli 1.

Tabela 1. Podstawowe kryteria klasyfikacji ICTV [na podstawie: Baron, 1996; Guttman, 2001; Zhang i in., 2019].

Cecha	Warianty
rodzaj kwasu nukleinowego	DNA
	RNA
topologia cząsteczki kwasu nukleinowego	kolista – c (ang. <i>circular</i>)
	liniowa – l (ang. <i>linear</i>)
polarność genomu (tylko dla ssRNA)	(+) dodatnia – genomowy RNA może być wykorzystany jako mRNA do syntezy białek w procesie translacji
	(-) ujemna – genomowy RNA nie może służyć jako matryca w translacji, bo jest komplementarny do wirusowego mRNA
ilość segmentów w genomie	genom jednosegmentowy
	genom wielosegmentowy
symetria nukleokapsydu	ikozaedralna
	helikalna
	złożona
	pleomorficzna
	brak kapsydu
rozmiar wirionu i kapsydu	
występowanie osłonki lipidowej	obecność osłonki
	brak osłonki

Kryteria wymienione w Tabeli 1 nie wyczerpują listy pozostałych cech, które brane są pod uwagę przy ustanawianiu nowych taksonów. Uwzględnia się również wiele innych cech dotyczących między innymi: właściwości fizykochemicznych wirionów, białek wirusowych, lipidów, węglowodanów, antygenów i tropizmu do tkanek [Frederik i in., 2012]. Z historycznego punktu widzenia klasyfikacja wirusów cechuje się dużym dynamizmem – kryteria klasyfikacji wielokrotnie się zmieniały na przestrzeni dekad i z początku uwzględniały jedynie: zakres gospodarzy, cykl replikacyjny i strukturę wirionów (gdyż tylko na to pozwalały ówczesne techniki badawcze). Dalsze uściślanie taksonomii stało się możliwe dzięki genomice (tj. analityki genomów), metagenomice (tj. analityki materiału genetycznego izolowanego z różnych nisz ekologicznych) i analizom porównawczym. Genomika istotnie poszerzyła możliwości klasyfikowania wirusów, gdyż pozwoliła na włączenie informacji dotyczących sekwencji ich materiału genetycznego. Dzięki analizom porównawczym stało się

możliwe odkrywanie zależności filogenetycznych między poznanymi wirusami, czego nie udało się zrobić w oparciu o sam fenotyp [Edwards & Rohwer, 2005]. Wraz z rozwojem metagenomiki z powodzeniem zainicjowano również badania wirusów niedających się hodować klasycznymi metodami laboratoryjnymi, albo których gospodarze nie byli znani [Edwards & Rohwer, 2005]. Nazwy taksonomiczne wpisują się w ściśle określony schemat, ich końcówki gramatyczne (tzw. *sufiksy*) wskazują na rangę taksonomiczną danej grupy. Nowością w świecie nauki jest rozbudowanie taksonomii wirusów o jednostki wyższe niż rząd, tj.: klasy, podtypy i typy [ICTV, 2018a] oraz królestwa [ICTV, 2018b]. Ze względu na dużą różnorodność nie wszystkie wirusy są przyporządkowane do taksonów wyższego stopnia – nie wszystkie rodzaje są przyporządkowane do podrodziny albo wręcz rodziny; zaś nie wszystkie rodziny są przyporządkowane do określonego rzędu (analogicznie względem wyższych taksonów). Obecnie obowiązujący podział taksonomiczny bakteriofagów wyróżnia 14 rodzin, z czego tylko 5 rodzin jest przypisanych do rzędu (*Caudovirales*) – w tym dwie nowe rodziny: *Ackermannviridae* i *Herelleviridae* ustanowione przez ICTV w roku 2018 [ICTV, 2018b]. Rodziny *Cystoviridae* oraz *Leviviridae*, są przyporządkowane bezpośrednio do nowo ustanowionej rangi taksonomicznej *realm* (która jest odpowiednikiem królestwa albo domeny) *Riboviria* [talk.ictvonline.org/taxonomy, dostęp: 01.09.2019]. Zestawienie dotychczas wyłonionych grup taksonomicznych bakteriofagów zawarto w Tabeli 2; analiza zawartych w niej danych prowadzi do wniosku, iż: najpowszechniejszym typem genomu u bakteriofagów jest dsDNA, w drugiej kolejności ssDNA, a najrzadszym wariantem jest RNA.

Tabela 2. Wykaz rodzin bakteriofagów z wymienionymi cechami charakterystycznymi i przykładowymi przedstawicielami, uzupełniony o rodziny *Ackermannviridae* i *Herelleviridae*. (L) to genom liniowy, (C) to genom kolisty, (S) to genom segmentowany. [na podstawie: Mc Grath S & van Sinderen D, 2007; Krupovic i in., 2011; Barylski i in., 2018; Kropinski i in., 2018; talk.ictvonline.org/taxonomy, dostęp: 01.09.2019].

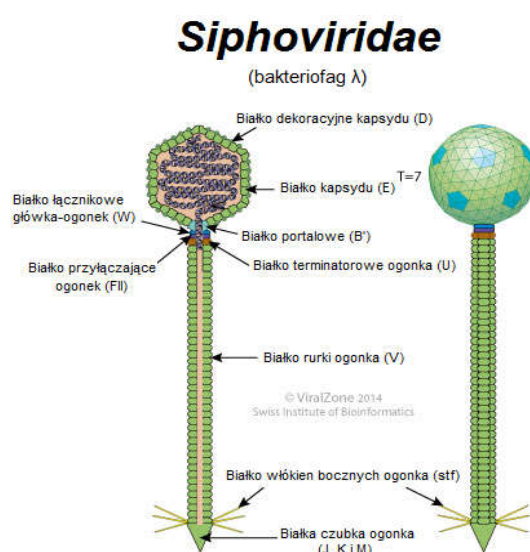
Rząd	Rodziny	Typ genomu	Opis	Przedstawiciel
<i>Caudovirales</i>	<i>Ackermannviridae</i>	dsDNA, L	<ul style="list-style-type: none"> • bezosłonkowe • z długim, kurczliwym ogonkiem 	ϕ MAMI
	<i>Herelleviridae</i>	dsDNA, L	<ul style="list-style-type: none"> • bezosłonkowe • z długim ogonkiem 	A9
	<i>Myoviridae</i>	dsDNA, L	<ul style="list-style-type: none"> • bezosłonkowe • z długim, kurczliwym ogonkiem 	T4

	<i>Siphoviridae</i>	dsDNA, L	<ul style="list-style-type: none"> • bezosłonkowe • z długim niekurczliwym ogonkiem 	λ
	<i>Podoviridae</i>	dsDNA, L	<ul style="list-style-type: none"> • bezosłonkowe • z krótkim niekurczliwym ogonkiem 	<i>T7</i>
niesklasyfikowane	<i>Corticoviridae</i>	dsDNA, C	<ul style="list-style-type: none"> • bezosłonkowe • kształt ikozaedralny 	<i>PM2</i>
	<i>Plasmaviridae</i>	dsDNA, C	<ul style="list-style-type: none"> • osłonkowe • o kształcie pleomorficznym 	<i>L2</i>
	<i>Sphaerolipoviridae</i>	dsDNA, C	<ul style="list-style-type: none"> • bezosłonkowe • kształt ikozaedralny • pęcherzyk błonowy zamknięty w kapsydzie 	<i>Thermus virus P23-77</i>
	<i>Tectiviridae</i>	dsDNA, L	<ul style="list-style-type: none"> • bezosłonkowe • o kształcie ikozaedralnym 	<i>PRD1</i>
	<i>Inoviridae</i>	ssDNA, C	<ul style="list-style-type: none"> • bezosłonkowe • o filamentowym kształcie 	<i>M13</i>
	<i>Microviridae</i>	ssDNA, C	<ul style="list-style-type: none"> • bezosłonkowe • o kształcie ikozaedralnym 	$\Phi X174$
	<i>Cystoviridae</i>	dsRNA, L, S	<ul style="list-style-type: none"> • osłonkowe • kształt sferyczny 	$\phi 6$
	<i>Leviviridae</i>	(+)ssRNA, L	<ul style="list-style-type: none"> • bezosłonkowe • o kształcie ikozaedralnym 	<i>Qβ</i>

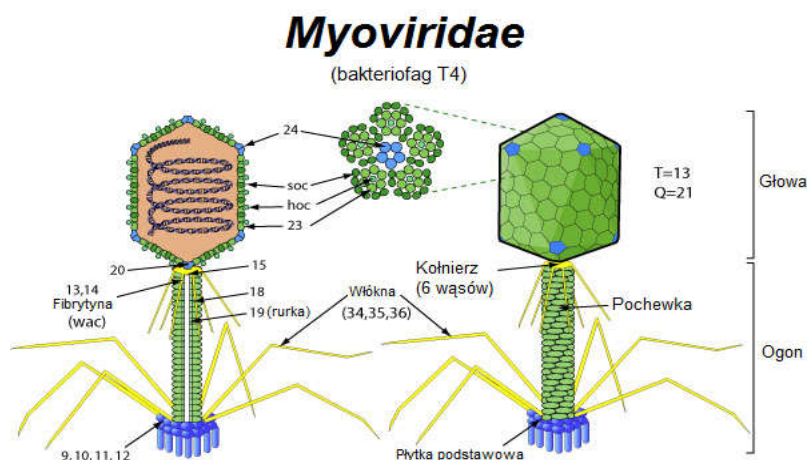
1.2 Budowa wirionów bakteriofagów z rzędu *Caudovirales*

Bakteriofagi z rzędu *Caudovirales* mają budowę złożoną (Ryciny 4,5,6). Ich kapsydy składają się z ikozaedralnej główki i ogonka, który zakończony może być płytką podstawową (ang. *baseplate*), włóknkami lub kolcami umożliwiającymi adhezję do komórek gospodarza. W zależności od rodziny ogonek może być długi i niekurczliwy (*Siphoviridae*), długi i kurczliwy (*Myoviridae*, *Ackermannviridae*, *Herelleviridae*) albo krótki i niekurczliwy (*Podoviridae*). Cechą odróżniającą *Ackermannviridae* od *Myoviridae* jest brak kołnierza pomiędzy główką, a ogonem [Kropinski i in., 2018]. Kryterium, wedle którego wyłączono

niektórych przedstawicieli z *Myoviridae* i przeniesiono do nowo ustanowionej rodziny *Herelleviridae*, było podobieństwo sekwencji nukleotydowych tychże wirusów na poziomie 95% [Barylski i in., 2018]. Efektem tej zmiany było przeniesienie 18 gatunków z rodziny *Myoviridae* do rodziny *Herelleviridae* [Barylski i in., 2018]. Niestety wiele programów bioinformatycznych, m. in. Virfam (Podrozdział 1.6.5), nie zostało jeszcze zaktualizowanych pod kątem rodzin *Ackermannviridae* i *Herelleviridae*, w związku z tym nowo odkrywane bakteriofagi, które przypuszczalnie mogłyby być klasyfikowane do tych rodzin, przez dostępne (i nie uaktualnione) programy bioinformatyczne są wciąż przypisywane do rodziny *Myoviridae*.



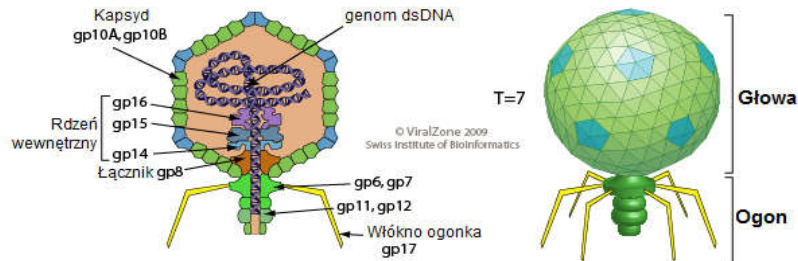
Rycina 4. Budowa wirionów *Siphoviridae* [viralzone.org, 2019, zmienione].



Rycina 5. Budowa wirionów *Myoviridae* [viralzone.org, 2019, zmienione].

Podoviridae

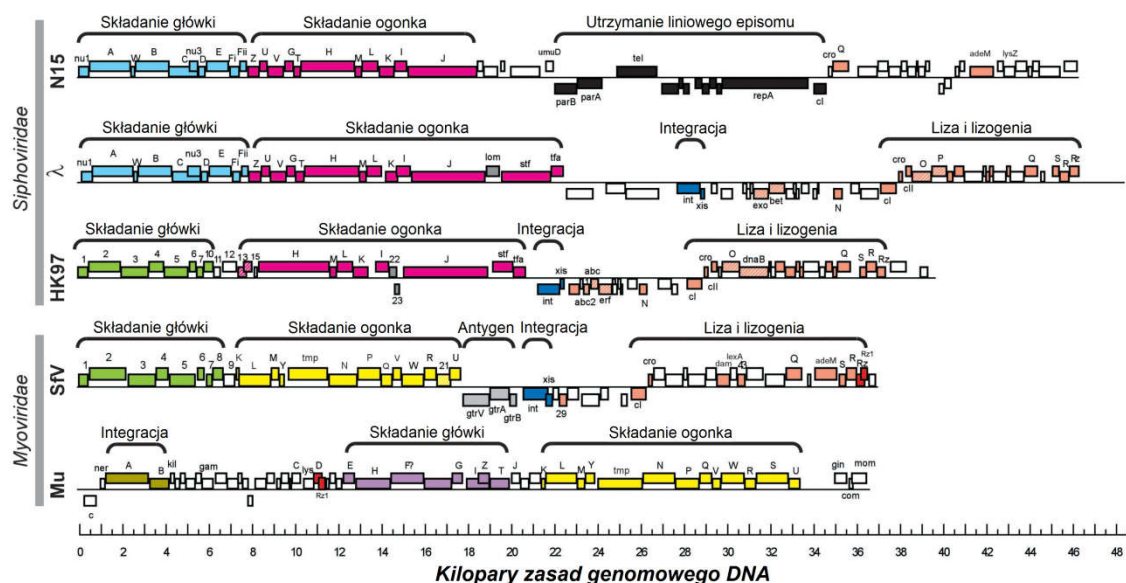
(bakteriofag T7)



Rycina 6. Budowa wirionów *Podoviridae* [viralzone.org, 2019, zmienione].

1.3 Modułarna struktura genomów bakteriofagów

Budowa modułarna wiąże się z pojęciem "modułu funkcjonalnego" – tj. zgrupowania genów pod kontrolą wspólnego promotora, których produkty zazwyczaj biorą udział w tym samym procesie. Do funkcjonalnych modułów należą zgrupowania genów zaangażowanych np. w replikację, w morfogenezę kapsydu czy lizę komórki gospodarza. Na poniższej rycinie przedstawiono przykładowe struktury genomów fagowych z wyszczególnionymi modułami funkcjonalnymi (Rycina 7). Cechą właściwą genomów bakteriofagowych jest ich mozaikowość, co oznacza, iż genom bakteriofaga można postrzegać jako unikatową kombinację segmentów DNA, które zostały nabyte przez horyzontalną wymianę genetyczną i mogą być wymieniane między populacjami różnych (nawet odległych ewolucyjnie) bakteriofagów.



Rycina 7. Mozaikowość genomów wśród bakteriofagów ogonkowych na przykładzie bakteriofagów: N15, λ , HK97, SfV oraz Mu. Geny homologiczne przedstawiono w jednolitej kolorystyce; skośne paski w kolorystyce genów oznaczają, iż produkty białkowe tych genów pełnią analogiczną funkcję. [Lawrence i in., 2002 zmienione].

1.4 Opis cyklu infekcyjnego bakteriofagów z rzędu *Caudovirales*

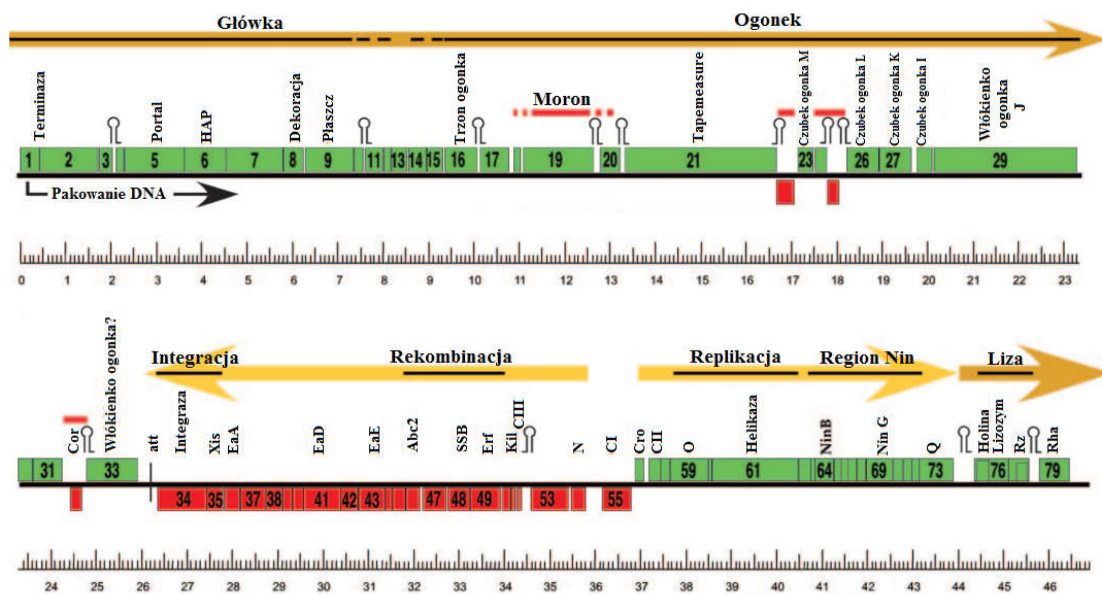
Bakteriofagi z rzędu *Caudovirales*, podobnie do innych wirusów, są obligatoryjnymi pasożytami i mogą się namnażać tylko wewnątrz komórek swojego gospodarza. Pierwszym etapem cyklu infekcyjnego (nie tylko *Caudovirales*, ale wszystkich wirusów) jest adsorpcja. Zachodzi ona dzięki specyficzności receptorów zlokalizowanych na końcu ogonka bakteriofaga – np. fagowego białka wiążącego (ang. *receptor binding protein, RBP*) [Bielmann i in., 2015]. Dopóki adhezja wirusa do komórki nie spowoduje w wirionie zmian konformacyjnych, mówi się o adsorpcji odwracalnej, podczas której oddysocjowanie cząstki wirusowej nie skutkuje utratą jej funkcjonalności. Dopiero gdy receptory bakteriofaga rozpoznają odpowiednie epitopy gospodarza (np. lipopolisacharyd lub białko LamB [Kemp i in., 2005; Rakhuba i in., 2010]), dochodzi do indukcji sygnału i jego propagacji przez białka ogonka powodując zmiany konformacyjne w wirionie. Zmiany te prowadzą do penetracji ściany komórkowej bakterii i wyrzutu DNA genomowego wirusa. Powoduje to, że adsorpcja bakteriofaga do komórki staje się nieodwracalna (mechaniczne usunięcie cząstki wirusowej z powierzchni komórki powoduje utratę infekcyjności) [Molineux, 2001]. Wiele bakteriofagów podczas adsorpcji wymaga obecności jonów dwuwartościowych: w przypadku bakteriofaga P1 są to jony Ca^{2+} [Walker i in., 1970], zaś w przypadku bakteriofaga λ są to jony Mg^{2+} [Schwartz, 1976]. Penetracja ściany komórkowej bakterii zachodzi z udziałem różnych mechanizmów w zależności od bakteriofaga:

- w przypadku *Siphoviridae* może się to odbywać za sprawą translokacji genomu przez naturalnie występujące kanały w strukturze błon komórkowych (np. przez białko LamB [Charbit i in., 1984; Xu & Xiang, 2017]),
- w przypadku *Myoviridae* może się to odbywać za sprawą mechanicznego przebicia ściany komórkowej przez rdzeń ogonka, który wysuwa się z pochewki wraz z jej kurczeniem się (dochodzi też to enzymatycznej degradacji ścian przez domenę katalityczną na końcu rdzenia, np. przez białko gp5 degradujące peptydoglikan [Xu & Xiang, 2017]),
- w przypadku *Podoviridae* (których ogonek jest zbyt krótki, aby przebić się przez ścianę komórkową bakterii) może się to odbywać za sprawą enzymatycznej degradacji peptydoglikanu oraz wbudowywania białek tworzących kanał centralny w miejscu zdegradowanej ściany komórkowej [Chang i in., 2010].

U *Caudovirales* jedynym elementem wprowadzanym do komórki gospodarza jest genom wirusa. Pozostałe elementy (takie jak kapsyd) pozostają na zewnątrz komórki i nie biorą udziału w dalszych etapach infekcji [Rakhuba i in., 2010]. Po wnikięciu genomu fagowego do cytoplazmy gospodarza dochodzi do ekspresji genów, które nazywane są wczesnymi. Białka będące produktami tych genów są związane m. in. z obroną przed mechanizmami antyfagowymi (np. systemy anty-CRISPR [Pawluk i in., 2016]), decyzją liza/lizogenia [Erez i in., 2017] oraz replikacją [Taylor & Węgrzyn, 1995]. Przykładem białka będącego produktem genów wczesnych jest polimeraza RNA faga T7, specyficzna względem promotorów w genomie fagowym – z jej udziałem dochodzi do transkrypcji pozostałych genów [Shin i in., 2012]. Kolejnym etapem cyklu infekcyjnego jest replikacja genomu fagowego, która u niektórych fagów zachodzi po zamknięciu genomu w strukturę kolistą (np. u λ [Taylor & Węgrzyn, 1995]) – pierwsze rundy replikacyjne zachodzą zgodnie z modelem θ [Taylor & Węgrzyn, 1995], zaś po pierwszym cięciu genomu z udziałem terminazy dalsza replikacja zachodzi zgodnie z modelem toczącego się koła (modelu σ) [Taylor & Węgrzyn, 1995], co prowadzi do utworzenia struktury konkatameru [Casjens & Hayden, 1988] (tj. wielokrotnych kopii genomu połączonych szeregowo w tej samej orientacji [Bernstein & Bernstein, 1973]). Etap ten u niektórych bakteriofagów jest przeprowadzany przez produkty genów średnich. Jeśli w cyklu infekcyjnym danego bakteriofaga nie wyróżnia się genów średnich, replikacja przeprowadzana jest przez geny wczesne (co ma miejsce np. u bakteriofaga $\phi 29$ infekującego bakterie z rodzaju *Bacillus* sp. [Murray & Rabinowitz, 1982]). Po replikacji DNA wirusa dochodzi do ekspresji genów

późnych – czyli przede wszystkim białek strukturalnych, niezbędnych do budowy główki, ogonka oraz innych elementów kapsydu. Są to białka, które po osiągnięciu odpowiedniej konformacji i stężenia w komórce podlegają samozłożeniu (ang. *self-assembly*) w strukturę przejściową zwaną „prokapsydem” – złożoną na zewnątrz z białek płaszcza (ang. *coat protein, CP*) tworzących główkę [Cerritelli i in., 2003]; zaś wewnątrz z białek rusztowania, które nadają prokapsydowi właściwą strukturę przestrzenną oraz białka portalowego, przez które genom fagowy będzie translokowany do główki [Lebedev i in., 2007]. Odbywa się to z udziałem kompleksu terminazy, której mała podjednostka rozpoznaje sekwencję *cos* (ang. *cohesive end site*) lub *pac* (ang. *package*); zaś duża podjednostka terminazy dokonuje nukleolitycznego cięcia DNA w sekwencji rozpoznanej przez małą podjednostkę terminazy i przeprowadza translokację DNA do prokapsydu [Fujisawa & Morita, 1997]. Sekwencje *cos* to sekwencje, w których od produktu replikacji w formie konkatameru następuje odcinanie monomerycznych cząsteczek genomu podczas pakowania go do prokapsydu przez terminazę [Shinder & Gold, 1988]. Sekwencję *cos* mają m.in. bakteriofag λ [Shinder & Gold, 1988] oraz bakteriofag HP1 [Fitzmaurice i in., 1984]. W innej sytuacji – gdy cięcie nie zachodzi w stałym miejscu, liniowe genomy fagów są kolidycznie permutowane. To znaczy, że są produktami linearyzacji identycznych kolistych cząsteczek, powstałymi poprzez przecięcie ich w różnych miejscach. W przypadku niektórych fagów pierwsze cięcie, konkatamerycznej formy replikowanego genomu z udziałem terminazy, odbywa się w sekwencji *pac* [Vogel & Schmieger, 1986]. Mechanizm pakowania, w którym terminaza przeprowadza cięcie w dowolnym miejscu konkatameru (albo w miejscu *pac*) nazywany jest mechanizmem „head-full”, czyli takim gdzie najważniejszym czynnikiem limitującym ilość zapakowanego DNA jest pojemność główki (terminaza odcina genom, gdy dalsze pakowanie go do główki jest fizycznie niemożliwe). Przykładami bakteriofagów replikujących się z udziałem tego systemu są m.in. bakteriofag P22 [Moore & Prevelige, 2002; Tang i in., 2011] oraz SP16 [Parker & Dean, 1986]. O ile w przypadku pakowania typu „head-full” czynnikiem limitującym ilość zapakowanego genomu jest pojemność kapsydu, to u bakteriofagów z genomem pakowanym według mechanizmu bazującego na sekwencjach *cos* kapsyd też jest w pełni wypełniony (zależy to jednak od długości genomu ograniczonej sekwencjami *cos*, a nie od pojemności kapsydu per se) [Lin & Black, 1998]. U bakteriofagów z genomem pakowanym według mechanizmu „head-full” materiał genetyczny pakowany jest z nadmiarem sięgającym nawet 10% genomu [Fokine i in., 2014]. W trakcie translokacji genomu do prokapsydu następuje rearanżacja cząstki wirusowej, białka rusztowania ulegają degradacji, a miejsce po tych białkach wypełnia genom. Jako ostatnie z genów późnych są

wyrażane geny z modułu litycznego, do których zaliczamy: holiny (białka tworzące dziury w błonie cytoplazmatycznej, co zapewnia obecnej w cytoplazmie endolizynie dostęp do peptydoglikanu) oraz endolizyny (hydrolazy degradujące peptydoglikan, co prowadzi do perforacji ściany komórkowej). Efektem aktywności holin i endolizyn jest uwolnienie potomnych cząstek bakteriofagowych. Ponieważ liza przerywa wszystkie procesy zachodzące w komórce, ma ona miejsce dopiero, gdy zakończą się wszystkie wcześniejsze etapy cyklu infekcyjnego [Loessner, 2005]. Jak wspomniano na początku Podrozdziału 1.3, geny fagowe tworzą moduły funkcjonalne, przy czym kolejność etapów cyklu infekcyjnego niekoniecznie jest odzwierciedlona przez kolejność modułów (Rycynie 8). Kolinearność pewnych genów w module stanowi cenną wskazówkę w przewidywaniu funkcji białek hipotetycznych, tj. takich których sekwencję aminokwasową ustalono na drodze analizy genomicznej, ale których funkcji nie da się przewidzieć na podstawie podobieństwa do białek scharakteryzowanych eksperymentalnie (Podrozdział 1.6). Białka uczestniczące w tym samym procesie muszą być ekspresowane na tym samym etapie cyklu infekcyjnego, więc geny je kodujące występują obok siebie.

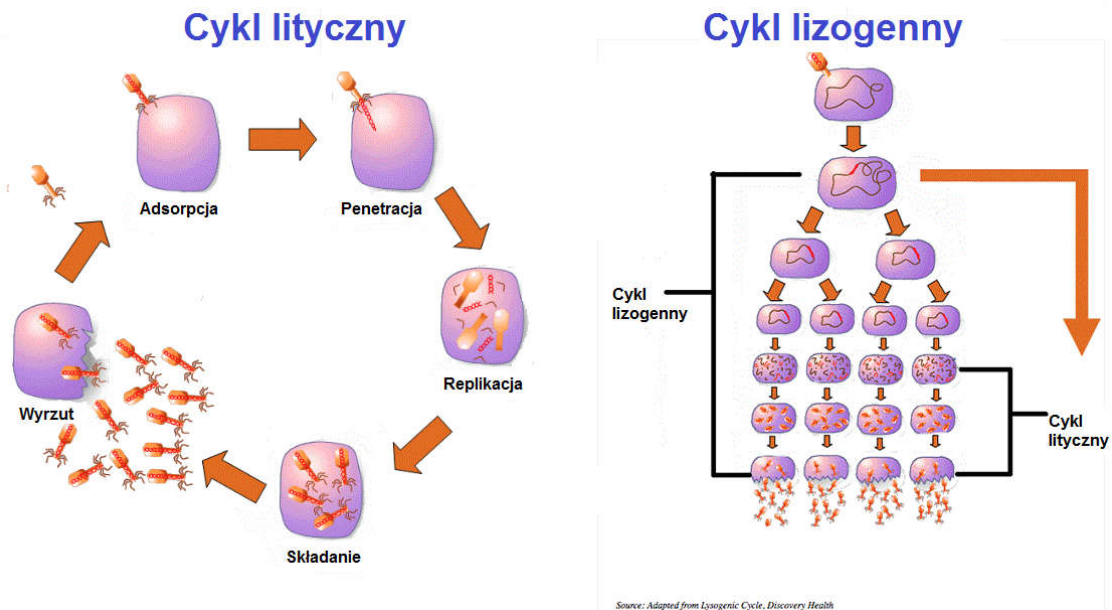


Rycina 8. Mapa genomu bakteriofaga ES18. Pierwszy gen na nici wiodącej koduje małą podjednostkę terminazy. Kolejność genów tym przypadku nie koresponduje z kolejnością etapów cyklu infekcyjnego (lewe ramię rozpoczyna się od genów strukturalnych). Na nici wiodącej obecne są geny związane z cyklem litycznym, na nici opóźnionej obecne są geny związane z cyklem lizogennym [Casjens i in., 2005, zmienione].

1.5 Cykl lizogeny, stan pseudolizogenii, infekcja chroniczna

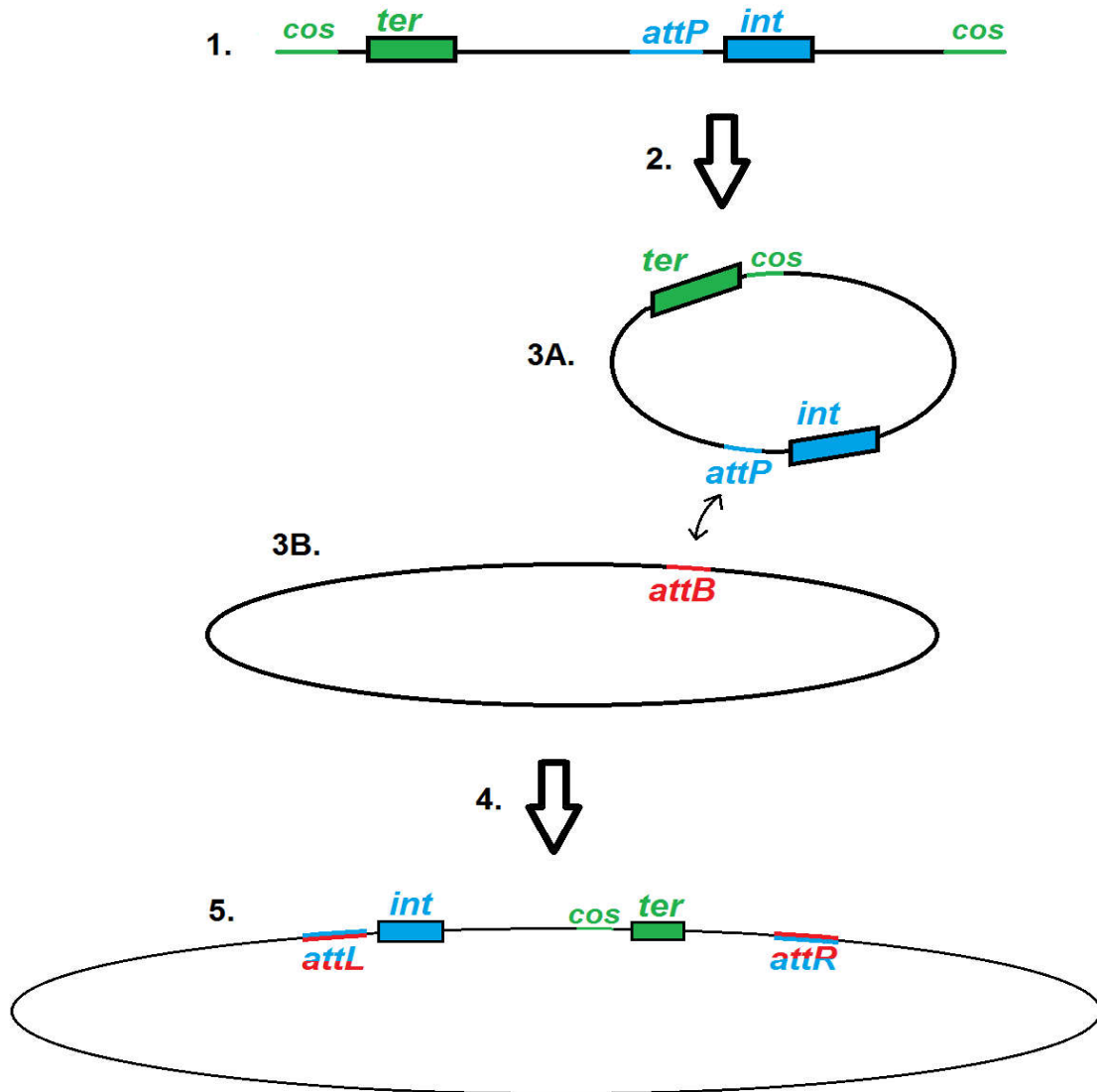
1.5.1 Cykl lizogeny

Opisany w Podrozdziale 1.4 przebieg cyklu infekcyjnego jest uniwersalny dla wszystkich bakteriofagów – taka forma cyklu infekcyjnego zwie się „cyklem litycznym”, bo jej efektem końcowym jest liza komórki gospodarza. Jednakże w przypadku bardzo wielu bakteriofagów wytworzenie cząstek potomnych może być znacząco odsunięte w czasie w stosunku do momentu zainfekowania gospodarza. W tym okresie ich genomy pozostają w zakażonych komórkach jako formy latentne. W stanie utajenia ekspresja informacji genetycznej faga jest ograniczona tylko do genów, których produkty są odpowiedzialne za utrzymanie tego stanu (lizogenii) [Fortier & Sekulovic, 2013]. Genom faga w stanie latentnym może być wbudowany w bakteryjny chromosom albo pozostawać w cytoplazmie w formie episomu zdolnego do autonomicznej replikacji – zwanego profagiem plazmidopodobnym (ang. *plasmid-like prophage*) [Shen i in., 2018]. Analogicznie do plazmidów profagi plazmidopodobne mogą przyjmować formę kolistą (np. fag P1 [Cenens i in., 2013]) bądź liniową (np. fag xhp1 [Shen i in., 2018]). W cyklu lizogennym nie powstają cząstki potomne, ani nie dochodzi do lizy komórki. Bakteriofagi, zdolne do wejścia w cykl lizogeny nazywa się fagami lizogennymi lub fagami łagodnymi; zaś bakteriofagi niezdolne do tego nazywa się fagami wirulentnymi lub fagami zjadliwymi [Marsh & Wellington, 1994]. Cykl lityczny oraz cykl lizogeny zilustrowano na Rycinie 9. U fagów łagodnych decyzja molekularna pomiędzy wejściem w cykl lityczny lub lizogeny zależy od kondycji metabolicznej komórki oraz stosunku ilościowego cząstek fagowych do komórek gospodarza (MOI, ang. *Multiplicity of Infection*) – im więcej jest cząstek fagowych względem komórek gospodarza, tym większy odsetek infekujących cząstek fagowych wejdzie w stan lizogenii [Janion, 2008; Wei i in., 2001; Weinbauer, 2004].



Rycina 9. Schemat cyklu litycznego i lizogenego
[\[https://www.texasgateway.org/resource/virus-reproduction, dostęp: 01.09.2019, zmienione\]](https://www.texasgateway.org/resource/virus-reproduction).

Kolejnym etapem po penetracji wirusowego DNA jest zamknięcie go w kolistą cząsteczkę poprzez ligację albo rekombinację końców genomu. Układ genów w genomie fagowym (w kapsydzie) i w profagu (wintegrowanym do chromosomu bakteryjnego) jest różny. Zazwyczaj pierwszym genem lewego ramienia profaga jest gen integrazy (*skr. int*). W przypadku liniowych genomów fagów znajdujących się w kapsydach, które terminaza przecięła w miejscach *cos*, pierwszym genem lewego ramienia jest gen kodujący małą podjednostkę terminazy (*skr. ter*). Wyżej opisane warianty zilustrowano na Rycinie 10.



Rycina 10. Integracja genomu fagowego do chromosomu gospodarza: Liniowy genom wirusa (1) po znalezieniu się w cytoplazmie ulega cyrkularyzacji (2). Pomiędzy miejscem *attP* (ang. *attachment of Phage*) w kolistym genomie faga (3A), a miejscem *attB* (ang. *attachment of Bacterium*) w chromosomie gospodarza (3B) dochodzi do rekombinacji homologicznej (4). W efekcie kolisty genom faga staje się wstawką wbudowaną w chromosom gospodarza (5), zaś na granicy obu genomów powstają sekwencje *attL* (ang. *attachment Left*) i *attR* (ang. *attachment Right*), będące produktami rekombinacji miejsc *attB* i *attP* [na podstawie: Raya i in., 1992].

Jak wspomniano wcześniej – bakteriofaga łagodnego, który wszedł w stan lizogenii nazywa się profagiem, zaś szczep bakteryjny z wbudowanym do genomu fagiem nazywa się lizogenem. Cechą charakterystyczną szczepów lizogennych jest ich oporność na infekcję tym samym lub pokrewnym bakteriofagiem (tzw. zjawisko oporności na superinfekcję), co wynika w zależności od bakteriofaga: albo z obecności ekspresowanego białka represora kodowanego przez profaga (białko to powoduje blokadę ekspresji genów litycznych

bakteriofaga-intruza [Susskind i in., 1974; Sun i in., 2006]); albo z syntezy białek kodowanych przez geny profaga, których funkcją jest blokowanie translokacji genomu bakteriofaga-intruza do cytoplazmy [Lu & Henning, 1994].

1.5.2 Stan pseudolizogenii

Wszystkie bakteriofagi; niezależnie czy zjadliwe, czy łagodne; mogą wejść w stan pseudolizogenii [Łoś & Węgrzyn, 2012]. Stan ten polega na zahamowaniu cyklu infekcyjnego wirusa. Jego materiał genetyczny pozostaje w cytoplazmie w formie episomalnej (liniowej lub kolistej), ale nie dochodzi do jego replikacji. W stanie pseudolizogenii żaden z genów bakteriofaga nie ulega ekspresji. Genom bakteriofaga w stanie pseudolizogenii jest przekazywany do komórek potomnych gospodarza losowo, a zatem pewne komórki potomne mogą otrzymać cytoplazmę pozbawioną wirusowego kwasu nukleinowego [Fortier & Sekulovic, 2013]. Stan pseudolizogenii jest odwracalny i stanowi przystosowanie bakteriofaga do skrajnie słabej kondycji metabolicznej zainfekowanej komórki. Gdy stan fizjologiczny gospodarza ulegnie poprawie pseudolizogenia ustaje, a cykl infekcyjny bakteriofaga zostaje wznowiony [Łoś & Węgrzyn, 2012].

1.5.3 Infekcja chroniczna

Niektóre fagi wirulentne i łagodne mogą powodować infekcję chroniczną, w której w zainfekowanych komórkach wirusowe cząstki potomne są stale wytwarzane i opuszczają ją nie powodując lizy. Mechanizm ten charakterystyczny jest dla fagów nitkowatych (rodzina *Inoviridae*), których przedstawicielem jest bakteriofag M13 [Weinbauer, 2004].

1.5.4 Wpływ sekwencji profagowych na funkcjonowanie gospodarza

Prawie połowa bakterii, których genomy zsekwencjonowano to lizogeny (46%) [Touchon i in., 2016], stanowiące w niektórych niszach nawet 100% populacji bakterii [Bobay i in., 2014; Fortier & Sekulovic, 2013; Labonté i in., 2019]. Profagi mogą występować zarówno w formie funkcjonalnej, jak i w formie defektywnej, zawierającej tak dużo mutacji, że nie jest możliwe dokończenie lub wręcz rozpoczęcie przez nie cyklu

infekcyjnego [Bobay i in., 2014]. Mutacje te mogą dotyczyć np. genów odpowiedzialnych za wycięcie profaga z chromosomu bakteryjnego, tworzenie wirionów lub lizę komórki. Nieodłącznym zjawiskiem związanym z profagami jest konwersja lizogenna. Zjawisko to polega na zmianie właściwości fenotypowych bakterii, w których infekujący je bakteriofag łagodny wszedł w cykl lizogenny. Najważniejsze cechy nabywane drogą konwersji lizogennej wymieniono w Tabeli 3

[Brüssow i in., 2004; Cumby i in., 2012; Fortier & Sekulovic, 2013; Sebahia i in., 2006; Schuch & Fischetti, 2009; Wang i in., 2010; Sullivan i in., 2006].

Tabela 3. Cechy nabywane na drodze konwersji lizogennej.

Mikroorganizmy niepatogenne	Mikroorganizmy patogenne
<ul style="list-style-type: none"> • wzrost przy niedoborze składników odżywczych • zdolność do zmiany profilu troficznego (przyswajanie nietypowych substratów pokarmowych) • tolerancja na duże zasolenie • usprawniony proces sporulacji • zwiększenie wydajności procesu fotosyntezy 	<ul style="list-style-type: none"> • kodowanie toksyn wydzielanych do ustroju gospodarza • synteza dysmutazy ponadtlenkowej (ochrona przed wolnymi rodnikami produkowanymi przez układ odpornościowy) • produkcja fosfolipazy • białka efektorowe uczestniczące w inwazji komórek gospodarza
<ul style="list-style-type: none"> • formowanie biofilmów • tolerancja na antybiotyki • oporność na infekcję tym samym lub pokrewnym bakteriofagiem (na różnych etapach infekcji) • utrata funkcjonalności niektórych genów (na drodze dysrupcji po wintegrowaniu fagowego DNA) 	

Cechy wymienione w Tabeli 3, choć w istotny sposób przyczyniają się do większego przystosowania środowiskowego u bakterii nie mają istotnego znaczenia dla funkcjonowania samego bakteriofaga. Cechy warunkowane przez elementy genetyczne niemające udziału w cyklu infekcyjnym zawarte w genomach bakteriofagowych – nazywa się „moronami” (ang. *more on*). U niektórych profagów ich ekspresja jest niezależna od ekspresji pozostałych białek wirusowych [Juhala i in., 2000] i wówczas może zachodzić nawet przy wyciszeniu innych genów profaga ze względu na obecność własnych promotorów oraz terminatorów transkrypcji [Cumby i in., 2012; Fortier & Sekulovic, 2013]. Morony obecne w genomie fagowym mogą być przekazywane między bakteriami na drodze horyzontalnego transferu

genów (transdukcja) lub wertykalnego transferu genów (replikacja chromosomu bakterii zawierającego profaga [Bobay i in., 2014]). Przekazywanie moronów może mieć miejsce również pomiędzy bakteriofagami na drodze rekombinacji homologicznej. Dowodem na to są wyniki analiz bioinformatycznych sekwencji moronowych identyfikowanych w genomach fagowych, które często wykazują inną zawartość par GC, co nie tylko świadczy o horyzontalnym transferze, ale sugeruje iż nie są to wydarzenia odległe ewolucyjnie [Hendrix, 2002].

1.6 Analiza bioinformatyczna genomów fagowych

Postęp w genomice wiążący się z udoskonaleniem technik sekwencjonowania klasów nukleinowych i białek (oraz spadku cen usług związanych z sekwencjonowaniem) przełożył się na powstanie ogromnych ilości danych w postaci sekwencji białkowych i nukleotydowych. Szybka analiza tych zasobów informatycznych możliwa jest tylko z użyciem komputerów oraz specjalnego oprogramowania przeznaczonego do analizy porównawczej tychże danych [Pennisi, 2011]. Dane obejmujące sekwencje nukleotydowe genów lub całych genomów oraz sekwencje aminokwasowe białek deponowane są w bazie NCBI (ang. *The National Center for Biotechnology Information*), będącej publicznie dostępnym repozytorium danych bioinformatycznych [Coordinators, 2017]. Wymienione w dalszych częściach Podrozdziału 1.6 programy wykorzystane na potrzeby niniejszej pracy dyplomowej są podstawowymi narzędziami do analizy bioinformatycznej wirusów, z czego niektóre (np. Virfam, Podrozdział 1.6.5) dedykowane są tylko przedstawicielom rzędu *Caudovirales*. Analiza genomów wirusowych wymaga specyficznej metodyki, ponieważ wiele zsekwencjonowanych genomów wirusowych nie wykazuje podobieństwa do genomów innych organizmów i innych wirusów. Analogicznie wiele białkowych produktów genów wirusowych nie znajduje swoich homologów wśród produktów genów organizmów komórkowych, zaś efektem przeszukiwania bazy NCBI pod kątem sekwencji białkowych podobnych do sekwencji przewidywanych białek badanego wirusa jest długa lista dopasowań do białek wirusowych, których funkcji nie określono eksperymentalnie (ang. *hypothetical protein*) [Eisenstein i in., 2000]. Wyżej opisana trudność w przewidzeniu funkcji białka tylko na podstawie dopasowania do rekordów baz bioinformatycznych jest jedną z cech charakterystycznych dla genomiki i proteomiki wirusów. W ramach analiz bioinformatycznych wirusów znajdują zastosowanie programy do wyszukiwania domen

funkcjonalnych, których obecność przewiduje się na podstawie motywów zawartych w badanych sekwencjach aminokwasowych (Podrozdział 1.6.4). Bywają sytuacje, w których wykrycie potencjalnej domeny funkcjonalnej nie jest tożsame z określeniem jej funkcji, co ma miejsce w przypadku rekordów oznaczanych jako „domeny o nieznannej funkcji” (ang. *domain of unknown function, DUF*) identyfikowanych u innych organizmów. Inną metodą przewidywania funkcji potencjalnych białek wirusowych jest wnioskowanie w oparciu o lokalizację badanego genu – białka uczestniczące w tym samym procesie kodowane są najczęściej przez geny kolinearne (tj. następujące jeden po drugim); w związku z czym, jeśli gen o nieznannej funkcji znajduje się pomiędzy dwoma o znanej funkcji, jest wówczas możliwe przewidzenie funkcji genu z dużą dozą prawdopodobieństwa (Podrozdział 1.3). Analiza genomyczna dostarcza przede wszystkim wskazówek co do dalszych kierunków badań, natomiast funkcję domniemanych białek wirusowych można zweryfikować dopiero na drodze eksperymentalnej [Eisenstein i in., 2000].

1.6.1 RAST

Program RAST (ang. *Rapid Annotations using Subsystems Technology*) wykorzystywany jest do wykrywania w sekwencji nukleotydowej potencjalnych otwartych ramek odczytu (ang. *Open Reading Frame, ORF*) w oparciu o występujące w zsekwencjonowanym genomie kodony START oraz kodony STOP. Program RAST umożliwia również wizualizację genomu i adnotację do rekordów z bazy NCBI [Aziz i in., 2008; Brettin i in., 2015; Overbeek i in., 2013].

1.6.2 Artemis

Artemis jest programem funkcjonującym w oparciu o platformę Java. Dostosowany jest do użytku domowego i nie wymaga zakupu licencji na użytkowanie. Wykorzystywany jest w szczególności do adnotacji genomów prokariotycznych oraz genomów niższych eukariontów. [Rutherford i in., 2000]. Program Artemis w niniejszej pracy wykorzystano do wizualizacji sekwencji nukleotydowej zsekwencjonowanego genomu analizowanego bakteriofaga wraz z rozpoznanymi ORFami. W programie Artemis wygenerowano sekwencje

aminokwasowe domniemanych produktów białkowych i zapisano w formacie FASTA. Sekwencje te poddano dalszej analizie z użyciem innych programów.

1.6.3 BLAST

BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) jest programem, który w oparciu o algorytm Needleman'a-Wunsch'a porównuje zaimplementowaną przez użytkownika sekwencję nukleotydową lub białkową (sekwencja zapytania, ang. *QUERY*) z sekwencjami nukleotydowymi lub białkowymi zdeponowanymi w bazie NCBI (ang. *SUBJECT*). Wyniki wyszukiwania są wyświetlane w formie listy rekordów z bazy NCBI, dla których ma miejsce największe podobieństwo sekwencji nukleotydowych, jej pokrycie oraz „wartość E” (ang. *e-value, expected value*). Podobieństwo wyrażane jest w formie parametru SCORE (skr. *S*), którego wartość zależy od: przyjętej macierzy podstawieniowej (ang. *substitution matrix*) [Henikoff & Henikoff, 1992], od ilości kolejnych identycznych nukleotydów między sekwencją badaną a rekordem z bazy oraz od ilości kar za przerwy w ciągłości między tymi sekwencjami (karą nazywa się tu pewną wartość odejmowaną od sumy punktów przyznanych za identyczności między sekwencją badaną, a rekordem z bazy). Pokrycie jest wartością procentową, która wyraża odsetek fragmentów badanej sekwencji, dla których znaleziono przyporządkowanie do rekordu. Wartość E jest współczynnikiem zawierającym się w przedziale od 0 do 1 i wyraża prawdopodobieństwo, z jakim badana sekwencja została przyporządkowana do rekordu przez przypadek. Umownie przyjmuje się, że aby przypisanie do rekordu było istotne statystycznie, e-wartość nie może przekroczyć wartości $5 * 10^{-2}$. W wyborze odpowiedniego rekordu z listy dąży się do tego, aby wartość E była jak najmniejsza. Wartość E oblicza się według wzoru $E = K * m * n * e^{-\lambda S}$ [Altschul & Gish, 1996], gdzie:

- **K** i λ są wartościami stałymi dla przyjętej macierzy podstawieniowej
- **m** i **n** to długości sekwencji zapytania i sekwencji z bazy
- **e** to liczba Eulera
- **S** to wartość SCORE

Blast N (ang. *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) jest wariantem programu BLAST, który w oparciu o algorytm Needleman'a-Wunsch'a porównuje zaimplementowaną przez użytkownika sekwencję nukleotydową (*QUERY*) z sekwencjami

nukleotydowymi zdeponowanymi w bazie NCBI. Program BLAST N wykorzystuje się do wyszukiwania sekwencji wykazujących homologie z badaną sekwencją [Altschul i in., 1990].

Blast P (ang. *Protein Basic Local Alignment Search Tool*) bazuje na tych samych parametrach co BLAST N, z jednym wyjątkiem – w sekwencji aminokwasowej do dyspozycji jest więcej liter (20 podstawowych aminokwasów) niż w sekwencji nukleotydowej (4 nukleotydy). Niektóre aminokwasy wykazują wzajemne podobieństwo strukturalne, w związku z czym podczas dopasowania sekwencji zapytania do rekordu z bazy przypisuje się temu podobieństwu wartość liczbową (ang. *SCORE*) na podstawie wybranej macierzy podstawieniowej (np. BLOSUM62) [Henikoff & Henikoff, 1992].

Blast X jest wariantem programu BLAST, służącym do dopasowywania wybranych sekwencji nukleotydowych z rekordami w bazie białek NCBI [Altschul i in., 1997; Johnson i in., 2008]. BLAST X wykorzystano w niniejszej pracy do dopasowania z rekordami bazy białek NCBI tych fragmentów sekwencji genomu badanego faga, które były homologiczne z sekwencjami genomów innych znanych fagów *Serratia*.

1.6.4 HMMER

Jest to program wyszukujący ukryte modele Markowa (ang. **HMM** – *Hidden Markow Models*) w sekwencji aminokwasowej potencjalnego produktu białkowego, co umożliwia wykrycie potencjalnych domen funkcjonalnych [Rekapalli i in., 2009; Walters i in., 2007]. Program HMMER wykorzystano w niniejszej pracy jako narzędzie pomocnicze do wykrycia domen funkcjonalnych w potencjalnych produktach białkowych wykrytych ORF.

1.6.5 Virfam

Virfam jest programem służącym do określania przynależności do rodziny taksonomicznej badanych bakteriofagów ogonkowych z rzędu *Caudovirales*. Przyporządkowanie do określonej rodziny ma miejsce w oparciu o analizę bioinformatyczną sekwencji aminokwasowych potencjalnych białek strukturalnych, które użytkownik implementuje do programu w postaci pliku FASTA. Program automatycznie wyszukuje

sekwencje białek strukturalnych, które następnie wykorzystywane są jako zapytanie w globalnym dopasowaniu do rekordów bazy ACLAME (ang. *A CLAssification of Mobile genetic Elements*) zawierającej informacje o ruchomych elementach genetycznych, ze szczególnym uwzględnieniem plazmidów oraz bakteriofagów [Leplae i in., 2009]. Po przeszukaniu bazy program Virfam przewiduje morfotyp wirusa w oparciu o rozpoznane moduły główka-szyjka-ogonek, a następnie podaje przynależność do rodziny taksonomicznej [Lopes i in., 2014]. Jak wspomniano w Podrozdziale 1.2, kilka miesięcy temu ICTV wyodrębniło w rzędzie *Caudovirales* dwie nowe rodziny: *Ackermannviridae* i *Herelleviridae*; co nie jest jeszcze uwzględniane przez wiele programów bioinformatycznych, w tym Virfam. Wzięto pod uwagę w dyskusji rezultatów uzyskanych w niniejszej pracy (Rozdział 5.3.3). Wynik analizy prezentowany jest przez program Virfam w formie tzw. „drzewa przewodniego”, na którym badany bakteriofag jest umiejscawiany względem innych już scharakteryzowanych bakteriofagów ogonkowych zgodnie ze wzajemnym podobieństwem ich białek strukturalnych.

1.6.6. Serial Cloner

Serial Cloner (wersja 2.6.1) jest darmowym oprogramowaniem służącym do analizy sekwencji nukleotydowych, m. in: wizualizacji genomu, identyfikacji potencjalnych ORFów, tłumaczenia sekwencji nukleotydowej na sekwencję aminokwasową i symulacji cięć restrykcyjnych [Chandranth i in., 2010; Perez, 2004]. W niniejszej pracy program ten wykorzystano do: wyliczenia długości badanego genomu, określenia procentowego udziału nukleotydów i procentu par CG, symulacji cięć restrykcyjnych genomu badanego bakteriofaga oraz do pobierania wybranych fragmentów sekwencji genomu faga o znanych koordynatach w celu dalszych analiz z użyciem programu BLAST X.

1.6.7. ARAGORN

Program ARAGORN służy do detekcji genów kodujących tRNA (ang. *transfer RNA*) oraz tmRNA (ang. *transfer-messenger RNA*) w zaimplementowanych sekwencjach nukleotydowych. Wyszukiwanie sekwencji genów kodujących tRNA odbywa się z użyciem algorytmu tRNA-CM bazującym na modelu kowariancji [Laslett & Canback, 2004]. W

niniejszej pracy program ARAGORN wykorzystano do przeszukania sekwencji nukleotydowej genomu badanego bakteriofaga pod kątem obecności genów kodujących tRNA.

1.7 Bakterie rodzaju *Serratia* i infekujące je bakteriofagi

Podczas doświadczeń wykonywanych na potrzeby niniejszej pracy wykorzystano jako gospodarzy dwa szczepy z rodzaju *Serratia* sp.: OS10 i W54. *Serratia* to gramujemne i nieprzetrwalnikujące pałeczki z klasy *Gammaproteobacteria*, rodziny *Enterobacteriaceae* [Bender i in., 2018]. Długość komórek zawiera się w przedziale 1-5 μm [Bender i in., 2018]. Bakterie z rodzaju *Serratia* są względnymi tlenowcami [Bender i in., 2018]. Cechą charakterystyczną przedstawicieli rodzaju *Serratia* na tle pozostałych przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* jest zdolność do produkcji 3 enzymów: DNazy NucA, lipazy oraz żelatynazy (serralizyny) [Benedik & Strych, 1998].

Rodzaj *Serratia* obejmuje 15 gatunków [www.itis.gov, dostęp: 30.08.2019]:

1. *Serratia entomophila* [Grimont i in., 1988],
2. *Serratia ficaria* [Gill i in., 1981],
3. *Serratia fonticola* [Gavini i in., 1979],
4. *Serratia glossinae* [Geiger i in., 2010],
5. *Serratia grimesii* [Grimont i in., 1983; Bergan i in., 1983],
6. *Serratia liquefaciens* [Grimes & Hennerty, 1931],
7. *Serratia marcescens* [Grimont, 2005],
8. *Serratia nematodiphila* [Zhang i in., 2009],
9. *Serratia odorifera* [Grimont i in., 1978b],
10. *Serratia plymuthica* [Breed i in., 1948],
11. *Serratia proteamaculans* [Paine & Stansfield, 1919; Grimont i in., 1978a],
12. *Serratia quinivorans* [Grimont i in., 1983; Ashelford i in., 2002],
13. *Serratia rubidaea* [Stapp, 1940; Ewing i in., 1973],
14. *Serratia symbiotica* [Sabri i in., 2011],
15. *Serratia ureilytica* [Bhadra i in., 2005],

Wielu przedstawicieli bakterii z rodzaju *Serratia* jest patogenami oportunistycznymi człowieka. Do infekcji człowieka bakteriami *Serratia* dochodzi przeważnie w szpitalach. Bakterie te zdolne są do tworzenia biofilmów, co niektórym gatunkom umożliwia kolonizację dróg oddechowych, cewki moczowej oraz przewodu pokarmowego osób dorosłych [Abdollahi i in., 2008].

Dotychczas zsekwencjonowano 20 bakteriofagów infekujących bakterie z rodzaju *Serratia* (Tabela 4). Dodatkowo eksperymentalnie scharakteryzowano jeszcze jednego, którego genom oszacowano (w oparciu o analizę restrykcyjną) na około 57 kb. SM701 zaliczony został do rodziny *Siphoviridae* i jest fagiem zjadliwym [Yu i in., 2008].

Tabela 4. Wykaz zsekwencjonowanych bakteriofagów infekujących *Serratia*.

Rząd	Rodzina	Gatunek	Długość genomu	Numer GeneBank	Miejsce izolacji
<i>Caudovirales</i>	<i>Ackermannviridae</i>	KPN4	160,268 bp	KX452697.1	21°08'16.8"N 79°09'24.1"E ścieki Bhandewadi
		2050H1	159,631 bp	MF285619.1	b.d.
		vB_SmaA_3M	159,398 bp	MH929319.1	b.d.
		φMAM1	157,834 bp	JX878496.1 NC_020083.1	52°14'01.3"N 0°09'11.2"E ścieki Milton (Cambridge, United Kingdom)
		vB_Sru_IME250	154,938 bp	KX147096.1 NC_042047.1	39°52'02.5"N 116°21'20.8"E ścieki Szpital YouAn
	<i>Myoviridae</i>	BF	357,154 bp	KY630187.1 NC_041917.1	Kompost z trawy
		2050HW	276,025 bp	MF285618.1	b.d.
		Moabite	273,933 bp	MK994515.1	farma trzody chlewnej
		X20	172,450 bp	MF036692.1	52°14'01.3"N 0°09'11.2"E ścieki Milton (Cambridge, United Kingdom)
		χ14	171,175 bp	MF036690.1 NC_041996.1	
		CBH8	171,175 bp	MF036691.1	
		PS2	167,266 bp	KJ025957.1 NC_024121.1	b.d.
		MyoSmar	68,745 bp	MN062189.1	b.d.
	MTx	(częściowy) 68,621 bp	MK618717.1	b.d.	
	<i>Podoviridae</i>	Parlo	62,853 bp	MK618715.1	b.d.

		SM9-3Y	39,631 bp	KX778611.3	b.d.
		2050H2	39,216 bp	MF285620.1	b.d.
	<i>Siphoviridae</i>	Scapp	42,969 bp	MH553517.1	b.d.
		Serbin	42,882 bp	MK608336.1	30°38'06.5"N 96°17'52.5"W Sadzawka College Station, Texas
		η	42,724 bp	KC460990.1 NC_021563.1	b.d.

1.8 Pochodzenie szczepów psychrofilnych *Serratia* spp. badanych w tej pracy

Szczep wykorzystany w niniejszej pracy pochodzi z kolekcji szczepów wyizolowanych ze sztolni Gertruda, znajdującej się w Kopalni w Złotym Stoku (50°26'21.7"N 16°52'27.7"E). Miejscem izolacji tych bakterii był końcowy odcinek sztolni Gertruda, panują tam stabilne w skali roku warunki środowiskowe: 10,4-11,1°C temperatury powietrza i 10-12°C temperatury wody. Jest to nisza o dużym stężeniu związków arsenu: w formie arseninów (H_2AsO_3) oraz arsenianów ($H_2AsO_4 + H^+$); co uniemożliwia zamieszkanie tego obszaru przez większość żywych organizmów [Drewniak i in., 2008]. Jednymi z nielicznych, obecnych tam form życia są zespoły psychrofilnych i metalotolerancyjnych mikroorganizmów, zdolnych do dysymilacyjnego oddychania arsenowego [Laverman i in., 1995; Krafft & Macy, 1998; Blum i in., 1998]. Miejsce izolacji szczepów przedstawiono na Rycinach 11 i 12. Badania wykonane w ramach niniejszej pracy prowadzone były na szczepach *Serratia* sp. OS10 i *Serratia* sp. W54 w ramach projektu badawczego „Analiza zespołu bakteriofagów infekujących bakterie zasiedlające ekstremalne środowisko zanieczyszczone metalami ciężkimi (2017/25/B/NZ8/00472)” kierowanego przez dr hab. Monikę Radlińską.



Rycina 11. Biofilmy występujące w najgłębszej dostępnej lokalizacji sztolni Gertruda w Kopalni w Żółтым Stoku [Drewniak i in., 2010]: biofilmy skalne na ścianie sztolni (A, B) oraz maty mikrobiologiczne w warstwie osadów dennych (C).



Rycina 12. Mulisty biofilm, występujący tylko w wilgotnych miejscach kopalni [Cłapa i in., 2017].

2. Cel

Celem pracy było wstępne scharakteryzowanie bakteriofaga ϕ OS10, które objęło:

- sekwencjonowanie i adnotację genomu,
- klasyfikację taksonomiczną,
- weryfikację lizogenności,
- określenie kinetyki adsorpcji,
- określenie czasu latencji w jednym etapie replikacji faga,
- określenie wielkości wyrzutu potomnych cząstek fagowych.

3. Materiały

3.1 Próbka badana

- Zawiesina cząstek fagowych, wyizolowanych z biofilmu pozyskanego ze sztolni Gertruda z nieczynnej kopalni w Złotym Stoku [Radlińska, dane nieopublikowane].

3.2 Szczepy bakteryjne

- *Escherichia coli* Top10F': F' [*lacI^q*, *Tn10*(Tet^R)] *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL*(Str^R) *endA1* *nupG*
- szczepy *Serratia* spp. OS10 oraz W54 (kolekcja Pracowni Analizy Skazań Środowiska Uniwersytetu Warszawskiego)

3.3 DNA

3.3.1 Startery do reakcji PCR

Tabela 5. Wykaz starterów wykorzystywanych w reakcjach PCR przeprowadzanych w niniejszej pracy. Małymi literami zaznaczono sekwencje dodane, niewystępujące w genomie faga, które zawierają miejsce restrykcyjne umożliwiające klonowanie amplifikowanego DNA.

Nazwa startera	Sekwencja startera	Długość (nt)
mOS10f	gttgtcatATGGCCTATCAACTTATCTATGC	32
mOS10r	gttgtctcgagGTAGTTCTCTTGCTGTGCTAC	33
cosOS10f	CACCGTGCTCGTATACGTAC	20
cosOS10r	GTTACCTGACTTGTTACCCGAG	22

3.3.2 Wykorzystany wektor plazmidowy

- pUC19: Amp^R; ori pMB1, *lacZ*; MCS; 2,7kpz [ThermoScientific]

3.3.3 Marker wielkości

- wzorzec wielkości fragmentów DNA GeneRuler™ DNA Ladder Mix 100-10000 bp [ThermoScientific]

3.4 Podłoża bakteryjne

- podłoże płynne LB (ang. *Lysogeny Broth*): 20 g LB Difco Broth na 1000ml H₂O [Bacton]
- podłoże półpłynne LB: płynne podłoże LB zestalone agarem do końcowego stężenia 0,7%
- podłoże stałe LB: płynne podłoże LB zestalone agarem do końcowego stężenia 1,5%

Uzupełnienie podłoży:

- ampicylina: roztwór 100 mg/ml (w/v) – stężenie końcowe 150 µg/ml
- IPTG: roztwór 1 M – stężenie końcowe 0,5 mM
- X-gal: roztwór 40 mg/ml – stężenie końcowe 40 µg/ml

3.5 Bufory i roztwory

3.5.1 Bufory i odczynniki do elektroforezy DNA

- bufor TBE: 1,35 M Tris; 0,45 M kwas borowy; 25 mM EDTA (5x stężony)
- roztwór bromku etydyny (stężenie 10 mg/ml) do uwidocznienia DNA w żelach agarozowych
- roztwór obciążnikowy: 0,25% błękit bromofenolowy; 30% glicerol
- żel agarozowy (0,8%): agarozą 0,8 g/100 ml (w/v) w 1x stężonym TBE

3.5.2 Bufor SM

- 100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄; 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)

3.5.3 Bufory do przygotowywania komórek kompetentnych metodą rubidowo-wapniową

- bufor TFB I: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl, 30 mM octan potasu, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol, pH 5,8 ustalone przy użyciu rozcieńczonego kwasu octowego
- bufor TFB II: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% glicerol, pH 6,8 ustalone przy użyciu NaOH

3.5.4 Bufor STE

- 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, and 0,1 M NaCl

3.6 Enzymy

- 10 mg/ml DNaza (wodny roztwór) [Sigma-Aldrich]
- 10 mg/ml RNaza (wodny roztwór) [Panreac AppleChem]
- endonukleazy restrykcyjne, w buforach wskazanych przez producenta [ThermoScientific]
- Fragment Klenowa polimerazy I [ThermoScientific]
- ligaza faga T4, w odpowiednim buforze do ligacji wskazanym przez producenta [ThermoScientific]
- polimeraza DNA faga T4 [ThermoScientific]
- polimeraza DNA Phusion [ThermoScientific] wraz z odpowiednim buforem (High Fidelity Buffer 10x) wskazanym przez producenta
- proteinaza K [A&A Biotechnology]

3.7 Inne

- 10 mM ATP
- 10 mM dNTP mix [ThermoScientific]
- CaCl₂, 1 M roztwór wodny (do końcowego stężenia 2 mM)
- chloroform [Poch]

- etanol 70% [Poch]
- izopropanol [Poch]
- jałowa woda
- mieszanina fenol-chloroform 1:1 [Carl Roth]
- NaCl [Poch]
- SDS, roztwór 10% [Poch]
- Tris-HCl roztwór (pH 7,5)
- wodny roztwór glikolu polietylenowego (PEG4000 10x) 50% (w/v) [Carl Roth]

3.8 Zestawy

- zestaw do izolacji plazmidowego DNA Plazmid Miniprep AX [A&A Biotechnology]
- zestaw do oczyszczania po reakcji PCR Clean-up [A&A Biotechnology]
- zestaw do reizolacji z żelu agarozowego Gel-out [A&A Biotechnology]

3.9 Aparatura

- aparat do zdjęć z lampą UV GeneSYS
- aparat poziomy do elektroforezy w żelach agarozowych [Sigma]
- Eppendorf Centrifuge 5415D
- Eppendorf Centrifuge 5415R
- Eppendorf Centrifuge 5804R
- łaźnia wodna z termostatem
- spektrofotometr NanoDrop [ThermoScientific]
- spektrofotometr UVmini-1240 [Shimadzu]
- termocykler [BioRad]
- termomixer compact [Eppendorf]
- wytrząsarka

3.10 Oprogramowanie

- ARAGORN (Podrozdział 1.6.7) [Laslett & Canback, 2004]
- Artemis (Podrozdział 1.6.2) [Rutherford i in., 2000]
- Blast N (Podrozdział 1.6.3) [Altschul i in., 1990]
- Blast P (Podrozdział 1.6.3) [Henikoff & Henikoff, 1992]
- Blast X (Podrozdział 1.6.3) [Altschul i in., 1997; Johnson i in., 2008]
- HMMER (Podrozdział 1.6.4) [Rekapalli i in., 2009; Walters i in., 2007]
- Libre Office Calc
- Libre Office Writer
- Microsoft Word 2007 (licencja nr M682C-7HJCP-MQTV7-FQ242-6X9XM)
- RAST (Podrozdział 1.6.1)
[Aziz i in., 2008; Brettin i in., 2015; Overbeek i in., 2014]
- Serial Cloner (Podrozdział 1.6.6) [Chandrakanth i in., 2010; Perez, 2004]
- Virfam (Podrozdział 1.6.5) [Lopes i in., 2014]

4. Metody

4.1 Określanie miana zawiesiny fagowej metodą nakropień i metodą testu pełnoszalkowego

Wykonywano szereg 10-krotnych rozcieńczeń badanej zawiesiny. Na warstwę agaru górnego (powstałą ze zmieszania 4 ml LB półpłynnego z 150 μ l nocnej hodowli gospodarza) nakraplano próbki każdego rozcieńczenia o objętości 2-10 μ l, a następnie suszono każdą szalkę przy płomieniu palnika i inkubowano przez noc. Spośród wszystkich szalek wybierano rozcieńczenie, które umożliwiało policzenie łysek. 100 μ l wybranego rozcieńczenia łączono z 150 μ l nocnej hodowli wrażliwego gospodarza, a otrzymaną mieszaninę po około 5-minutowej inkubacji mieszano z 4 ml LB półpłynnego, wylewano na szalkę z LB stałym i równomiernie rozprowadzono po powierzchni. Po zastygnięciu górnej warstwy, szalki inkubowano przez noc w temperaturze 20 °C.

4.2 Izolacja cząstek fagowych

Pojedynczą łysekę zawieszano w 500 μ l buforu SM przez noc i inkubowano w temperaturze około 4 °C. Zawiesinę mianowano tak jak w pkt. 4.1, a następnie wykonywano test pełnoszalkowy dla wybranych rozcieńczeń. Agar półpłynny zalewano 4 ml buforu SM, a następnie inkubowano w temperaturze 4 °C przez noc. Zawieszone w buforze SM łyseki zbierano jałową głaszczką, a otrzymaną zawiesinę wirowano przy prędkości 13 tys. rpm przez 10 min. Supernatant przenoszono do kolb płaskodennych. Do 10 ml zawiesiny dodawano 200 μ l chloroformu (w celu zabicia pozostałych w zawieszynie bakterii), wytrząsano z prędkością 120 rpm, w temperaturze 20 °C przez 30 minut, a następnie wirowano z prędkością 13 tys. rpm przez 10 minut. Uzyskane supernatanty przechowywano w temperaturze 4 °C.

4.3 Izolacja DNA fagowego

Do 1 ml zawiesiny cząstek dodawano RNazę i DNazę do uzyskania końcowych stężeń 10 µg/ml. Mieszaniny inkubowano przez godzinę w temperaturze 37 °C. Dodawano roztwór EDTA do końcowego stężenia 20 mM i inkubowano w temperaturze 65 °C przez 30 minut. Do roztworów dodawano proteinazę K do końcowego stężenia 100 µg/ml oraz SDS do końcowego stężenia 0,5%. Próbki mieszano poprzez odwracanie, po czym inkubowano w temperaturze 56 °C przez 1,5 godziny. Następnie przeprowadzono ekstrakcję białek mieszaniną fenol/chloroform w objętościach identycznych z objętościami próbek, energicznie mieszano poprzez odwracanie aż do utworzenia się homogennej emulsji. Wirowano z prędkością 3000 g przez 6 min w celu rozdzielenia fazy wodnej i fazy organicznej. Zbierano fazę wodną i procedurę powtarzano aż do zaniku interfazy. Próbki oczyszczono z resztek fenolu poprzez ekstrakcję chloroformem, wirowano z prędkością 3000 g przez 6 min w celu rozdzielania fazy wodnej i fazy organicznej. Do każdej z próbek dodawano izopropanol w proporcji objętościowej 1:1. Próbki mieszano i inkubowano w temperaturze -20 °C przez noc. Próbki wirowano przy prędkości 13,2 tys. rpm przez 3 min w 4 °C. Supernatant usuwano pipetą, a osad płukano 70%-owym etanolem, próbki wirowano przez 5 min przy prędkości 13,2 tys. rpm w temperaturze 4 °C. Osad suszono z resztek etanolu przez około 15-30 minut w temperaturze pokojowej, DNA zawieszono w 40 µl wody destylowanej. Pomiar stężeń DNA wykonano z użyciem aparatu Nano-Drop zgodnie z instrukcją podaną przez producenta.

4.4 Trawienia enzymami restrykcyjnymi

Trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi przeprowadzono w oparciu o wytyczne wskazane przez producenta, uwzględniające odpowiednie bufony i temperatury inkubacji. Inkubacje trwały od 1 do 3 godzin. Wykorzystywano 1 jednostkę enzymu na 10 ng DNA.

4.5 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Na potrzeby naszych badań wykorzystywano żel agarozowy na bazie 1x buforu TBE (*Tris-boran-EDTA*) przygotowywany w proporcji 0,8 g agarozy na 100 ml buforu [Lee i in., 2012]. Do każdej z próbek dodawano roztwór obciążający w proporcji 1 μ l roztworu na każde 5 μ l próbki. Elektroforezę przeprowadzano przy napięciu 8 V/cm przez około 1 godzinę. Żel umieszczano w wodnym roztworze bromku etydyny i inkubowano przez około 5-10 min, nadmiar bromku etydyny odpłukiwano w wodzie. Zdjęcia cyfrowe wykonywano w świetle UV przy czasie ekspozycji 0,133 ms i długości fali 300 nm. Zdjęcie korygowano pod kątem jasności i kontrastu, po czym zapisywano.

4.6 Reizolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego

Żel agarozowy umieszczano na szybie transilluminatora, po czym w świetle UV wybierano i wycinano właściwy prążek zawierający DNA. DNA izolowano z użyciem procedury Gel-Out opisanej w instrukcji, załączonej do zestawu komercyjnego [A&A Biotechnology].

4.7 Wypełnianie jednoniciowych końców DNA z użyciem Fragmentu Klenowa

Do próbki dodawano: (i) bufor LB o stężeniu 10x do końcowego stężenia 1x; (ii) roztwór dNTP-ów do uzyskania końcowego stężenia 0,05 mM; (iii) fragment Klenowa w proporcji 1 μ l na każde 40 μ l końcowej objętości mieszaniny; (iv) wodę destylowaną dla dopełnienia do planowanej objętości. Próbkę inkubowano w temperaturze 37 °C przez 10 min, enzym inaktywowano w 75 °C przez 10 min. Próbkę inkubowano w lodzie przez 3 min.

4.8 Wypełnianie jednoniciowych końców DNA z użyciem Polimerazy faga T4

Do próbki dodawano: (i) bufor LB o stężeniu 10x do końcowego stężenia 1x; (ii) roztwór dNTP-ów do uzyskania końcowego stężenia 0,1 mM; (iii) polimerazę faga T4 w proporcji 1 μ l na każde 100 μ l końcowej objętości mieszaniny; (iv) wodę destylowaną dla dopełnienia do planowanej objętości. Próbkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min, enzym inaktywowano w 75 °C przez 10 min. Próbkę inkubowano w lodzie przez 3 min.

4.9 Reakcja ligacji

Reakcję ligacji przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez noc. Używano ligazy faga T4 oraz odpowiedniego buforu do ligacji.

4.10 Pomiar gęstości optycznej hodowli płynnej

Pomiar gęstości optycznej wykonywano przy długości fali $\lambda = 600$ nm, z użyciem spektrofotometru UVmini-1240 (Podrozdział 3.9).

4.11 Przygotowanie komórek kompetentnych metodą rubidowo-wapniową

Na dzień przed właściwą procedurą, przygotowano nocną hodowlę poprzez zawieszenie czystej kultury z posiewu redukcyjnego szczepu E. coli TOP 10 F' w 3 ml jałowego podłoża płynnego LB z późniejszym inkubowaniem tej hodowli przez około 21 godzin w wytrząsarce z ustawioną temperaturą 37 °C i szybkością wytrząsania 100 rpm. Nocną hodowlę E. coli TOP 10 F' (Podrozdział 3.2) odmładzano, przenosząc 1 ml hodowli do 50 ml płynnego podłoża LB o temperaturze 37 °C. Hodowlę prowadzono aż do osiągnięcia OD₆₀₀ około 0,4. Kolbę z odmładzaną hodowlą inkubowano w lodzie przez 30 min. Zawartość kolby przenoszono do probówek wirowniczych i wirowano z prędkością 3700 rpm w temperaturze 4 °C przez 10 min. Supernatant usuwano, osad zawieszano w 1 ml buforu

TFB I (Podrozdział 3.5.3), próbki dopełniano buforem TFB I do końcowej objętości 33 ml. Próbki mieszano poprzez odwracanie, inkubowano w lodzie przez 20 min i wirowano z prędkością 3500 rpm w temperaturze 4 °C przez 10 min. Supernatant usuwano, osad zawieszano w 3 ml buforu TFB II (Podrozdział 3.5.3). Próbki utrzymywano w temperaturze lodu podczas przenoszenia do nowych probówek w porcjach po 100 µl i zamrażano w temperaturze -80 °C.

4.12 Transformacja DNA do bakterii chemokompetentnych

Próbkę 100 µl bakterii kompetentnych (Podrozdział 4.11) rozmrażano, utrzymując w temperaturze lodu. Dodawano 10 µl mieszaniny ligacyjnej (Podrozdział 4.9) i mieszano z użyciem pipety automatycznej. Próbki inkubowano w lodzie przez 30 min. Po tym czasie poddawano je szokowi cieplnemu w temperaturze 42 °C przez 1,5 min, a następnie inkubowano w lodzie przez 2 minuty. Dodawano 900 µl płynnej pożywki LB, mieszano próbkę z użyciem pipety i inkubowano w temperaturze 37 °C przez godzinę. Wykonywano posiew powierzchniowy 100 µl próbki na podłoże stałe LB wzbogacone ampicyliną, IPTG i X-gal (posiew próbki niezateżonej). Pozostałą próbkę o objętości 900 µl wirowano przez 1 min z prędkością 6000 rpm, pobierano 100 µl supernatantu, odrzucano jego pozostałą ilość, pozostały pelet zawieszano w pobranych 100 µl supernatantu i posiewano na powierzchnię podłoża stałego LB wzbogaconego o ampicylinę, IPTG i X-gal (posiew próbki zateżonej). Hodowlę inkubowano w temperaturze 37 °C przez noc. Wybierano co najmniej 1 białą kolonię, pobierano eżę i zaszczepiano w oddzielnych probówkach z 4 ml podłoża płynnego LB z dodatkiem ampicyliny o końcowym stężeniu 150 mM. Probówki inkubowano z wytrząsaniem przez noc w temperaturze 37 °C.

4.13 Izolacja plazmidowego DNA metodą minilizy alkalicznej

Przenoszono do probówki 1,5ml nocnej hodowli (Podrozdział 4.12), wirowano z prędkością 6000 rpm przez 1 min, supernatant usuwano. Do tej samej probówki dodawano 1,5 ml nocnej hodowli i wyżej opisane czynności wykonywano ponownie. Uzyskany osad zawieszano w buforze STE dodawanym do końcowej objętości 1 ml, próbkę wirowano z

prędkością około 6000 rpm przez 1 min, supernatant usuwano. Osad zawieszano w 200 µl buforu L1. Dalsze etapy przeprowadzano zgodnie z instrukcją załączoną do zestawu komercyjnego do izolacji plazmidowego DNA. Próbki plazmidowego DNA przechowywano zamrożone w temperaturze -20 °C.

4.14 Reakcja PCR

Wykonywano pomiar stężenia matrycy dla badanej próbki. W oparciu o pomiar wyliczano potrzebną ilość matrycy, którą następnie dodawano do mieszaniny reakcyjnej (objętość matrycy dostarczająca plazmidowy albo wirusowy DNA do mieszaniny reakcyjnej w ilości od 1 pg do 10 ng). Reakcję przeprowadzano według programu termocyklera (Tabela 6).

Tabela 6. Warunki reakcji PCR przeprowadzanych w niniejszej pracy.

Etap		Temperatura	Czas
Denaturacja wstępna		98 °C	30 sek
35 cykliów	Denaturacja	98 °C	10 sek
	Hybrydyzacja startera	64 °C	30 sek
	Elongacja	72 °C	30 sek
Elongacja uzupełniająca		72 °C	3 min
Zatrzymanie		4 °C	∞

Buforem stosowanym do reakcji PCR był bufor HF (ang. *High Fidelity*) (Podrozdział 3.6). Enzymem stosowanym do reakcji PCR była polimeraza DNA Phusion (Podrozdział 3.6). Skład mieszaniny oraz kolejność dodawania komponentów przedstawia Tabela 7:

Tabela 7. Składniki reakcji PCR przeprowadzanych w niniejszej pracy.

kolejność	Składnik	Objętość	Końcowe stężenie
1	woda destylowana	dopełniająco do 50 μ l	
2	5X bufor Phusion HF	10 μ l	1X
3	10 mM dNTP-y	1 μ l	200 μ M
4	10 μ M starter Forward	2,5 μ l	0,5 μ M
5	10 μ M starter Reverse	2,5 μ l	0,5 μ M
6	matryca DNA	zmiennie	1 pg – 10 ng
7	polimeraza DNA Phusion	0,5 μ l	1U

Polimerazę DNA dodawano tuż przed umieszczeniem próbek w termocyklerze. Po zakończeniu programu wykonywano kontrolę poprzez nałożenie na żel agarozowy około 10 μ l produktu PCR wraz z miarką molekularną i wykonywanie elektroforezy – obecność prążka na przewidywanej wysokości świadczyła o udanym wykonaniu procedury.

4.15 Przygotowanie matrycy do kolijnego PCR

W wariacie procedury opisanej w Podrozdziale 4.14 wykorzystywano matrycę w postaci chromosomalnego DNA ze szczepu lizogenego. Przebieg był następujący: (i) do PCR-ówki dodawano 20 μ l buforu lizującego; (ii) na czubek wymiennej końcówki pipety automatycznej pobierano 1 kolonię szczepu lizogenego; (iii) pobraną kolonię zawieszano w 20 μ l buforu lizującego; (iv) mieszaninę inkubowano przez 10 min w temperaturze 98 °C, (v) zawartość PCR-ówki przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf i dopełniano wodą destylowaną do końcowej objętości 200 μ l, po czym próbkę mieszano; (vi) próbkę zawierającą rozcieńczony lizat bakteryjny wirowano przez 2 min z prędkością 13 tys. rpm (w celu osadzenia szczątków bakteryjnych na dnie probówki); (vii) supernatant z lizatu bakteryjnego dodawano do mieszaniny amplifikacyjnej (PCR) w ilości około 1 μ l.

4.16 Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie wykonywano w ramach usługi zewnętrznej zleconej Pracowni Sekwencjonowania DNA IBB PAN.

4.17 Analiza bioinformatyczna

4.17.1 Identyfikacja otwartych ramek odczytu

Do zidentyfikowania ORFów w sekwencji genomu badanego bakteriofaga wykorzystywano program RAST [Aziz, 2008] (Podrozdział 1.6.1).

4.17.2 Adnotacja otwartych ramek odczytu

Wykryte ORFy (Podrozdział 4.17.1) wizualizowano przy pomocy programu Artemis (Podrozdział 1.6.2), a wygenerowane w nim sekwencje aminokwasowe produktów białkowych wykrytych ORF-ów dopasowywano do zdeponowanych w bazie NCBI sekwencji aminokwasowych znanych białek za pomocą programu BLAST P (Podrozdział 1.6.3). Potencjalne domeny białkowe wykrywano przy pomocy programu HMMER wyszukującego ukryte modele Markowa [<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer>] (Podrozdział 1.6.4). Narzędzia BLAST N (Podrozdział 1.6.3), również dostępnego na stronie NCBI, używano do wykonywania globalnego dopasowania sekwencji nukleotydowej genomu badanego bakteriofaga do zdeponowanych w bazie sekwencji nukleotydowych oraz do dopasowania sekwencji badanego genomu z sekwencjami nukleotydowymi genomów znanych bakteriofagów *Serratia*. Fragmenty genomu badanego bakteriofaga, które wykazywały homologię z sekwencjami nukleotydowymi genomów znanych bakteriofagów *Serratia* analizowano z użyciem narzędzi: Serial Cloner, w którym zaznaczano i kopiowano sekwencje homologiczne na podstawie koordynatów podanych przez BLAST N oraz BLAST X, dzięki

któremu przewidywano funkcje produktów białkowych genów zawartych w tychże sekwencjach.

4.17.3 Przyporządkowanie taksonomiczne bakteriofaga do rodziny

Do określenia przynależności taksonomicznej badanego bakteriofaga wykorzystywano narzędzie dostępne na stronie <http://biodev.cea.fr/virfam/>. Plik tekstowy zawierający sekwencje aminokwasowe potencjalnych produktów białkowych ORF w formacie FASTA implementowano do programu i wydawano dyspozycję analizy do realizacji. Wynik analizy białek strukturalnych z pliku tekstowego wykonanej przez program VIRFAM otrzymywano w formie wiadomości email, w której zawarte były informacje o przynależności badanego bakteriofaga do rodziny taksonomicznej oraz klastra (Podrozdział 1.6.5).

4.17.4 Wirtualne cięcie genomu bakteriofaga enzymami restrykcyjnymi

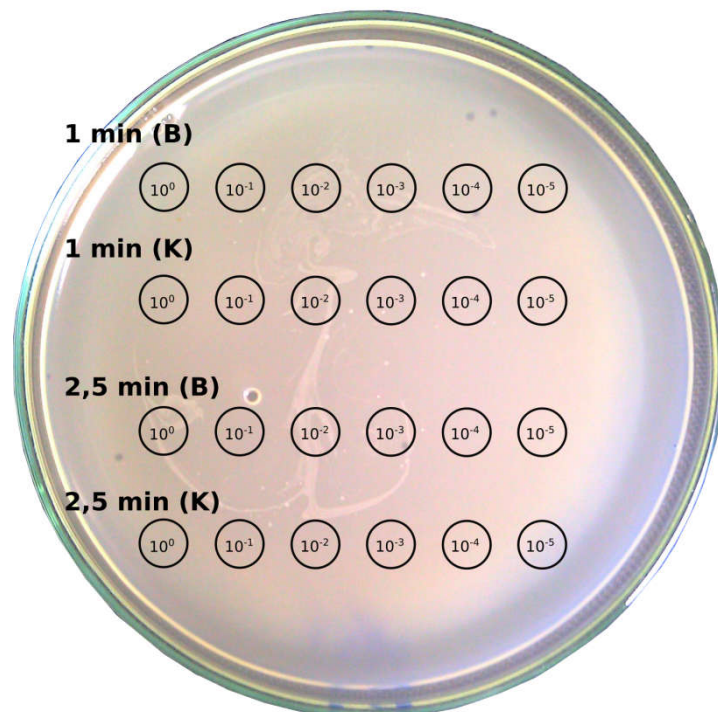
Wirtualne cięcia wykonywano z użyciem programu Serial Cloner. Program w oparciu o zaimplementowaną sekwencję nukleotydową badanego bakteriofaga, wybrane enzymy restrykcyjne i informację o topologii cząsteczki kwasu nukleinowego (kolista lub liniowa) generował grafikę ilustrującą oczekiwany elektroforegram, co umożliwiała wybór właściwych enzymów restrykcyjnych na potrzeby badań. Wirtualnych cięć nie opublikowano w niniejszej pracy.

4.17.5 Wyszukiwanie genów kodujących tRNA

Wyszukiwanie genów tRNA odbywało się z użyciem programu ARAGORN. Po zaimplementowaniu do programu sekwencji nukleotydowej genomu badanego faga program dokonywał analizy, której wyniki wyświetlane były w formie tekstowej (odczytu z programu ARAGORN nie zamieszczono w niniejszej pracy).

4.18 Badanie kinetyki adsorpcji bakteriofaga

Na pełen przebieg eksperymentu (według procedury z Podrozdziału 4.1) składały się trzy próby biologiczne. W każdej próbie wykonywano 8 pomiarów w kolejnych punktach czasowych począwszy od zmieszania bakteryjnego gospodarza z bakteriofagiem, to jest w: 1. minucie, 2. minucie, 5. minucie, 10. minucie, 15. minucie, 20. minucie, 25. minucie oraz 30. minucie. Zarówno w próbie badanej i kontrolnej wykorzystywano po 10 μ l zawiesiny faga ϕ OS10 o mianie 2,5 * 10¹⁰ PFU/ml. Próbą badaną był 1ml nocnej hodowli szczepu *Serratia sp.* OS10 (gospodarz) zmieszany z 10 μ l zawiesiny faga ϕ OS10 o mianie 2,5 * 10¹⁰ PFU/ml. Próbą kontrolną był 1ml pożywki płynnej LB zmieszanej z 10 μ l zawiesiny faga ϕ OS10 o mianie 2,5 * 10¹⁰ PFU/ml. Próby mieszano poprzez przechylenie. W każdym kolejnym punkcie czasowym pobierano do nowych probówek po 100 μ l mieszaniny badanej i mieszaniny kontrolnej. Pobrane próbki wirowano przez 1 minutę z prędkością 10 tys. rpm, z każdej pobierano po 50 μ l supernatantu do nowych, opisanych probówek i umieszczano w lodzie. Próbki nanoszono metodą nakropień (Podrozdział 4.1) na szalki dwuwarstwowe zawierające nocną hodowlę gospodarza według schematu na Rycinie 13.



Rycina 13. Schemat nakropień na szalkę w badaniu kinetyki adsorpcji.

4.19 Badanie jednego etapu replikacji (One-Step Growth) faga ϕ OS10

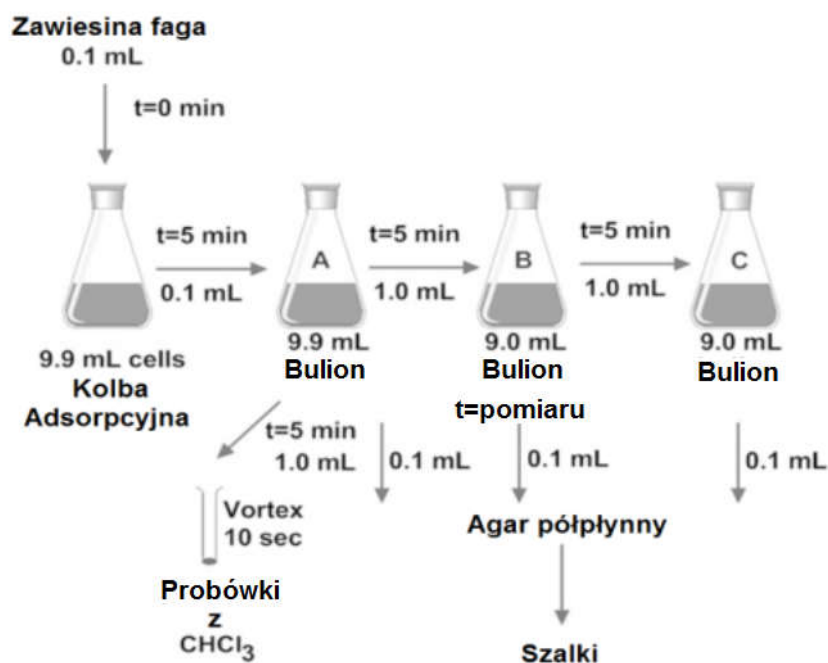
Procedura zastosowana w niniejszej pracy bazowała na metodyce Kropińskiego [Kropiński, 2018] z pewnymi modyfikacjami (Podrozdział 4.19.3). Do badania wykorzystano szczep wrażliwy *Serratia sp.* OS10.

4.19.1 Określenie miana hodowli gospodarza dla $OD_{600} = 0,5$

Nocną hodowlę OS10, pochodzącą z pojedynczej kolonii, odmładzano w płynnej pożywce LB w 3 wariantach, tj. w stosunkach objętościowych: 1:20, 1:50 oraz 1:100. Dla każdego z wariantów określano przybliżony czas, w jakim każda z odmładzanych hodowli osiąga $OD_{600} = 0,5$ (z zastrzeżeniem, iż są to wartości orientacyjne, mogące się różnić w zależności od miana nocnej hodowli, które za każdym razem jest inne). Po określeniu czasu odmładzania hodowli do osiągnięcia $OD_{600} = 0,5$ i uzyskaniu odmłodzonej hodowli o wspomnianej OD, wykonywano rzędy rozcieńczeń odmłodzonej hodowli w podłożu płynnym LB. Wykonywano posiew powierzchniowy rozcieńczeń 10^{-4} , 10^{-5} i 10^{-6} na podłożu stałym LB – tak przygotowane szalki inkubowano przez noc w temperaturze 20 °C, liczone wyrosłe kolonie i określano miano odmłodzonej hodowli OS10 o $OD_{600} = 0,5$.

4.19.2 Określenie wartości MOI i odsetku jednokrotnych infekcji

W oparciu o schemat przedstawiony na Rycinie 14 wyliczano MOI dla kolby adsorpcyjnej.



Rycina 14. Schemat badania jednego etapu replikacji faga. [Kropiński, 2018, zmienione].

Zgodnie z procedurą w kolbie adsorpcyjnej znalazło się 0,1 ml zawiesiny cząstek fagowych o mianie 10^7 PFU/ml, co było tożsame z ilością 10^6 PFU. Do kolby adsorpcyjnej przenoszono 9,9 ml odmłodzonej hodowli szczepu wrażliwego o $OD_{600} = 0,5$. Po wcześniejszym określeniu miana komórek w hodowli o $OD_{600} = 0,5$ i przemnożeniu tego miana przez objętość 9,9 ml uzyskiwano przewidywaną ilość jednostek tworzących kolonie, zaś dzieląc przez tą wartość ilość cząstek fagowych (10^6 PFU) uzyskiwano ilościowy stosunek infekcyjnych cząstek bakteriofagowych do infekowanych komórek gospodarza – czyli MOI. W oparciu o MOI stosowane w procedurze, wyznaczano jaki odsetek wśród wszystkich zainfekowanych komórek szczepu wrażliwego stanowią komórki zainfekowane tylko 1 cząstką infekcyjną. W tym celu stosowano metodę statystyczną opisaną w czasopiśmie naukowym *The Journal of general physiology* [Ellis & Delbrück, 1939]. Zaprezentowany w publikacji wzór (Rycina 15) określał dla dowolnej komórki bakteryjnej prawdopodobieństwo zainfekowania przez „n” cząstek infekcyjnych – gdzie „m” jest wartością MOI, zaś „e” jest liczbą Eulera.

$$P(n) = \frac{m^n \cdot e^{-m}}{n!}$$

Rycina 15. Prawdopodobieństwo infekcji 1 komórki „n” cząstkami wirusowymi [Wikipedia, na podstawie: Ellis & Delbrück, 1939].

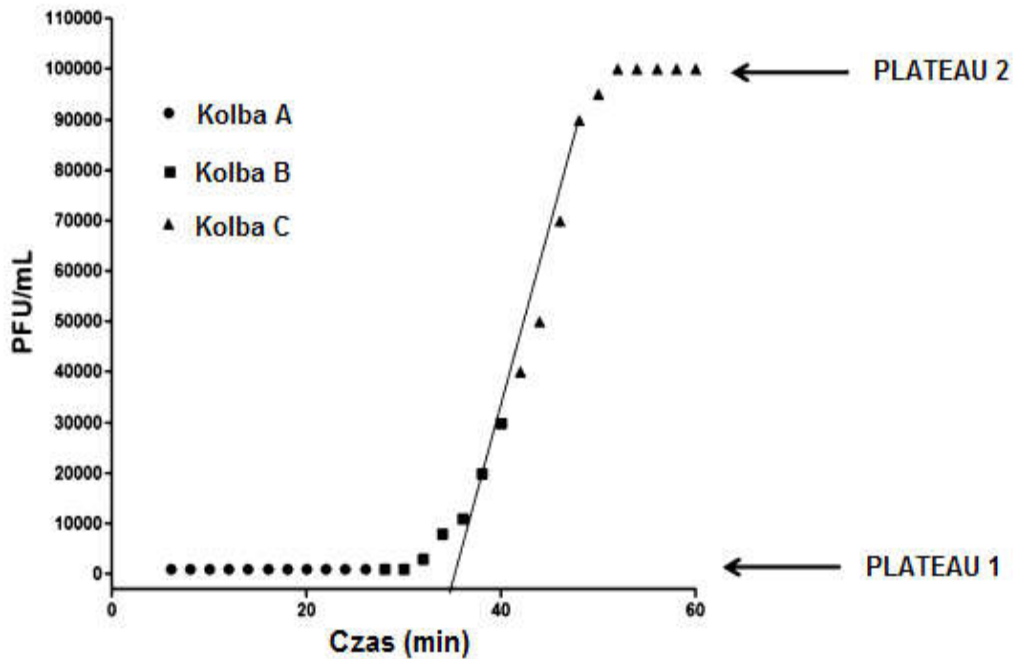
W oparciu o powyższy wzór wyliczano, jaki odsetek bakterii nie został zainfekowany – co definiowało wyrażenie „P(0)”. Po odjęciu od wartości „1” odsetku niezainfekowanych bakterii otrzymywano łączny odsetek zainfekowanych bakterii (przynajmniej 1 cząstką wirusową) opisany wzorem „1-P(0)”. Następnie w oparciu o powyższy wzór obliczano odsetek komórek zainfekowanych przez dokładnie 1 cząstkę infekcyjną – wyrażony jako „P(1)”. W oparciu o tak uzyskane dane wykonywano rachunek według wzoru „(P(1) / [1-P(0)]) * 100%”, który opisywał procentowy udział komórek bakteryjnych zainfekowanych przez dokładnie 1 cząstkę infekcyjną wśród wszystkich zainfekowanych komórek bakteryjnych dowolną ilością cząstek infekcyjnych większą od „0”. Im odsetek ten był bliższy 100%, tym z większą pewnością można było uznać ilość łąsin zaoferowanych na szalkach za ilość cząstek infekcyjnych obecnych w preparacie (w czasie pomiaru).

4.19.3 Określenie czasu latencji i plonu fagowego

Odmładzanie nocnej hodowli szczepu OS10 wykonywano w pożywce płynnej LB wzbogaconej o chlorek wapnia o końcowym stężeniu 2 mM, którego dodatek zwiększał wydajność adsorpcji cząstek fagowych do komórek szczepu *Serratia* sp. OS10. Po uzyskaniu $OD_{600} = 0,5$ przenoszono 9,9 ml odmłodzonej hodowli do kolby adsorpcyjnej. Do kolby adsorpcyjnej dodawano 0,1 ml zawiesiny fagowej o mianie 10^7 PFU/ml, jednocześnie zaczynając mierzenie czasu. Mieszaninę inkubowano w wytrząsarce w temperaturze 20 °C. Po 5 minutach przenoszono 0,1 ml zawartości z kolby adsorpcyjnej do „kolby A” zawierającej 9,9 ml pożywki płynnej LB, której zawartość następnie inkubowano w temperaturze 20 °C z wytrząsaniem (kolba A stanowiła jednocześnie odmłodzenie hodowli oraz 100-krotne rozcieńczenie mieszaniny z kolby adsorpcyjnej). Po upływie 5 minut pobierano z „kolby A” mieszaninę w ilości: (i) 1 ml do próbki opisanej literą „K” zawierającej 50 μ l chloroformu²; (ii) 100 μ l do próbki oznaczonej symbolem „A1” zawierającej 150 μ l nocnej hodowli OS10 oraz po określeniu czasu latencji w następnych podejściach dodawano (iii) 1 ml do „kolby B” zawierającej 9,9 ml jałowej pożywki płynnej

2 Rolą chloroformu było zabicie wszystkich komórek bakteryjnych w próbce. Skutkowało to wyeliminowaniem centrów infekcyjnych, które pochodzą z bakteriofagów zaadsorbowanych do komórek. Ewentualne łąsinki powstałe na szalce z kontrolą mogły pochodzić jedynie z niezaadsorbowanych cząstek infekcyjnych. Ponieważ jednak cząstki fagowe składane w zainfekowanych komórkach są infekcyjne jeszcze zanim nastąpi rozpad komórki, pomiary prób kontrolnych wykonywano tylko dla pierwszych 15 minut eksperymentu.

LB (co stanowi 10-krotne rozcieńczenie zawartości kolby A). Zawartość probówki opisanej literą „K” mieszano przez około 1 min, po czym przechowywano w lodzie – preparat ten stanowił układ odniesienia, obrazujący ilość niezaadsorbowanych cząstek fagowych. Zawartość kolby B wytrząsano równoległe z wytrząsaniem kolby A, a po kolejnych 5 minutach 1 ml zawartości z kolby B przenoszono do kolby C zawierającej 9 ml jałowej pożywki LB. Do probówki z oznaczeniem „A1” po wymieszaniu i 5-minutowej inkubacji dodawano 4 ml agaru półpłynnego, mieszano i rozprowadzano po agarze dolnym na szalce podpisanej numerem seryjnym „A1” zgodnie z procedurą opisaną w Podrozdziale 4.1. Odstępy między kolejnymi pomiarami następowały zależnie od potrzeb – wynosiły od 5 do 15 minut. Każdy z pomiarów miał swój indywidualny numer seryjny składający się z litery oznaczającej kolbę oraz liczby porządkowej dla danego momentu pomiarowego (przy czym pomiary dla kolb A, B i C wykonane w tym samym momencie od infekcji w kolbie adsorpcyjnej miały ten sam numer i różniły się tylko literą). W pierwszym podejściu określano: czy czas latencji jest krótszy od 60 minut; w związku z czym wszystkie 12 pomiarów odbywało się tylko dla kolby A i między każdymi dwoma był odstęp czasowy 5 minut. W następnym podejściu wykonywano 19 pomiarów (pomiary A1-A5 wykonywane co 10 minut, a pomiary A5-A19 wykonywane co 5 minut). Po określeniu czasu latencji wykonywano kolejne powtórzenie, tym razem w odstępach 15-minutowych dla pomiarów A1-A6 oraz w odstępach 5-minutowych dla pomiarów A6-A14 i B8-B20. Celem wprowadzenia do doświadczenia kolby B było określenie, czy faza plateau ustala się w obrębie 10-krotnego rozcieńczenia hodowli z zachowaniem policzalności łysinek na szalce (z kolby B), czy dopiero w obrębie 100-krotnego rozcieńczenia hodowli (z kolby C). Po ustaleniu czasu latencji, tj. czasu, po którym nastąpił wysyp nowych cząstek infekcyjnych z zainfekowanych komórek gospodarza, postanowiono, że w następnym podejściu do eksperymentu, na około 10 minut przed przewidywanym wysypem, zbierane będą z kolby B próbki po 100 µl równoległe z dotychczas zbieranymi pomiarami z kolby A – dzięki czemu określano, po jakim czasie kończył się pierwszy wysyp i zachodziła faza drugiego plateau. Czwarte i piąte podejście przewidywały wykorzystanie 3 kolb: kolby A, kolby B i kolby C, dla których wiadomo było zarówno: ile wynosi czas latencji oraz jaki jest czas, w którym dojdzie do drugiego plateau (Rycina 16).



Rycina 16. Wykres zależności miana faga w hodowli od czasu [Kropiński, 2018, zmienione].

Podczas projektowania wykresu w oparciu o ilość łysek mnożono ilość tych łysek przez współczynnik $(1000 \mu\text{l}/X) \cdot 10^Y$, gdzie X to objętość nakropienia (tu 10 μl) lub objętość próbki badanej w teście pełnoszalkowym (tu 100 μl), zaś Y to rząd wielkości rozcieńczenia próbki względem zawartości kolby A. Wykres przedstawiano w formie diagramu punktowego. W późniejszym wariacie procedury odpowiednikami kolejnych kolb były kolejne 10-krotne rozcieńczenia dla każdej próbki z kolby A.

5. Wyniki i dyskusja

5.1 Uzyskanie czystych kultur fagowych z próbki środowiskowej metodą szalek dwuwarstwowych i określenie ich morfologii

W celu uzyskania pojedynczych łyseinek stosowano metodę szalek dwuwarstwowych opisaną w Podrozdziale 4.1 oraz jako gospodarzy używano szczepy *Serratia* spp. OS10 i W54. Uzyskane łyseinki, na szalkach z ich policzalną ilością, porównano pod kątem ich morfologii, a wybrane nazwano od „Ł1” do „Ł10”. Niejednolita morfologia sugerowała, że w testowanej próbce znajdują się co najmniej dwa różne fagi (Tabela 8).

Tabela 8. Opis morfologii wyizolowanych łyseinek.

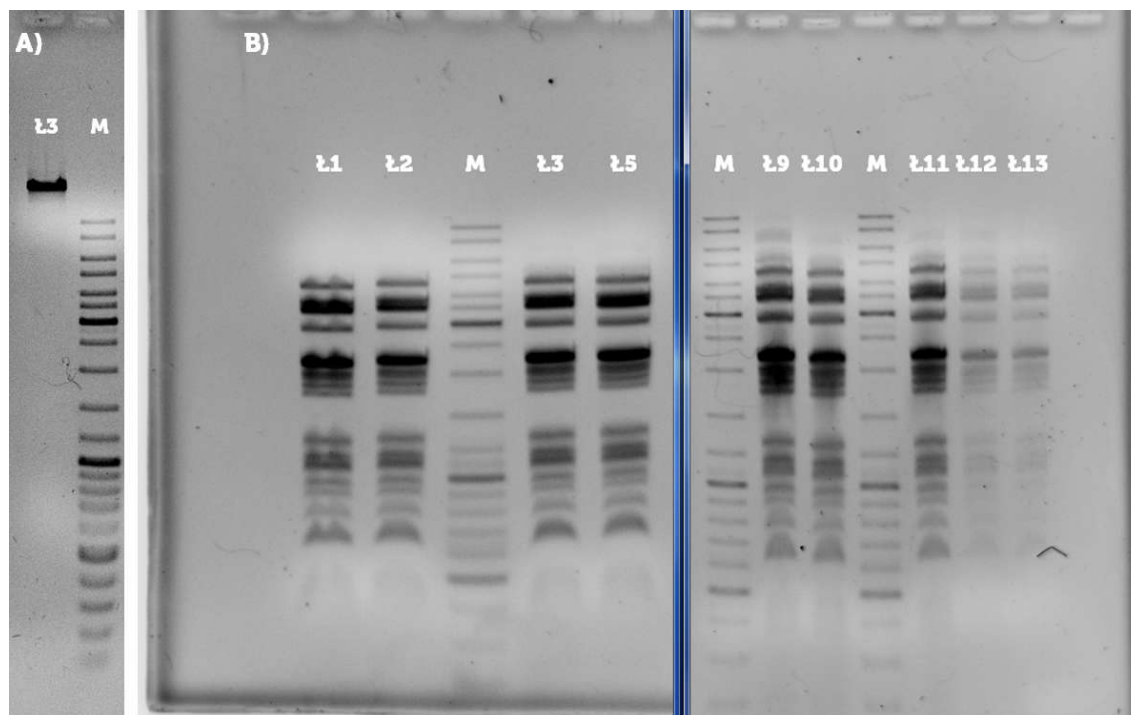
Nazwa	Opis morfologii	gospodarz
Ł1	Mała, $\varnothing=0,5\text{mm}$	OS10
Ł2	Duża, $\varnothing=1\text{mm}$, mętna w środku, okrągła	OS10
Ł3	Duża, $\varnothing=0,9\text{mm}$, okrągła z jednym rożkiem	OS10
Ł4	Duża, $\varnothing=0,9\text{mm}$, lekko owalna, mętna w środku, przejrzysta na obwodzie	W54
Ł5	Mała, $\varnothing=0,2\text{mm}$, okrągła, przejrzysta	OS10
Ł6	Mała, $\varnothing=0,5\text{mm}$, kwadratowa, przejrzysta	W54
Ł7	Średnia, $\varnothing=0,8\text{mm}$, 5-kątna, mętna w środku, przejrzysta na krawędzi	W54
Ł8	Duża, $\varnothing=0,9\text{mm}$, okrągła, cała mętna	OS10
Ł9	Mała, $\varnothing=0,4\text{mm}$, okrągła, duży przejrzysty obwód, mały mętny środek	OS10
Ł10	Mała, $\varnothing=0,5\text{mm}$, okrągła, przejrzysta w pełni	OS10

Zwrócono uwagę, że większość łyseinek, niezależnie od wielkości, była mętna, zaś wokół krawędzi łyseinki Ł9 zaobserwowano wyraźnie przejrzystą strefę. Ten fakt stał się pierwszą przesłanką do postawienia hipotezy, iż w badanej próbce obecne były bakteriofagi łagodne. Materiał z kilku pojedynczych łyseinek różniących się morfologią posłużył do namnożenia i izolacji cząstek fagowych (metoda opisana w Podrozdziale 4.2). Uzyskane zawiesiny były

następnie mianowane (Podrozdział 4.1) z wykorzystaniem tych samych co wcześniej (patrz wyżej) gospodarzy.

5.2 Analiza restrykcyjna izolatów DNA z badanych czystych kultur fagowych

Z zawiesin cząstek fagowych Ł1, Ł2, Ł3, Ł5, Ł9, Ł10, Ł11, Ł12 oraz Ł13 izolowano DNA zgodnie z metodą opisaną w Podrozdziale 4.3. Otrzymane próbki badano z użyciem aparatu Nano-Drop (Podrozdział 3.9). Na otrzymanych wykresach widoczny był charakterystyczny pik dla długości fali $\lambda = 250$ nm, co jest typowe dla DNA. Pozytywny rezultat izolacji genomu fagowego zgodnie z procedurą opisaną w Podrozdziale 4.3 potwierdził, że bakteriofag ϕ OS10 jest bakteriofagiem o materiale genetycznym DNA – gdyby materiałem genetycznym był RNA, doszłoby w tych warunkach doświadczalnych do degradacji, gdyż wykorzystane odczynniki nie są wolne od RNaz. Dla określenia formy DNA, z jakiej zbudowany jest genom, wykonywano elektroforezę genomu nieciętego enzymami restrykcyjnymi (Rycina 17A). Badany genom nie jest ssDNA, ponieważ genomy bakteriofagów ssDNA nigdy nie przekraczają długości 11 knt – nawet w sytuacji, gdyby genom ssDNA osiągał taką długość, to podczas elektroforezy migrowałby o wiele szybciej od dsDNA o identycznej długości, więc uzyskany prążek nie wychodziłby poza skalę wyznaczaną przez migrujący równolegle marker wielkości. W związku z tym, badanym materiałem genetycznym musiał być dsDNA. Ten sam rezultat uzyskano też dla pozostałych próbek.



Rycina 17. Elektroforegram genomowego DNA ϕ OS10 (Ł3). Długość genomu przekracza 10 kbp (A); Elektroforegram rozdziału DNA fagowego po cięciu enzymem Hinc II (B).

W oparciu o określone wcześniej stężenia poszczególnych próbek DNA, poddano je cięciu enzymem restrykcyjnym Hinc II, a następnie wykonano rozdział elektroforetyczny zgodnie z metodą opisaną w Podrozdziale 4.5 (Rycina 17B). Zauważono, że układ prążków był identyczny w każdym torze, co pozwoliło na wniosek, że każda z czystych kultur była tym samym rodzajem faga. Do dalszej analizy wybrano czystą kulturę nazwaną Ł3 ze względu na najwyższe miano tej zawiesiny (Podrozdział 5.1). Badanego bakteriofaga nazwano ϕ OS10.

5.3 Analiza bioinformatyczna

Identyfikacja ORFów w genomie bakteriofaga ϕ OS10 została przeprowadzona z użyciem programu RAST [Decewicz & Radlińska, dane nieopublikowane], a ich adnotację wykonywano w ramach niniejszej pracy programami: Artemis, BLAST P oraz HMMER (Podrozdział 4.17.2).

5.3.1 Analiza genomu bakteriofaga ϕ OS10

Genom ϕ OS10 miał długość 45 027 nt – wielkość ta jest typowa dla przedstawicieli rzędu *Caudovirales*, jednak wśród innych dotychczas zsekwencjonowanych bakteriofagów infekujących bakterie z rodzaju *Serratia* jest to długość stosunkowo niewielka: genomy zsekwencjonowanych bakteriofagów *Serratia* osiągają długości od 39 216 bp (bakteriofag 2050H2, Gene Bank MF285620.1) do 357 154 bp (bakteriofag BF, Gene Bank NC_041917.1), gdzie średnia długość genomu wynosiła 139 444 bp, a mediana 158 616 bp. Zestawienie wszystkich genomów bakteriofagów przedstawiono w Podrozdziale 1.7. Udział poszczególnych zasad azotowych w nici wiodącej zsekwencjonowanego genomu ϕ OS10 przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Zestawienie ilościowe udziału zasad azotowych w genomie ϕ OS10 oraz zawartość par CG.

Zasada	Zawartość [%]	Ilość [nt]
A	23,87%	10750
T	24,52%	11040
G	24,58%	11068
C	27,03%	12169
% GC	51,61%	

Zawartość par GC jest mniejsza niż w przypadku genomów bakterii z rodzaju *Serratia*, które do tej pory zsekwencjonowano np. w szczepie *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* Db11 wynosi 59,5% [Iguchi i in., 2014]; w szczepie *Serratia liquefaciens* ATCC 27592 wynosi 55,3% [Nicholson i in., 2013]; zaś w szczepie *Serratia proteamaculans* 568 wynosi 54,9% [Grkovic i in., 1995]. Sekwencję genomu ϕ OS10 przyrównano z użyciem narzędzia BLAST N do sekwencji genomów innych bakteriofagów infekujących *Serratia*. Wykryto podobieństwo sekwencji nukleotydowej bakteriofaga ϕ OS10 jedynie do dwóch spośród 20 poznanych i zsekwencjonowanych wcześniej fagów *Serratia* (Rycina 18):

- do bakteriofaga Parlo (Gene Bank MK618715.1) w dwóch segmentach (o długości 381 nt, gdzie $e = 2 * 10^{-133}$; oraz o długości 42 nt, gdzie $e = 1 * 10^{-12}$), co stanowi w sumie 0,67% długości genomu bakteriofaga Parlo;

- do bakteriofaga η (Gene Bank NC_021563.1) w czterech segmentach (o długości 96 nt, gdzie $e = 2 * 10^{-33}$; o długości 98 nt, gdzie $e = 2 * 10^{-27}$; o długości 35 nt, gdzie $e = 3 * 10^{-11}$ i o długości 32 nt, gdzie $e = 1 * 10^{-9}$), co stanowi w sumie 0,61% długości genomu bakteriofaga η .

```

> Eta_1 NC_021563.1 (13351-13446)
caccgagctgcgggaggccaaatgaaagagcgcccagtgattttcaacggtgagatggttcgcgccatcctcgac
ggacgcaagacgcagacacgc

> Eta_2 NC_021563.1 (13942-14039)
tccatttacggggaagaaagctggagcgctaatccctgggtatgggtgatcgagtttcgctcgtgtgggaggtgcg
tgatgccagcaaatgaactgaag

> Eta_3 NC_021563.1 (13035-13069)
tgaaggctgagcgcgatgcgctggctgtggagaat

> Eta_4 NC_021563.1 (15953-15984)
ggcttcaccgtagaggggggatgagtagatggc

> Parlo_1 MK618715.1 (16408-16788)
ggctaaccgggaggcgcagccgggtgtatcaatgccgcttcttcaactaccgatattgacggaaaacaaatcgggtga
gtggcaggatatggataaagggttctatgaccaatacgaaccacactgccgcgcgcttttgttcaccgccccgcc
tgcgctaggagtgccggatggggttatgccaggcgggtctaggctactcatcagcgcctacctgagtttgaaagcaa
cgacagcgataaggttggatgatcactgctttatcagcgggtcaaactcgaagcgtggaaagccaagagcaggc
gtatgccgacgccaaggctgtaattaacgcctaccgcgcgcgaatgctggctcaaccgtaagccagggttacia
gttacc

> Parlo_2 MK618715.1 (15944-15984)
cgcgccgctggcttcaccgtagaggggggatgagtagatggc

```

Rycina 18 Sekwencje nukleotydowe segmentów genomu ϕ OS10 wykazujące podobieństwo do genomów bakteriofagów η i Parlo.

Sekwencje przedstawione na Rycinie 18 zbadano z użyciem narzędzia BLAST X, w wyniku czego udało się zadnotować jedynie sekwencje:

- Parlo_1, którą dopasowano do hipotetycznego białka bakteriofaga Parlo ($e = 2 * 10^{-77}$) (Gene Bank QBQ72186.1);
- Eta_1, którą dopasowano do hipotetycznego białka *S. marcescens* ($e = 8 * 10^{-11}$) (Gene Bank TQI84827.1);
- Eta_2, którą dopasowano do białka „restriction alleviation protein” z rodziny białek Lar, należącego do *S. marcescens* ($e = 1 * 10^{-8}$) (Gene Bank WP_080431124.1). Białko to odpowiedzialne jest za modulację systemów restrykcji i modyfikacji [King & Murray, 1995].

We względu na niskie wartości pokrycia (0,67% dla bakteriofaga Parlo i 0,61% dla bakteriofaga η) nie można uznać tych bakteriofagów za spokrewnione z bakteriofagiem φOS10 – podobieństwo tych sekwencji jest najprawdopodobniej przypadkowe lub spowodowane nabyciem ich na drodze zdarzeń rekombinacyjnych. Powyższe wyniki wykluczają jakiegokolwiek istotne podobieństwo genomu bakteriofaga φOS10 do innych dotychczasowo zsekwencjonowanych bakteriofagów *Serratia* oraz jakichkolwiek innych zsekwencjonowanych bakteriofagów, w związku z czym jest on unikatowy i stanowi ważny wkład w wiedzę o bakteriofagach *Serratia*. Genom φOS10 przeanalizowano z użyciem programu ARAGORN [Laslett i in., 2004] pod kątem obecności genów kodujących tRNA (Podrozdział 4.17.5), nie znaleziono w genomie sekwencji kodujących tRNA.

W genomie φOS10 zidentyfikowano 71 otwartych ramek odczytu (ORF) o wielkości co najmniej 50 nt. Najmniejszy z nich (ORF 14) ma długość 122 nt, a największy (ORF 45) ma długość 2381 nt. Średnia długość ORF wynosi około 583 nt. Zidentyfikowane ORFy stanowią 91,86% zsekwencjonowanego genomu. ORFy zawarte są zarówno na nici wiodącej i nici komplementarnej, z czego 43 ORFy znajdują się na nici wiodącej, a 28 ORFów znajduje się na nici komplementarnej. Adnotację genomu φOS10 wykonywano z wykorzystaniem programu Artemis, w którym możliwa jest wizualizacja ORFów (Rycina 19). Każdej ORF nadano numery porządkowe od 1 do 71.



Rycina 19. Analiza bioinformatyczna z użyciem programu Artemis.

Dla każdej ORF zaznaczonej w sekwencji nukleotydowej wygenerowano z pomocą programu Artemis sekwencje białek przez nie kodowanych, dla których następnie z użyciem programu BLAST P wyszukiwano w bazach UniProt oraz NCBI rekordów o największym pokryciu, największej identyczności sekwencji oraz najmniejszej „E-wartości” (Podrozdziały 1.6.3 i 4.17). Wyniki adnotacji zestawiono w Tabeli 10. Domniemany produkt białkowy jednej ze zidentyfikowanych ORF został zaadnotowany jako integraza, co stanowiło następną przesłankę do postawienia hipotezy, że bakteriofag ϕ OS10 jest łagodny (pierwszą były mętne łyśinki, Podrozdział 5.1). Innymi przypuszczalnymi produktami białkowymi ORFów były między innymi białko portalowe (ORF 68) i terminaza (ORF 70). Nie udało się dopasować do białek o znanych funkcjach domniemanych produktów białkowych 19 ORFów spośród 71 zidentyfikowanych (co stanowi około 27%). Rezultat ten jest satysfakcjonujący zważywszy na fakt, że w innych przypadkach odsetek ORFów o niezidentyfikowanej funkcji może wynosić 33% [Dziewit i in., 2014] lub nawet 60% [Santos i in., 2011]. Przy przewidywaniu funkcji białek fagowych bardzo pomocna jest lokalizacja kodujących je ORFów, gdyż genomy wirusów mają budowę modułową, jak wspomniano w podrozdziale 1.3. W związku z tym położenie ORFu o nieznannej funkcji, w otoczeniu ORFów, którym przypisuje się określone funkcje, jest wskazówką co do prawdopodobnej funkcji jej produktu białkowego. Należy podkreślić, że funkcje przypisane produktom zidentyfikowanych ORFów są tylko przypuszczalne, potwierdzenie tych funkcji wymaga testów eksperymentalnych. Obok przeszukania programem BLAST P jeszcze innym sposobem przewidywania funkcji białek jest dopasowanie ich sekwencji aminokwasowych do sekwencji domen białek, których funkcje określono eksperymentalnie. W niniejszej pracy wykorzystano do tego celu program HMMER (Podrozdział 1.6.4).

Tabela 10. Zestawienie wyników adnotacji ORFów faga ϕ OS10. Nazwy wszystkich domniemanych funkcji białek zapisano w języku angielskim, ze względu na brak polskich odpowiedników dla nazw niektórych białek.

ORF	Region kodujący (bp)	Orientacja	Wielkość białka (aa)	Prawdopodobna funkcja (<i>motywy i domeny</i>)	Największe podobieństwo (program BLAST P)			
					Procent identyczności (aminokwasy [§]) (<i>koordynaty motywu</i>)	e-value	Organizm	Numer w GenBank (<i>numer pfam</i>) (<i>numer EC</i>) (<i>numer supfam</i>)
1	77-301	←	74	hypothetical protein	38/68(56%)	$3 * 10^{-18}$	<i>Serratia marcescens</i>	WP_072264995.1
2	280-525	←	81	hypothetical protein (<i>Protein of unknown</i>)	61/81(75%)	$4 * 10^{-33}$	<i>Serratia marcescens</i>	WP_118892208.1 (<i>PF11684.8</i>)

				<i>function)</i>				
3	550-1194	←	214	minor tail protein (coiled-coil motive)	67/212(32%)	$7 * 10^{-28}$	<i>Rhodobacter phage RcSaxon</i>	AKY02713.1
4	1236-1376	←	46	DEAD/DEAH box helicase (Zinc finger, C2H2 type)	14/31(45%)	$3 * 10^{-10}$	<i>Roseomonas stagni</i>	WP_092963283.1 (PF00096.26)
5	1373-1627	←	84	DNA polymerase III subunit theta (DNA polymerase III, theta subunit)	82/84(98%)	$8 * 10^{-62}$	<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_115059749.1 (PF06440.11)
6	2037-2561	←	174	DUF2570 domain-containing protein (Phage shock protein B)	123/166(74%)	$7 * 10^{-93}$	<i>Serratia sp. YD25</i>	WP_063919321.1 (PF06667.12)
7	2558-3088	←	176	putative lysis protein (Phage lysozyme)	136/175(78%)	$2 * 10^{-107}$	<i>Pectobacterium phage ZF40</i>	YP_007006943.1 (PF00959.19)
8	3090-3386	←	98	phage 21-like group II holin (Bacteriophage holin family HPI)	15/50(30%)	$1 * 10^{-06}$	<i>Bacteriophage APSE-7</i>	WP_016857351.1 (PF16080.5)
9	3554-3928	←	124	hypothetical protein (RcsF lipoprotein)	117/124(94%)	$4 * 10^{-91}$	<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_115058997.1 (PF16358.5)
10	4225-4929	←	234	antitermination protein (Antitermination protein)	218/234(93%)	$3 * 10^{-169}$	<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_115059758.1 (PF03589.13)
11	4926-5282	←	118	RusA family crossover junction endodeoxyribonuclease (Endodeoxyribonuclease RusA)	117/118(99%)	$8 * 10^{-90}$	<i>Serratia marcescens</i>	WP_060431945.1 (PF05866.11)
12	5279-6253	←	324	DUF968 domain-containing protein (Protein of unknown function DUF968)	318/324(98%)	0,0	<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_115059762.1 (PF06147.11)
13	6250-7272	←	340	DNA-binding protein (Conserved phage C-terminus Phg_2220_C)	313/339(92%)	0,0	<i>Serratia liquefaciens ATCC 27592</i>	AGQ28749.1 (PF09524.10)
14	7269-7391	←	40	DUF4222 domain-containing protein (Domain of unknown function DUF4222)	39/40(98%)	$3 * 10^{-29}$	<i>Serratia liquefaciens</i>	WP_116690624.1 (PF13973.6)
15	7441-8181	←	246	KiLA-N domain-containing protein (KiLA-N domain)	240/245(98%)	0,0	<i>Serratia liquefaciens</i>	WP_116690625.1 (PF04383.13)
16	8196-8468	←	90	hypothetical protein	88/90(98%)	$6 * 10^{-68}$	<i>Serratia liquefaciens</i>	WP_116690626.1
17	8477-8791	←	104	hypothetical protein	98/104(94%)	$4 * 10^{-72}$	<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_115059769.1
18	8809-8961	←	50	XRE family transcriptional regulator	49/50(98%)	$7 * 10^{-37}$	<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_115059771.1

19	9156-9896	→	246	XRE family transcriptional regulator (<i>Cro/C1-type HTH DNA-binding domain</i>)	245/246(99%) (18-78)	0,0	<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_115059773.1 (PF13443.6)
20	10433-10696	→	87	glycosyl transferase family 1, partial (<i>Putative pyruvate format-lyase activating enzyme DUF1786</i>)	18/40(45%)	$1 * 10^{-08}$	<i>Desulfosporosinus sp. BICA1-9</i>	KJS90102.1 (PF08735.10)
21	10714-10923	→	69	lysine-2,3-aminomutase, EmpB	57/69(83%)	$2 * 10^{-43}$	<i>Serratia grimesii</i>	WP_037419410.1
22	10953-11081	→	42	hypothetical protein HMPREF1564_3580 (<i>Helical box domain of E3 ubiquitin-protein ligase HECW1</i>)	28/38(74%)	$1 * 10^{-19}$	<i>Providencia alcalifaciens R90-1475</i>	EUD08463.1 (PF18436.1)
23	11487-11699	→	70	hypothetical protein (<i>Ribosomal protein L33</i>)	67/70(96%)	$2 * 10^{-52}$	<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_115059007.1 (PF00471.20)
24	11693-11836	→	47	hypothetical protein M495_10455 (<i>transmembrane motive</i>)	47/47(100%)	$8 * 10^{-36}$	<i>Serratia liquefaciens ATCC 27592</i>	AGQ30852.1
25	11839-12075	→	78	hypothetical protein	78/78(100%)	$1 * 10^{-60}$	<i>Serratia liquefaciens</i>	WP_116690632.1
26	12079-12921	→	280	chromosome partitioning protein ParB (<i>Crp-like helix-turn-helix domain</i>)	274/280(98%)	0,0	<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_012006454.1 (PF13545.6)
27	12905-13375	→	156	Gp37 (tail fiber protein)	49/113(43%)	$1 * 10^{-25}$	<i>Escherichia virus HK97</i>	NP_037722.1
28	13372-14019	→	215	hypothetical protein (<i>ASCH domain</i>)	145/214(68%)	$4 * 10^{-91}$	<i>Serratia marcescens</i>	WP_101456383.1 (PF04266.14)
29	14019-14240	→	73	molecular chaperone DnaJ (<i>Restriction alleviation protein Lar</i>)	64/70(91%)	$4 * 10^{-50}$	<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_085115658.1 (PF14354.6)
30	14233-14496	→	87	hypothetical protein	73/87(84%)	$3 * 10^{-17}$	<i>Serratia marcescens</i>	WP_141958176.1
31	14489-14758	→	89	hypothetical protein	72/89(81%)	$4 * 10^{-51}$	<i>Serratia marcescens</i>	WP_060429489.1
32	14777-15259	→	160	putative phage replication protein	17/48(35%)	$2 * 10^{-06}$	<i>Lactobacillus phage phiPYB5</i>	YP_009167807.1
33	15259-15450	→	63	hypothetical protein BVG97_16260 ead/Ea22-like family protein	52/59(88%) 32/66(48%)	$3 * 10^{-38}$ $4 * 10^{-12}$	<i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia marcescens</i>	ASL89067.1 WP_052475410.1
34	15443-15979	→	178	ead/Ea22-like family protein (<i>Ead/Ea22-like protein</i>)	48/57(84%)	$1 * 10^{-32}$	<i>Serratia quinivorans</i>	WP_112347612.1 (PF13935.6)
35	15980-16234	→	84	hypothetical protein	78/84(93%)	$1 * 10^{-62}$	<i>Serratia plymuthica</i>	WP_064798928.1
36	16244-16945	→	233	putative pmgU (<i>Xeroderma pigmentosum group B</i>)	25/43(58%)	$2 * 10^{-16}$	<i>Escherichia coli 2-474-04_S4_C2</i>	KDZ03155.1 (PF18458.1)

				<i>helicase damage recognition domain</i>				
37	16991-17260	→	89	uncharacterised protein	87/89(98%)	$1 * 10^{-66}$	<i>Serratia marcescens</i>	SAY41700.1
38	17276-17494	→	72	hypothetical protein <i>(Ribonuclease R winged-helix domain)</i>	66/69(96%)	$5 * 10^{-49}$	<i>Serratia sp.</i>	WP_046372826.1 <i>(PF08461.10)</i>
39	17514-17723	→	69	hypothetical protein	68/69(99%)	$6 * 10^{-53}$	<i>Serratia liquefaciens</i>	WP_116691155.1
40	17726-18106	→	126	hypothetical protein	125/126(99%)	$2 * 10^{-98}$	<i>Serratia liquefaciens</i>	WP_116690638.1
41	18122-18304	→	60	ANR family transcriptional regulator	59/60(98%)	$2 * 10^{-44}$	<i>Serratia quinivorans</i>	WP_112347617.1
42	18307-18969	→	220	DNA methyltransferase <i>(MT-A70) (S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases)</i>	208/220(95%)	$4 * 10^{-164}$	<i>Serratia liquefaciens</i>	WP_046372823.1 <i>(PF05063.14) (53335)</i>
43	19351-20514	→	387	site-specific integrase <i>(Phage integrase family) (Lambda integrase-like, catalytic core)</i>	375/387(97%)	0,0	<i>Serratia grimesii</i>	WP_037419381.1 <i>(PF00589.22) (56350)</i>
44	20794-21699	←	301	hypothetical protein	262/301(87%)	0,0	<i>Serratia marcescens</i>	WP_060706314.1
45	21700-24081	←	793	tail lysin	83 to 176 25/95(26%) 154 to 220 19/76(25%) 295 to 306 6/12(50%) 1155 to 1219 20/71(28%) 560 to 567 5/8(63%)	$1 * 10^{-04}$	<i>Bacillus phage SageFayge</i>	YP_009280906.1
46	24191-24364	→	57	lysyl-tRNA synthetase, class I <i>(transmembrane domain)</i>	43/56(77%)	$5 * 10^{-32}$	<i>Photorhabdus luminescens BAI</i>	EYU16219.1
47	24402-24674	→	90	transcriptional regulator <i>(lambda repressor-like DNA-binding domains)</i>	84/90(93%)	$2 * 10^{-64}$	<i>Serratia marcescens</i>	WP_072269370.1 <i>(1.10.260.40)</i>
48	24684-25814	→	376	Acyltransferase <i>(Acyltransferase family)</i>	339/376(90%)	0,0	<i>Serratia marcescens</i>	WP_072269371.1 <i>(PF01757.22)</i>
49	25845-26333	←	162	phage tail protein, partial <i>(Pectinesterase domain)</i>	51/62(82%)	$8 * 10^{-36}$	<i>Bacillus sp. SRB_28</i>	RAN85254.1 <i>(EC 3.1.1.11)</i>
50	26377-27051	←	224	DUF2313 domain-containing protein <i>(DUF2313)</i>	211/224(94%)	$2 * 10^{-165}$	<i>Serratia marcescens</i>	WP_060441827.1 <i>(PF10076.9)</i>
51	27048-28196	←	382	baseplate J/gp47 family protein <i>(Baseplate J-like protein)</i>	368/382(96%)	0,0	<i>Serratia sp. C-1</i>	WP_062790438.1 <i>(PF04865.14)</i>
52	28200-28637	←	145	putative tail protein <i>(Phage protein GP46)</i>	19 to 98 43/82(52%)	$3 * 10^{-23}$	<i>Enterobacteria phage Sfl</i>	WP_000424732.1 <i>(PF07409.12)</i>

					119 to 136 8/18(44%)				
					53 to 66 4/14(29%)				
53	28634-29224	←	196	Phage baseplate assembly protein V <i>(Bacteriophage Mu Gp45 protein)</i> <i>(Phage spike trimer)</i> <i>(Acetyl-CoA-carboxylase domain)</i>	182/196(93%) <i>(19 to 117)</i> <i>(126 to 163)</i> <i>(83 to 145)</i>	$2 * 10^{-132}$	<i>Serratia proteamaculans</i>	SMB46877.1 <i>(PF06890.12)</i> <i>(PF18715.1)</i> <i>(EC 6.4.1.2)</i>	
54	29224-30294	←	356	phage tail protein <i>(Phage late control gene D protein GPD)</i>	345/356(97%)	0,0	<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_085118850.1 <i>(PF05954.11)</i>	
55	30291-31694	←	467	dna circulation family protein <i>(DNA circularisation protein N-terminus)</i>	421/467(90%)	0,0	<i>Lasius niger</i>	KMQ87046.1 <i>(PF07157.12)</i>	
56	31731-33650	←	639	lytic transglycosylase domain-containing protein <i>(MSP7-like protein C-terminal domain)</i>	385/655(59%)	0,0	<i>Serratia sp. Nf2</i>	WP_107228138.1 <i>(PF12948.7)</i>	
57	33772-34062	←	96	phage tail assembly protein <i>(Phage tail assembly chaperone proteins, E, or 41 or 14)</i>	92/96(96%)	$7 * 10^{-71}$	<i>Serratia sp. C-1</i>	WP_062790456.1 <i>(PF10109.9)</i>	
58	34064-34432	←	122	phage tail protein <i>(Phage tail tube protein)</i>	122/122(100%)	$1 * 10^{-92}$	<i>Serratia sp. C-1</i>	WP_062790459.1 <i>(PF10618.9)</i>	
59	34442-35947	←	501	phage tail protein <i>(Phage tail sheath protein beta-sandwich domain)</i> <i>(Phage tail sheath protein subtilisin-like domain)</i> <i>(Phage tail sheath C-terminal domain)</i>	474/501(95%) <i>(99 - 246)</i> <i>(210 - 373)</i> <i>(381 - 495)</i>	0,0	<i>Serratia proteamaculans</i>	WP_085118840.1 <i>(PF17481.2)</i> <i>(PF04984.14)</i> <i>(PF17482.2)</i>	
60	35944-36138	←	64	DUF2635 domain-containing protein <i>(DUF2635)</i>	59/64(92%) <i>(3 - 48)</i>	$4 * 10^{-44}$	<i>Serratia sp. C-1</i>	WP_062790465.1 <i>(PF10948.8)</i>	
61	36143-36685	←	180	ATP-binding protein <i>(coiled-coil motive)</i>	167/180(93%) <i>(76 - 110)</i>	$2 * 10^{-129}$	<i>Serratia sp. Nf2</i>	WP_107228160.1	
62	36682-37026	←	114	head-to-tail joining protein <i>(Phage tail proteins domain)</i>	34/104(33%)	$7 * 10^{-10}$	<i>Rhodobacter phage RcRhea</i>	YP_009213476.1 <i>(EC 2.40.10.180)</i>	
63	37026-37448	←	140	hypothetical protein <i>(putative capsid protein)</i>	109/140(78%)	$2 * 10^{-56}$	<i>Serratia symbiotica</i>	WP_040264829.1 <i>(PF12226.8)</i>	
64	37450-38499	←	349	major capsid protein <i>(Phage major capsid)</i>	322/349(92%)	0,0	<i>Citrobacter freundii</i>	WP_115601857.1 <i>(PF03864.15)</i>	

				protein E) (putative capsid protein of prophage domain like) (capsid protein of prophage domain) (putative capsid protein of prophage domain like)				(3.15.30.10) (3.30.1930.10) (3.15.30.10)
65	38603-39004	←	133	head decoration protein (Bacteriophage lambda head decoration protein D)	123/133(92%)	$7 * 10^{-94}$	<i>Serratia marcescens</i>	WP_060425447.1 (PF02924.14)
66	39004-39603	←	199	Uncharacterised protein	168/201(84%)	$3 * 10^{-89}$	<i>Serratia marcescens</i>	CVA09345.1
67	39607-40467	←	286	S49 family peptidase (2-enoyl-CoA Hydratase)	272/285(95%)	0,0	<i>Serratia symbiotica</i>	WP_006708310.1 (3.90.226.10)
68	40464-42044	←	526	phage portal protein (Phage portal protein, lambda family)	503/526(96%)	0,0	<i>Serratia symbiotica</i>	WP_040262924.1 (PF05136.13)
69	42110-42373	←	87	phage head-tail adapter protein (Head-to-tail joining protein W)	72/87(83%)	$1 * 10^{-52}$	<i>Photorhabdus luminescens</i>	WP_105396969.1 (PF02831.15)
70	42382-44361	←	659	phage terminase large subunit family protein (Phage terminase large subunit GpA)	635/659(96%)	0,0	<i>Serratia marcescens</i>	WP_060425444.1 (PF05876.12)
71	44333-44932	←	199	terminase small subunit (Homeodomain-like domain)	50/201(25%)	$4 * 10^{-06}$	<i>Synechococcus phage S-LBS1</i>	ATS93173.1 (PF13384.6)

Za pomocą narzędzia BLAST P udało się określić możliwe funkcje aż 54 ORFów. Dalsza analiza, bazująca na obecności domen białkowych i ukrytych modeli Markowa, umożliwiła określenie potencjalnych funkcji dla kolejnych 7 ORFów [Söding, 2004].

5.3.2 Adnotacja otwartych ramek odczytu w genomie bakteriofaga ϕ OS10

Na drodze analizy bioinformatycznej z użyciem programów BLAST P oraz HMMER przeprowadzono adnotację ORFów, co umożliwiło poznanie potencjalnych funkcji domniemych produktów białkowych:

ORF 3 – potencjalne białko o długości 214 aa, będące produktem tej ORF, wykryto podobieństwo tego białka do białka strukturalnego ogonka faga *Rhodobacter* RcSaxon ($e = 7 * 10^{-28}$) (Gene Bank AKY02713.1). Białko to uczestniczy w etapie składania

wirusowych cząstek potomnych i jest niezbędne do wytworzenia funkcjonalnego ogonka [Bollivar i in., 2016] (Podrozdział 1.4);

ORF 4 – koduje potencjalne białko długości 46 aa o prawdopodobnej funkcji helikazy DEAD/DEAH ($e = 3 * 10^{-10}$) (Gene Bank WP_092963283.1), białko to posiada motyw palca cynkowego typu C2H2 (pfam PF00096.26), który jest identyfikowany m.in. u regulatorów transkrypcji [Rohozková i in., 2014];

ORF 5 – domniemany produkt tej ORF o długości 84 aa na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowych dopasowano do podjednostki theta polimerazy III DNA ($e = 8 * 10^{-62}$) (Gene Bank WP_115059749.1; pfam PF06440.11). Podjednostka θ jest jedną z 3 podjednostek tworzących heterodimer polimerazy III DNA razem z podjednostkami α i ϵ [Slater i in., 1994];

ORF 6 – prawdopodobny produkt tego genu o długości 174 aa wykazuje podobieństwo do białka Phage shock protein B ($e = 7 * 10^{-93}$) (Gene Bank WP_063919321.1; pfam PF06667.12), którego gen go kodujący zidentyfikowano w genomie *Serratia* sp. YD25. Ekspresja białek z grupy Psp (ang. *phage shock protein*) zachodzi pod wpływem czynników stresowych takich jak: szok cieplny, obecność etanolu w otoczeniu, szok osmotyczny lub infekcja fagowa [Brissette i in., 1991];

ORF 7 – potencjalny produkt białkowy o długości 176 aa powstający na drodze ekspresji ORF 7, wykazuje podobieństwo do domeny lizozymu faga *Pectobacterium* ZF40 ($e = 2 * 10^{-107}$) (Gene Bank YP_007006943.1; pfam PF00959.19);

ORF 8 – przypuszczalny produkt białkowy ma długość 98 aa, który wykazuje podobieństwo do białka holiny grupy II ($e = 1 * 10^{-06}$) (Gene Bank WP_016857351.1) zawierającego domenę właściwą dla bakteriofagowych holin z rodziny HP1 (pfam PF16080.5). Mechanizm działania tego białka polega na formowaniu porów w strukturze błony komórkowej gospodarza, dzięki czemu możliwe jest dotarcie fagowego lizozymu do ściany komórkowej [Esposito i in., 1996]. Oba te białka kodowane są przez geny zlokalizowane blisko siebie (w tym przypadku są to następujące po sobie ORF 7 i ORF 8);

ORF 9 – w jego domniemanym produkcie białkowym o długości 124 aa wykryto podobieństwo do lipoproteiny RcsF ($e = 4 * 10^{-91}$) (Gene Bank WP_115058997.1; pfam PF16358.5);

ORF 10 – hipotetyczne białko kodowane przez tą ORF ma długość 234 aa. Wykazuje podobieństwo do białka antyterminatora ($e = 3 * 10^{-169}$) (Gene Bank WP_115059758.1; pfam PF03589.13) kodowanego w genomie *S. proteamaculans*. Mechanizm działania antyterminatora bazuje na interakcji tego białka z polimerazą RNA, co prowadzi do pominięcia sekwencji terminatora i dalszej transkrypcji [Roberts i in., 1998];

ORF 11 – potencjalne białko kodowane przez tą ORF ma długość 118 aa. Białko wykazuje podobieństwo do endodeoksyrybonukleazy RusA ($e = 8 * 10^{-90}$) (Gene Bank WP_060431945.1) kodowanej przez *S. marcescens*, Białko o takiej funkcji jest u organizmów komórkowych zaangażowane w naprawę chromosomalnego DNA na drodze rekombinacji homologicznej [Rafferty i in., 2003]. Jak wspomniano w Podrozdziale 1.3 fagi wykazują mozaikową budowę genomu, Jest to możliwe dzięki fagowym rekombinazom przeprowadzającym wymianę modułów funkcjonalnych;

ORF 13 – potencjalne białko o długości 340 aa będące produktem ORF 13 wykazuje podobieństwo do białka wiążącego DNA ($e = 0,0$) (Gene Bank AGQ28749.1) kodowanego przez *S. liquefaciens* ATCC 27592;

ORF 15 – hipotetyczne białko będące produktem tej ORF ma długość 246 aa. W sekwencji aminokwasowej tego białka wykryto podobieństwo do domeny Kila-N ($e = 0,0$) (Gene Bank WP_116690625.1; pfam PF04383.13) kodowanego przez *S. liquefaciens*;

ORF 18 – białko to będące przypuszczalnym produktem ORF 18 ma długość 50 aa. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowych za pomocą programu BLAST P wykryto podobieństwo białka do regulatora transkrypcji z rodziny białek XRE (ang. *xenobiotic responsive element*) ($e = 7 * 10^{-37}$) (Gene Bank WP_115059771.1) kodowanego przez *S. proteamaculans*. Białka z tej grupy indukowane są pod wpływem substancji ksenobiotycznych [Matsushita i in., 1993];

ORF 19 – białko to będące prawdopodobnym produktem ORF 19 ma długość 246 aa. Podobnie jak w przypadku ORF 18, na podstawie analizy programem BLAST P wykryto podobieństwo jego sekwencji aminokwasowych do regulatora transkrypcji z rodziny białek XRE ($e = 0,0$) (Gene Bank WP_115059773.1). U domniemanego produktu ORF 19 zidentyfikowano też domenę HTH wiążącą DNA typu Cro/C1 ($e = 2,4 * 10^{-05}$)

(pfam PF13443.6) – białko to jest więc najprawdopodobniej przełącznikiem uczestniczącym w decyzji o wejściu w cykl lityczny lub lizogenny [Echols i in., 1973];

ORF 20 – domniemany produkt tej ORF o długości 87 aa wykazuje podobieństwo do białka o funkcji glikozylotransferazy ($e = 1 * 10^{-08}$) (Gene Bank KJS90102.1). Znaczenie tego białka w cyklu infekcyjnym nie jest bliżej poznane;

ORF 21 – hipotetyczne białko o długości 69 aa wykazuje podobieństwo do białka pełniącego funkcję lizyno-2,3-aminomutazy ($e = 2 * 10^{-43}$) (Gene Bank WP_037419410.1) kodowanego przez *Serratia grimesii*. Zadaniem tego typu białek jest transport grupy aminowej z pozycji α w pozycję β cząsteczki lizyny [Lepore i in., 2005];

ORF 26 – przypuszczalny produkt białkowy tej ORF ma długość 280 aa i wykazuje podobieństwo do białka partycyjnego ParB ($e = 0,0$) (Gene Bank WP_012006454.1) kodowanego przez *S. proteamaculans*;

ORF 27 – domniemany produkt białkowy ORF 27 ma długość 156 aa, wykazuje podobieństwo do białka włókienek ogonka ($e = 1 * 10^{-25}$) (Gene Bank NP_037722.1) kodowanego przez faga *Escherichia* HK97. Włókienka ogonka rozpoznają na powierzchni bakterii specyficzne receptory [Krasnykh i in., 2001];

ORF 28 – przypuszczalne białko będące produktem tej ORF ma długość 215 aa. wykazuje podobieństwo do domeny ASCH ($e = 4 * 10^{-91}$) (Gene Bank WP_101456383.1 kodowanego przez *S. marcescens*), która występuje u białek procesujących RNA [Iyer i in., 2005];

ORF 29 – domniemany produkt ORF 29 o długości 73 aa wykazuje podobieństwo do białka chaperonowego DnaJ uczestniczącego w prawidłowym fałdowaniu białek ($e = 4 * 10^{-50}$) (Gene Bank WP_085115658.1) [Cyr i in., 1994];

ORF 32 – przypuszczalny produkt białkowy kodowany przez tą ORF ma długość 160 aa i wykazuje podobieństwo do białka replikacyjnego ($e = 2 * 10^{-06}$) (Gene Bank YP_009167807.1). Mechanizm replikacji omówiono w Podrozdziale 1.4;

ORF 33 – domniemany produkt białkowy o długości 63 aa będący produktem ORF 33 dopasowano na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowych do białka z rodziny

ead/Ea22-podobnych. Przedstawiciele tej rodziny są białkami wczesnymi replikacji bakteriofagów λ oraz P22 [ncbi.nlm.nih.gov] ($e = 4 * 10^{-12}$) (Gene Bank WP_052475410.1);

ORF 34 – białko będące potencjalnym produktem ORF 34 ma długość 178 aa, w oparciu o podobieństwo sekwencji aminokwasowych dopasowano je do białek z rodziny ead/Ea22-podobnych (patrz ORF 33) ($e = 1 * 10^{-32}$) (Gene Bank WP_112347612.1; pfam PF13935.6);

ORF 36 – w domniemanym produkcie białkowym o długości 233 aa kodowanym przez tę ORF odnotowano podobieństwo sekwencji aminokwasowej do domeny odpowiedzialnej za rozpoznawanie uszkodzeń w DNA występującą w helikazach z grupy B ($e = 2 * 10^{-16}$) (Gene Bank KDZ03155.1; pfam PF18458.1) [Seki i in., 1988];

ORF 41 – hipotetyczne białko o długości 60 aa kodowane przez tę ORF dopasowano w oparciu o podobieństwo sekwencji aminokwasowych do białek z rodziny regulatorów transkrypcji ANR ($e = 2 * 10^{-44}$) (GeneBank WP_112347617.1);

ORF 42 – produkt tej ORF został doświadczalnie scharakteryzowany. Jego długość wynosi 220 aa. Wykryto u niego podobieństwo do domeny MT-A70 ($e = 4 * 10^{-164}$) (Gene Bank WP_046372823.1; pfam PF05063.14) obecnej w białkach z rodziny metylotransferaz (MTaz) S-adenozyl-L-metionino-zależnych (supfam 53335). U wirusów prokariotycznych wykryte białko może przeprowadzać modyfikacje adenin w genomie fagowym, dzięki czemu niemożliwe staje się rozpoznanie specyficznych sekwencji przez enzymy restrykcyjne gospodarza [Wilson i in., 1991], nie wyklucza się jednak innej funkcji poznanej MTazy. Gen badanego białka sklonowano, a następnie ustalono, że badane białko jest w pełni funkcjonalną MTazą DNA o specyficzności GATC [Radlińska, dane nieopublikowane]. Taką samą specyficzność ma MTaza typu Dam w rodzaju *Serratia* [Ostendorf i in., 1999]. MTaza Dam *Serratia* i ORF42 nie wykazują podobieństwa sekwencji aminokwasowej;

ORF 43 – domniemane białko będące produktem ORF 43 ma długość 387 aa i wykazuje podobieństwo do białka z rodziny integraz fagowych ($e = 0,0$) (Gene Bank WP_037419381.1; pfam PF00589.22) kodowanego przez *S. grimesii*, zawiera rdzeń katalityczny integraz fagów lambda-podobnych (supfam 56350). Integrazy fagów lambda-podobnych należą do grupy rekombinaz tyrozynowych, które za pośrednictwem aktywnej katalitycznie tyrozyny przeprowadzają cięcie rozpoznanej sekwencji *attB* w chromosomie gospodarza oraz

sekwencji *attP* w genomie fagowym, co prowadzi do miejscowo specyficznej rekombinacji między obydwoma sekwencjami i w konsekwencji do wejścia bakteriofaga w stan lizogenii (Podrozdział 1.5.1). Do swojej aktywności zazwyczaj wymagają białek pomocniczych kodowanych na chromosomie bakteryjnym lub w genomie fagowym; białka te biorą też udział w wycięciu profaga [Groth & Calos, 2004];

ORF 45 – przypuszczalny produkt białkowy tej ORF ma długość 793 aa i jest najdłuższym domniemanym białkiem spośród wszystkich rozpatrywanych w niniejszej pracy. Analiza jego sekwencji aminokwasowej z użyciem programu BLAST P wskazuje na podobieństwo do endolizyny ogonka bakteriofaga SageFayge infekującego bakterie z rodzaju *Bacillus* ($e = 1 * 10^{-04}$) (Gene Bank YP_009280906.1);

ORF 46 – domniemane białko kodowane przez ORF 46 ma długość 57 aa i wykazuje podobieństwo do syntetaz lizylo-tRNA klasy I ($e = 5 * 10^{-32}$) (Gene Bank EYU16219.1). Białka z tej rodziny przyłączają cząsteczki aminokwasu lizyny tRNA tworząc amino-acylo-tRNA wykorzystywane później w syntezie białek na rybosomach [Onesti i in., 1995];

ORF 47 – przypuszczalny produkt białkowy tego genu ma długość 90 aa. Na podstawie analizy bioinformatycznej wykazano jego podobieństwo do regulatorów transkrypcji ($e = 2 * 10^{-64}$) (Gene Bank WP_072269370.1), rozpoznano w nim domenę represora lambda-podobnego wiążącą DNA (EC 1.10.260.40);

ORF 48 – hipotetyczne białko kodowane na ORF nr 48 o długości 376 aa dopasowano w oparciu o podobieństwo sekwencji aminokwasowych do białka będącego acetylotransferazą ($e = 0,0$) (Gene Bank WP_072269371.1). Białko acetylotransferaza należy do rodziny acetylotransferaz (pfam PF01757.22);

ORF 49 – przypuszczalny produkt białkowy o długości 162 aa wykazuje podobieństwo do białka ogonka ($e = 8 * 10^{-36}$) (Gene Bank RAN85254.1). W obrębie sekwencji aminokwasowej tego białka odnotowano podobieństwo do domeny pektynoesterazy (EC 3.1.1.11). Potencjalną funkcją tego białka może być hydroliza struktur ściany komórkowej w trakcie penetracji;

ORF 51 – domniemane białko będące produktem tego genu jest długości 382 aa. Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej tego białka dopasowano je do białka budującego płytkę podstawową (ang. *baseplate*) ($e = 0,0$) (Gene Bank WP_062790438.1).

Jest to struktura stanowiąca zakończenie ogonka, która bezpośrednio styka się z powierzchnią infekowanej bakterii. Uczestniczy ona w rozpoznaniu komórki gospodarza, adsorpcji, transdukcji sygnału o prawidłowym zaadsorbowaniu do komórki oraz we wstrzyknięciu genomu wirusowego do komórki [Kostyuchenko i in., 2003];

ORF 52 – hipotetyczny produkt białkowy tej ORF o długości 145 aa dopasowano w oparciu o podobieństwo sekwencji aminokwasowych do białka strukturalnego ogonka ($e = 3 * 10^{-23}$) (Gene Bank WP_000424732.1) o bliżej nieokreślonej funkcji;

ORF 53 – domniemane białko będące produktem tej ORF ma długość 196 aa. Sekwencja aminokwasowa tego białka wykazuje podobieństwo do sekwencji białka budującego płytke podstawową (ang. *baseplate*) ($e = 2 * 10^{-132}$) (Gene Bank SMB46877.1) (patrz ORF 51);

ORF 54 – hipotetyczne białko będące produktem tej ORF ma długość 356 aa. Białko to w oparciu o podobieństwo sekwencji aminokwasowych zostało dopasowane do białka strukturalnego ogonka ($e = 0,0$) (Gene Bank WP_085118850.1) o bliżej nieokreślonej funkcji;

ORF 55 – produkt białkowy tej ORF ma długość 467 aa. Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej tego białka dopasowano je do rodziny białek cyrkulujących DNA ($e = 0,0$) (Gene Bank KMQ87046.1). Ich rolą jest nadanie kolistej struktury genomowi bakteriofaga i wraz z innymi genami wczesnymi ulega ekspresji niedługo po wprowadzeniu do komórki gospodarza. W tym procesie przeprowadzanym przez białka z tej rodziny dochodzi do ligacji końców genomu (u niektórych bakteriofagów zachodzi to w sekwencji *cos*) [Novick i in., 2010];

ORF 56 – jej potencjalny produkt ma długość 639 aa, zaś jego sekwencja wykazuje podobieństwo do domeny litycznej transglikozylazy ($e = 0,0$) (GeneBank WP_107228138.1). Białko to najprawdopodobniej może uczestniczyć w lizie komórki na drodze degradacji peptydoglikanu.

ORF 57 – produkt tej ORF o długości 96 aa, wykryto w nim podobieństwo do fagowych białek składania ($e = 7 * 10^{-71}$) (Gene Bank WP_062790456.1) posiada domenę chaperonową fagowego białka E (pfam PF10109.9). Białko to uczestniczy w prawidłowym fałdowaniu monomerów białkowych tworzących ogonek u bakteriofagów z rodziny *Myoviridae* [pfam.xfam.org];

ORF 58 – potencjalny produkt białkowy tej ORF o długości 122 aa wykazuje podobieństwo sekwencji aminokwasowych do białka strukturalnego ogonka ($e = 1 * 10^{-92}$) (Gene Bank WP_062790459.1) o bliżej nieokreślonej funkcji;

ORF 59 – potencjalny produkt ORF 59 jest białkiem fagowym o długości 501 aa ($e = 0,0$) (Gene Bank WP_085118840.1). W sekwencji aminokwasowej tego potencjalnego białka odnotowano podobieństwo do 3 domen, które mogą w tym białku występować. Domeny te występują w białkach budujących pochewkę ogonka (pfam PF17481.2, PF04984.14 i PF17482.2);

ORF 61 – jej hipotetyczny produkt białkowy o długości 180 aa dopasowano według podobieństwa sekwencji aminokwasowej do białka pomocniczego wiążącego ATP ($e = 2 * 10^{-129}$) (Gene Bank WP_107228160.1);

ORF 62 – domniemane białko będące produktem tej ORF to ma długość 114 aa i wykazuje podobieństwo sekwencji aminokwasowej do białka pełniącego funkcję adaptorową – umożliwia przyłączenie ogonka do główki ($e = 7 * 10^{-10}$) (Gene Bank YP_009213476.1);

ORF 63 – białko to o długości 140 aa jest hipotetycznym produktem ORF 63, na podstawie analizy bioinformatycznej podobieństwa sekwencji aminokwasowej tego białka dopasowano je do białka kapsydu ($e = 2 * 10^{-56}$) (Gene Bank WP_040264829.1; pfam PF12226.8);

ORF 64 – białko to o długości 349 aa, będące potencjalnym produktem ORF 64, dopasowano w oparciu o podobieństwo sekwencji aminokwasowej do białka kapsydu ($e = 0,0$) (Gene Bank WP_115601857.1; pfam PF03864.15);

ORF 65 – produkt białkowy tej ORF o długości 133 aa dopasowano na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowych do białka dekorującego główkę ($e = 7 * 10^{-94}$) (Gene Bank WP_060425447.1; pfam PF02924.14);

ORF 67 – przypuszczalne białko stanowiące produkt ORF 67 ma długość 286 aa, zaś na drodze analizy podobieństwa sekwencji aminokwasowej tego białka dopasowano je do białka peptydazy z rodziny S49 ($e = 0,0$) (Gene Bank WP_006708310.1) o aktywności hydratazy 2-enoilo-CoA (EC 3.90.226.10). Białko to najprawdopodobniej uczestniczy w dojrzewaniu kapsydu poprzez degradację białek rusztowania wewnątrz prokapsydu umożliwiając

wprowadzenie przez kompleks terminazy genomu do główki kapsydu [Cerritelli i in., 2003; Johnson, 2010];

ORF 68 – jej hipotetyczny produkt białkowy o długości 526 aa wykazuje podobieństwo (ustalone w oparciu o analizę z użyciem programu BLAST P) sekwencji aminokwasowej do sekwencji białka portalowego z rodziny białek bakteriofagów lambda podobnych ($e = 0,0$) (Gene Bank WP_040262924.1; pfam PF05136.13). Białko to uczestniczy w pakowaniu genomu do prokapsydu, stanowi kanał prowadzący do wnętrza prokapsydu i umożliwia przyłączenie się kompleksowi terminazy, po czym następuje translokacja genomu do prokapsydu [Fujisawa & Morita, 1997] (Podrozdział 1.4);

ORF 69 – domniemane białko kodowane na tej ORF ma długość 87 aa. Analiza sekwencji aminokwasowej z użyciem programu BLAST P wskazuje, iż jest to białko podobne do białka uczestniczącego w przyłączeniu ogonka do główki (ang. *head-tail joining protein*) ($e = 1 * 10^{-52}$) (Gene Bank WP_105396969.1; pfam PF02831.15);

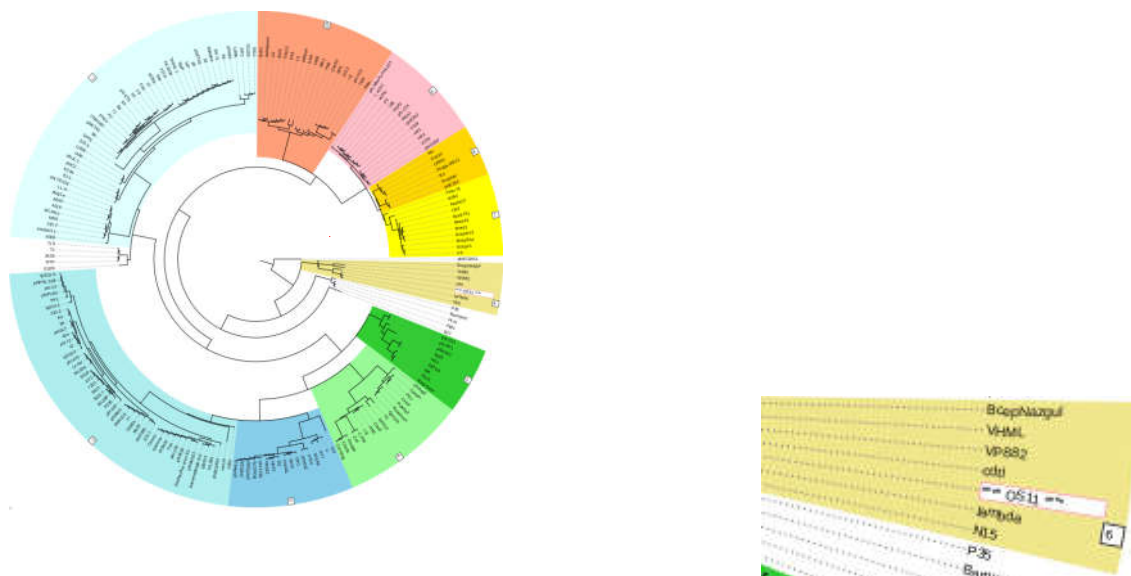
ORF 70 – domniemany produkt białkowy ORF 70 to ma długość 659 aa, zaś jego sekwencja aminokwasowa wykazuje podobieństwo do sekwencji aminokwasowej białka będącego dużą podjednostką terminazy ($e = 0,0$) (Gene Bank WP_060425444.1). Wraz z małą podjednostką, duża podjednostka tworzy kompleks terminazy – gdzie: mała podjednostka terminazy rozpoznaje na nici replikowanego genomu sekwencje *cos*, zaś duża podjednostka w połączeniu z małą podjednostką łączy się z białkiem portalowym, przeprowadza translokację genomu do główki prokapsydu oraz odcina w miejscu *cos* zapakowany genom od konkatameru; po czym przyłącza się do kolejnej, niewypełnionej jeszcze główki fagowej [Sun i in., 2010] (Podrozdział 1.4);

ORF 71 – domniemany produkt ORF 71 o długości 199 aa wykazuje podobieństwo sekwencji aminokwasowej do małej podjednostki terminazy ($e = 4 * 10^{-06}$) (Gene Bank ATS93173.1), której funkcję opisano powyżej (patrz ORF 70);

Nie udało się przewidzieć funkcji produktów ORFów o numerach: 1, 2, 12, 14, 16 17, 22, 23, 24, 25, 31, 35, 37, 39, 40, 44, 50, 60 i 66.

5.3.3 Określenie przynależności taksonomicznej

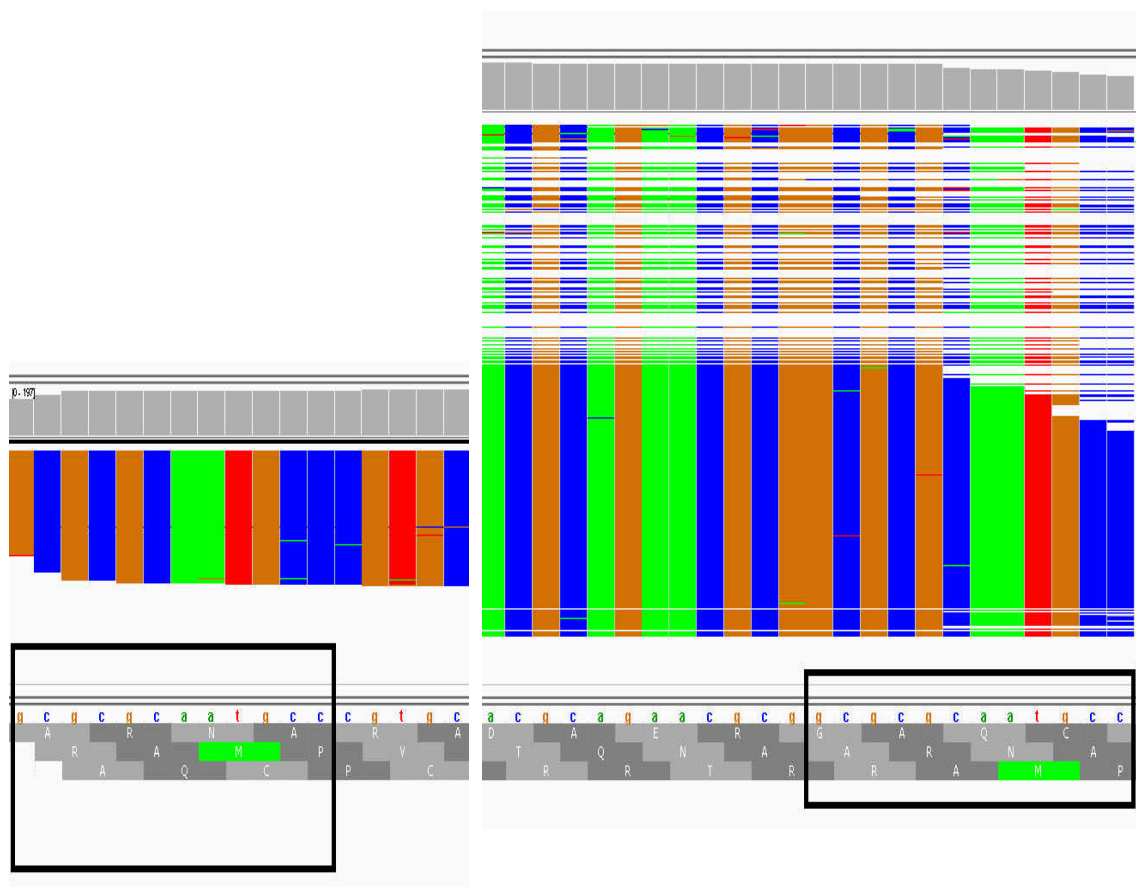
Uzyskany plik FASTA białek ϕ OS10 zaimplementowano do programu VIRFAM (Podrozdziały 1.6.6 i 4.17.3), skąd otrzymano przyporządkowanie ϕ OS10 do rodziny. Program VIRFAM przypisał ϕ OS10 do rodziny *Myoviridae* (Rycina 20); niemniej jak wspomniano w Podrozdziale 1.2, w ciągu ostatnich kilkunastu miesięcy ustanowiono 2 nowe rodziny w rzędzie *Caudovirales* (tj. *Ackermannviridae* i *Herelleviridae*) o wielu cechach przypisywanym dotychczas tylko rodzinie *Myoviridae*; w związku z czym aktualnie dostępne programy bioinformatyczne mogą przypisywać badane bakteriofagi do rodziny *Myoviridae*, podczas gdy przypisanie powinno nastąpić do rodziny *Ackermannviridae* lub *Herelleviridae*. Przyporządkowanie ϕ OS10 do rodziny *Myoviridae* nie jest w pełni uprawnione i wymaga kolejnego podejścia, gdy dostępne programy bioinformatyczne zostaną zaktualizowane.



Rycina 20. Umieszczenie bakteriofaga ϕ OS10 na drzewie podobieństwa przedstawicieli *Caudovirales*. [Virfam.org].

5.4 Określenie sekwencji *cos*

Podczas analizy wyników sekwencjonowania zaobserwowano, że kontig zawierał na początku i na końcu tę samą sekwencję **GCGCGCAATGCC** (Rycina 21), co mogło być sekwencją *cos* odczytaną dla obu końców genomu niezależnie (taka możliwość istnieje tylko wówczas gdy terminaza, przecinając sekwencję *cos*, generuje jednoniciowe „lepkie” końce 5’), albo sekwencją powtórzoną w genomie lub po prostu pomyłką wygenerowaną przez program podczas składania kontigu.



Rycina 21. Wyniki sekwencjonowania genomu ϕ OS10. Na obu ramionach genomu widoczna jest sekwencja GCGCGCAATGCC [Decewicz & Radlińska, dane nieopublikowane].

Argumentem przemawiającym za tą pierwszą możliwością było przypisanie funkcji produktowi pierwszego genu (mała podjednostka terminazy), znajdującego się na prawym ramieniu kontigu. Jak wspomniano w Podrozdziale 1.5.1, w przypadku występowania sekwencji *cos* jej położenie w genomie jest konserwowane i znajduje się w regionie niekodującym, tuż przed genem kodującym małą podjednostkę terminazy.—Aby określić

faktyczną sekwencję końców genomowego DNA ϕ OS10, a zatem wykluczyć pomyłkę wygenerowaną przez program do składania kontigu, wykonano następujący eksperyment. Genomowy DNA ϕ OS10 przecięto enzymem Nco I (jedno z miejsc dla Nco I znajduje się w odległości 1967 bp od prawego końca). Następnie użyto Fragment Klenowa Polimerazy I, aby usunąć „lepkie” końce uzyskanych fragmentów restrykcyjnych, a następnie fragment o wielkości 1967 bp reizolowano z żelu (Rycina 22).



Rycina 22. Fragment prawego ramienia genomu ϕ OS10 reizolowany z żelu.

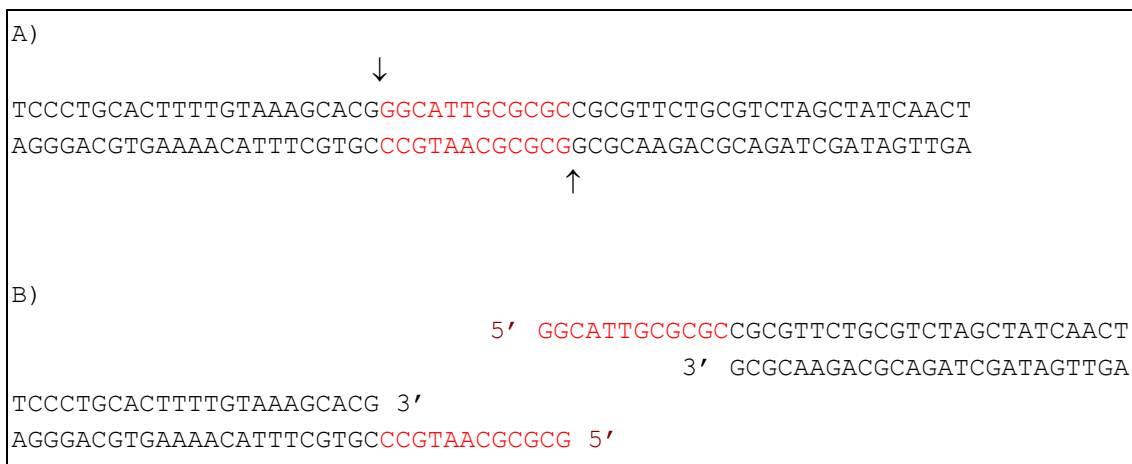
Zakładając, że końce liniowego genomu ϕ OS10 zawierają jednoniciowe odcinki (są „lepkie”), wspomniany fragment DNA zawierał „lepki” koniec po cięciu Nco I oraz „lepki” koniec po cięciu terminazą, które zostały następnie wypełnione przez enzym Fragment Klenowa Polimerazy I. Ten odcinek DNA sklonowano w wektorze pUC19 strawionym uprzednio enzymem Sma I i oddano do sekwencjonowania. Sekwencję prawego ramienia po zastosowaniu Fragmentu Klenowa przedstawia Rycina 23.

<p>5' CATGGCTCATTGGTTTCCAGAT [...] CAACTATCGATCTGCGTCTTGCGCCGCGGTTACGG 3'</p> <p>3' GTACCGAGTAACCAAAGGTCTA [...] GTTGATAGCTAGACGCAGAACGCGGCGGCAATGCC 5'</p>

Rycina 23. Sekwencja prawego ramienia genomu ϕ OS10 po zastosowaniu Fragmentu Klenowa Polimerazy I. Kolorem czerwonym dopisano sekwencję wygenerowaną przez Fragment Klenowa.

Natomiast, aby sprawdzić czy sekwencja **GCGGCAATGCC** występuje tylko raz (albo czy jest zduplikowana) w genomie ϕ OS10 – przeprowadzono amplifikację regionu zawierającego tę sekwencję z użyciem starterów, które ją flankują (Podrozdziały 3.3.1 i 4.15) z

wykorzystaniem jako matrycy DNA chromosomowy wyizolowany z lizogena tj. szczepu *Serratia* sp. OS10L (opis uzyskania lizogena w Podrozdziale 5.5). Uzyskany produkt PCR sklonowano w wektorze pUC19 strawionym uprzednio enzymem Sma I i oddano do sekwencjonowania. Wynik tego eksperymentu wykazał, że sekwencja **GCGCGCAATGCC** występuje w genomie profaga tylko raz, co pozwala wnioskować, że obecność tej sekwencji na obu końcach kontigu jest produktem specyficznego endonukleolitycznego cięcia DNA przez terminazę. Nić górna w sekwencji **GCGCGCAATGCC** została przecięta przed pierwszą guaniną na końcu 5', tak samo jak nić do niej komplementarna. W ten sposób zostały wygenerowane 12 nt jednoniciowe końce. Na Rycinie 24 przedstawiono schemat poglądowy obrazujący sekwencję *cos*_obecną w sekwencji profagowej *Serratia* sp. OS10L oraz po jej przecięciu w genomie faga OS10.



Rycina 24. Sekwencja *cos*, zaznaczona kolorem czerwonym. Sekwencja replikowanego genomu przed cięciem z udziałem terminazy oraz w profagu. Strzałkami zaznaczono miejsca cięcia (A), po przecięciu zostały wygenerowane jednoniciowe odcinki – tzw. „lepkie” końce 5' (B) [Radlińska, dane nieopublikowane].

5.5 Weryfikacja zdolności do wejścia w stan lizogenii ϕ OS10

W celu ustalenia czy ϕ OS10 jest fagiem łagodnym, a zatem czy ma zdolność wejścia w stan lizogenii, podjęto próbę uzyskania lizogena. Jako gospodarza wybrano szczep *Serratia* sp. OS10, na murawkę którego nakroplono po 10 μ l porcji rozcieńczeń zawiesiny ϕ OS10: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Z centralnej części mętnej łysinki pobrano esz material, a następnie wykonano posiew redukcyjny na podłożu stałym LB. Uzyskane kolonie pasażowano dwukrotnie w celu uzyskania czystej kultury, a następnie poddano testom

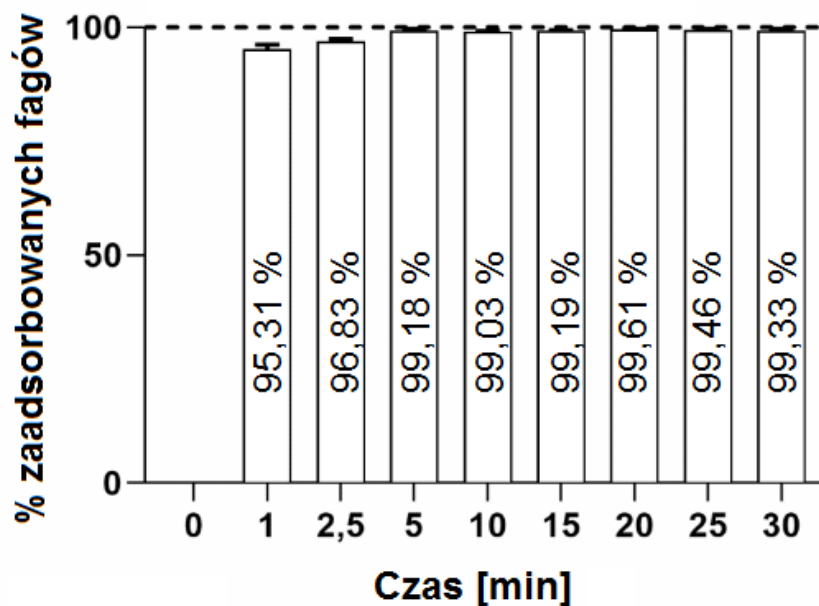
mającym na celu ustalenie czy bakterie te (*Serratia* sp. OS10L) są lizogenami faga ϕ OS10. Nocne hodowle potencjalnych lizogenów *Serratia* sp. OS10L użyto jako gospodarzy w teście szalek dwuwarstwowych (Podrozdział 4.1), gdzie nakraplanym fagiem był ϕ OS10. Dodatkowo rozcieńczenia hodowli *Serratia* sp. OS10L wykorzystano do nakropienia szalek dwuwarstwowych zawierających jako gospodarza natywny szczep *Serratia* sp. OS10. Po około 24-godzinnej inkubacji okazało się, że w miejscach nakropień testowanego *Serratia* sp. OS10L na murawkę *Serratia* sp. OS10 pojawiły się strefy zahamowania wzrostu (lub łysinki, przy wyższych rozcieńczeniach lizogena). Natomiast *Serratia* sp. OS10L nie był wrażliwy na ϕ OS10. Wynik ten jednoznacznie wskazuje iż bakterie tj. *Serratia* sp. OS10L, pobrane z mętnej łysinki, są lizogenami ϕ OS10, a badany bakteriofag ϕ OS10 jest łagodny i zdolny do wejścia w stan lizogenii. Uzyskany wynik jest przypuszczalnie rezultatem obecności profaga (tu ϕ OS10), który nie dopuszcza do zajścia superinfekcji tj. koinfencji lizogena tym samym lub pokrewnym fagiem (mechanizm oporności na superinfekcję opisano w Podrozdziale 1.5.1). Na poziomie molekularnym zjawisko to związane jest ze stałą produkcją białka represorowego, kodowanego przez profaga, który może zablokować możliwość wejścia w cykl lityczny także faga-intruza. Gdyby w miejscach nakropień hodowli potencjalnego lizogena na murawkę szczepu wrażliwego nie pojawiły się strefy zahamowania wzrostu, oznaczałoby to, że „potencjalny lizogen” jest w rzeczywistości szczepem opornym na infekcję badanym bakteriofagiem, o oporności uzyskanej w sposób spontaniczny – np. na drodze wintegrowania się do chromosomu komórki gospodarza samego genu represora, po czym doszło do degradacji reszty genomu fagowego w cytoplazmie komórki [Labrie i in., 2010], albo z powodu utraty receptora dla danego wirusa.

5.6 Badanie kinetyki adsorpcji bakteriofaga ϕ OS10 do gospodarza

Badanie wykonano zgodnie z opisem przedstawionym w Podrozdziale 4.18. Uśrednione wartości adsorpcji w zależności od czasu prezentuje Tabela 11. Wyniki opracowane w programie *Libre Office Calc* (Podrozdział 3.10), podano w formie diagramu słupkowego przedstawionego na Rycinie 25.

Tabela 11. Zależność adsorpcji cząstek fagowych do komórek gospodarza od czasu. Trzy próby biologiczne, wynik uśredniony.

minuta	Adsorpcja	
	dla próby	średnia
1	I: 95,82%	95,31%
	II: 95,82%	
	III: 94,30%	
2,5	I: 96,58%	96,83%
	II: 97,53%	
	III: 96,39%	
5	I: 99,24%	99,18%
	II: 98,69%	
	III: 99,62%	
10	I: 98,90%	99,03%
	II: 98,99%	
	III: 99,20%	
15	I: 99,43%	99,19%
	II: 99,05%	
	III: 99,09%	
20	I: 99,64%	99,61%
	II: 99,43%	
	III: 99,77%	
25	I: 99,66%	99,46%
	II: 99,22%	
	III: 99,51%	
30	I: 99,73%	99,33%
	II: 99,47%	
	III: 98,78%	



Rycina 25. Wykres zależności odsetku zaadsorbowanych cząstek wirusowych od czasu. Wykres wykonany w oparciu o wartości uśrednione z Tabeli 11.

Analiza wyników nasuwa wniosek, iż adsorpcja bakteriofaga ϕ OS10 jest bardzo wydajna – już po pierwszej minucie od zmieszania zawiesiny cząstek fagowych z mieszaniną szczepu wrażliwego zaadsorbowało się do komórek gospodarza ponad 95% cząstek fagowych. Dla porównania u bakteriofaga ϕ AB2 wartość ta bywa znacznie mniejsza – osiągnięcie adsorpcji na poziomie 95% trwało w jego przypadku około 4 minut, zaś w ciągu pierwszej minuty adsorbowało mniej niż 75% cząstek infekcyjnych faga [Lin i in., 2010]. Tak duża wydajność adsorpcji pozwoliła pominąć odwirowywanie niezaadsorbowanych cząstek fagowych przy kolejnych pomiarach w późniejszym badaniu jednego etapu replikacji faga (Podrozdział 5.7).

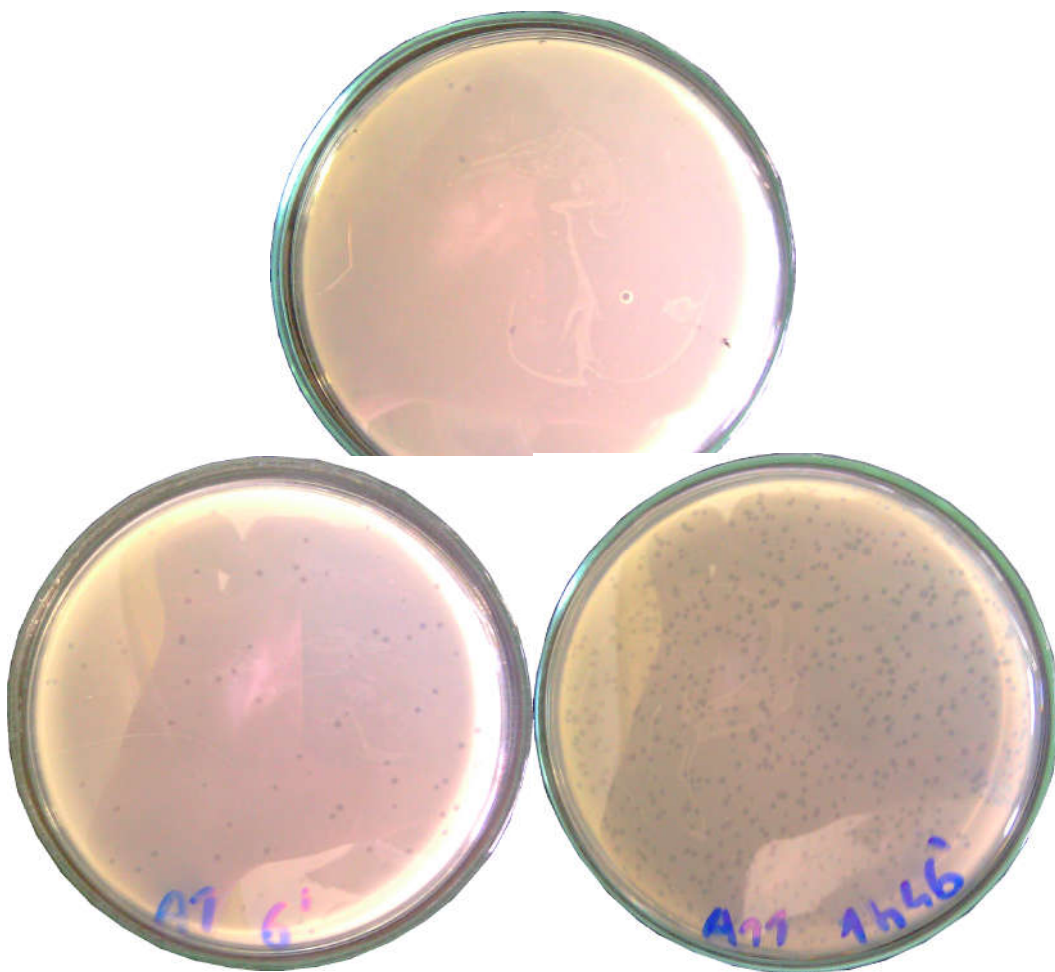
5.7 Badanie jednego etapu replikacji (ang. One-Step Growth) faga ϕ OS10

5.7.1 Badania pilotażowe

Procedura zastosowana w niniejszej pracy bazowała na metodyce Kropińskiego [Kropiński, 2018] z pewnymi modyfikacjami. Modyfikacje opisano w Podrozdziale 4.19.3 Do serii badań wykorzystano szczep wrażliwy OS10. Jako optymalne wybrano odmładzanie w stosunku 1:50, trwające w zależności od stanu nocnej hodowli – od 2 do 4 godzin.

5.7.2 Badanie czasu latencji i wielkości wyrzutu fagowego

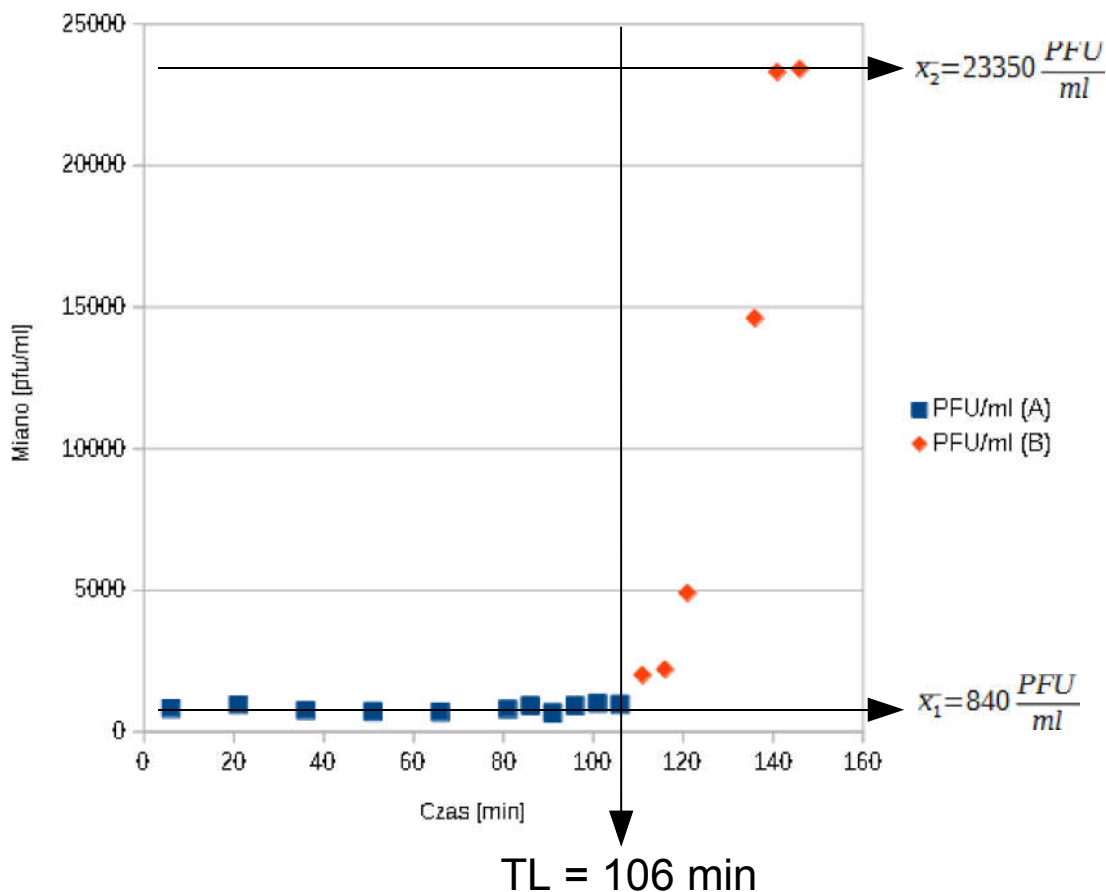
Po przeprowadzeniu procedury opisanej w Podrozdziale 4.19.3 ustalono, że MOI wynosi $1/283$ ($\approx 0,0035$), czyli daleko poniżej wartości 1,0 – dzięki czemu, w oparciu o opisany wcześniej rachunek statystyczny, przyjąć można było, iż u ponad 99,82% zainfekowanych komórek infekcja zachodziła z udziałem dokładnie 1 cząstki infekcyjnej. W związku z tym uznano, iż każda łysełka na szalce pochodziła od jednej cząstki infekcyjnej. Na Rycinie 26 przedstawiono szalki z widocznymi łysełkami, których jest odpowiednio mniej przed wysypem cząstek infekcyjnych (szalka A1) oraz odpowiednio więcej po wysypie cząstek infekcyjnych (szalka A11). Czas latencji oraz plon fagowy ustalono w oparciu o czynności opisane w Podrozdziale 4.19.3. Wyniki zebrane w Tabeli 12 zaprezentowano na poniższym wykresie (Rycina 27)



Rycina 26. Szalki z murawką bakterii *Serratia* sp. OS10: kontroli (K), próby badanej przed wysypem cząstek fagowych (A1) i próby badanej po wysypie cząstek fagowych (A11). Procedura według A. Kropińskiego [Kropiński, 2018].

Tabela 12. Wyniki badania jednego etapu replikacji faga.

Numer pomiaru	Czas (min)	Ilość łysinek (A)	PFU/ml (A)	Ilość łysinek (B)	PFU/ml (B)
1	6	83	830		
2	21	96	960		
3	36	76	760		
4	51	71	710		
5	66	69	690		
6	81	80	800		
7	86	92	920		
8	91	67	670	8	800
9	96	92	920	11	1100
10	101	101	1010	7	700
11	106	97	970	31	3100
12	111	407	4070	20	2000
13	116	389	3890	22	2200
14	121	554	5540	49	4900
15	126			330	33000
16	131			270	27000
17	136			146	14600
18	141			233	23300
19	146			234	23400
20	151			125	12500



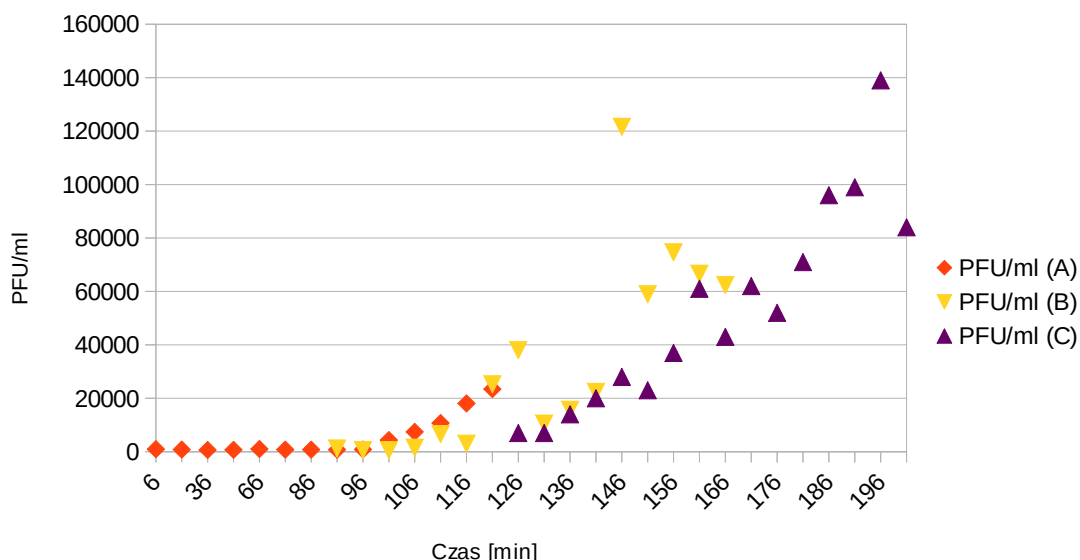
Rycina 27. Wykres zależności miana faga od czasu, zaznaczone poziomy plateau x_1 i x_2 oraz czas latencji T_L .

Plon fagowy, czyli średnia ilość cząstek fagowych uwalniających się z jednej zainfekowanej komórki, obliczono jako stosunek miana dla górnego plateau do miana dolnego plateau (Rycina 28).

$$\alpha = \frac{\bar{x}_2}{\bar{x}_1} = \frac{23350 \frac{PFU}{ml}}{840 \frac{PFU}{ml}} = 27,7976 \dots \approx 28$$

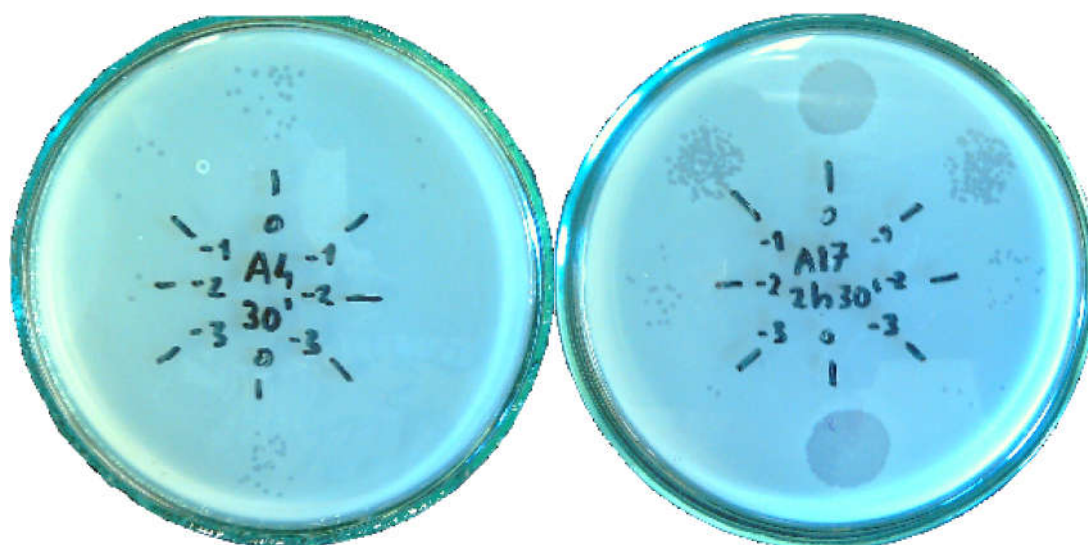
Rycina 28. Wyliczenie plonu fagowego.

Wartość otrzymana w obliczeniach z Ryciny 15 wymagała weryfikacji, ponieważ obliczono ją w oparciu o górne plateau, które dla 2 pomiarów nie osiągnęło istotności statystycznej. W związku z tym wykonano drugie podejście, tym razem jednak zwiększając ilość pomiarów, aby przy tych samych warunkach osiągnąć stabilne górne plateau. W rezultacie uzyskano 3 niewspółliniowe wykresy: dla kolby A, kolby B i kolby C (Rycina 29).



Rycina 29. Wykres zależności plonu fagowego od czasu pomiaru.

Jako przyczynę powstania nieregularnych wykresów uznać można dotychczasowe wykorzystywanie kolb B i C jako kolejnych rozcieńczeń zawartości kolby A. Jest to technika obarczona dużym błędem, ponieważ potencjalne błędy w pipetowaniu są utrwalane w następnych pomiarach. Ponieważ w żadnym z dwóch powtórzeń nie uzyskano istotnego statystycznie plateau po wysypie cząstek fagowych (ang. *burst*), następne 2 podejścia wykonano z wprowadzeniem modyfikacji opisanymi w Podrozdziale 4.19.3. Na każdej szalce wykonano po 2 powtórzenia z uwzględnieniem rozcieńczeń (Rycina 30). Wyniki zestawiono w formie Tabeli 13, a następnie zobrazowano w formie wykresu (Rycina 31).

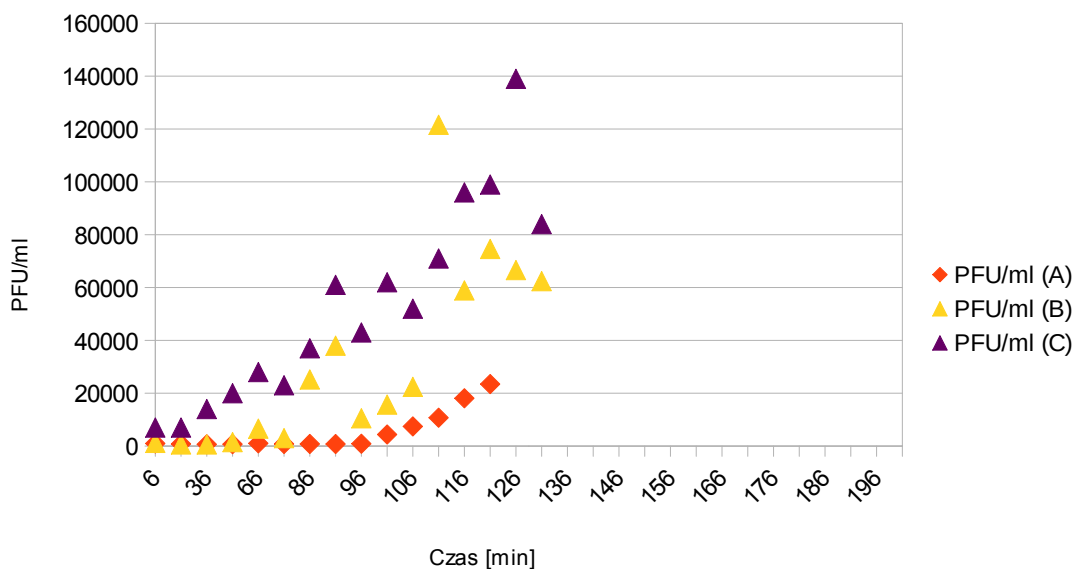


Rycina 30. Szalki z murawką bakterii *Serratia* sp. OS10 dla: próby badanej przed wysypem cząstek fagowych (A4) i próby badanej po wysypie cząstek fagowych (A17). Procedura zmodyfikowana.

Tabela 13. Wyniki badania jednego etapu replikacji faga po modyfikacjach.

Numer pomiaru	Czas (min)	10^0		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}	
		powt.	średnia	powt.	średnia	powt.	średnia	powt.	średnia
A1	5	I: 27	26,9	I: 3	3,24	I: 0	-0,03	I: 0	0
		II: 32		II: 4		II: 0		II: 0	
A2	10	I: 31	31,2	I: 2	2,42	I: 1	0,49	I: 0	0
		II: 33		II: 3		II: 0		II: 0	
A3	15	I: 30	25,35	I: 4	3,44	I: 1	0,49	I: 0	0
		II: 22		II: 3		II: 0		II: 0	
A4	30	I: 23	22,65	I: 4	2,87	I: 2	0,99	I: 0	0
		II: 25		II: 2		II: 0		II: 0	
A5	45	I: 28	25,15	I: 3	2	I: 0	-0,01	I: 0	0
		II: 25		II: 1		II: 0		II: 0	
A6	60	I: 37	31,15	I: 1	2,5	I: 0	-0,01	I: 0	0
		II: 28		II: 4		II: 0		II: 0	
A7	75	I: 31	24,15	I: 0	1,5	I: 2	0,99	I: 0	0
		II: 20		II: 3		II: 0		II: 0	
A8	85	I: 31	26,65	I: 8	5,5	I: 0	-0,01	I: 0	0
		II: 25		II: 3		II: 0		II: 0	
A9	90	I: 34	29,65	I: 4	5	I: 0	0,49	I: 0	0
		II: 28		II: 6		II: 1		II: 0	
A10	95	I: 39	28,15	I: 1	1	I: 0	-0,01	I: 0	0
		II: 20		II: 1		II: 0		II: 0	
A11	100	I: 50	44,65	I: 4	3,5	I: 0	-0,01	I: 0	0
		II: 42		II: 3		II: 0		II: 0	
A12	105	I: 83	73,65	I: 40	22	I: 2	0,97	I: 0	0
		II: 67		II: 4		II: 0		II: 0	
A13	110	I: 45	52,15	I: 4	4,5	I: 0	-0,01	I: 0	0
		II: 62		II: 5		II: 0		II: 0	
A14	120	I: 113	150,15	I: 13	21	I: 0	0,49	I: 0	0
		II: 190		II: 29		II: 1		II: 0	
A15	130	I: 131	145,65	I: 104	85	I: 2	4,49	I: 0	0
		II: 163		II: 66		II: 7		II: 0	

A16	140	I: 171	234,15	I: 98	97	I: 8	8,99	I: 0	0,5
		II: 300		II: 96		II: 10		II: 1	
A17	150	I: 267	254,15	I: 125	120,5	I: 15	16,49	I: 2	3
		II: 244		II: 116		II: 18		II: 4	
A18	160	I: 267	254,15	I: 134	115,5	I: 55	52,49	I: 6	4
		II: 244		II: 97		II: 50		II: 2	



Rycina 31. Wykres zależności plonu fagowego od czasu pomiaru.

W oparciu o uzyskane wyniki ustalono, że w wyniku infekcji jedną cząstką fagową powstaje średnio od 28 do 40 cząstek fagowych. Jest to wynik dość dokładny, odnosząc go do analogicznych badań, w których plon fagowy podaje się jako przybliżenie do wielokrotności liczby 100 [Lin i in., 2010]. Czasu latencji nie udało się dokładnie ustalić. Wiadomo jednak, że wynosi od 105 do 120 minut. Czas ten podano w formie przedziału, a nie dokładnej wartości, ze względu na kilka okoliczności:

1. Wysyp cząstek fagowych niejednokrotnie rozpoczynał się w różnych momentach dla różnych rozcieńczeń w ramach tej samej próby biologicznej.
2. Przy zachowaniu tych samych warunków eksperymentu komórki mogły cechować się innym stanem fizjologicznym, co wpływa na szybkość cyklu infekcyjnego.
3. Warunki prowadzenia eksperymentu umożliwiały pobór prób z niemniejszą częstotliwością niż jeden pobór co 5 minut.

Wynik cechuje się podobną (lub też niewiele większą) dokładnością względem analogicznych badań uzyskanych dla innych bakteriofagów [Daugelavičius i in., 2007]. Badanie przeprowadzone według zmodyfikowanej procedury odbyło się w jednym powtórzeniu. W związku z tym, dla większego uwiarygodnienia wyników należałoby wykonać kolejne powtórzenia tej procedury.

5.8 Proponowane kierunki dalszych badań

Czynności opisane w niniejszej pracy stanowią wstępny etap badań. W ramach następných kroków można by przeprowadzić:

- analizę morfologii wirionów z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, co pozwoli określić parametry przestrzenne cząstki infekcyjnej (przybliżoną średnicę główki i długość ogonka) dla porównania ich z innymi bakteriofagami *Serratia*;
- analizę proteomiczną białek kapsydu, zsekwencjonowanie ich metodą tandemowej spektrometrii mas [Hunt i in., 1986] i zadnotowanie sekwencji aminokwasowych do odpowiednich miejsc w genomie z użyciem narzędzia tBLAST N, dzięki czemu zweryfikowana będzie lokalizacja genów kodujących białka kapsydu w genomie ϕ OS10, a ORFy kodujące domniemane białka kapsydów zostaną scharakteryzowane.

6. Podsumowanie

Zamierzeniem niniejszej pracy była wstępna charakterystyka bakteriofaga ϕ OS10 namnożonego w bakterii *Serratia* sp. OS10 pochodzącej z nieczynnej kopalni w Złotym Stoku. Udało się ustalić rodzaj materiału genetycznego bakteriofaga (dsDNA). Genom poddano sekwencjonowaniu, a uzyskaną sekwencję nukleotydową poddano analizie bioinformatycznej i zadnotowano. Uzyskane w analizie bioinformatycznej sekwencje aminokwasowe domniemanych produktów białkowych przeanalizowano pod kątem podobieństwa do wszystkich znanych białek w bazie danych NCBI, przewidziano z dużym prawdopodobieństwem przynależność bakteriofaga ϕ OS10 do rodziny *Myoviridae*. Ustalono, że ϕ OS10 jest bakteriofagiem łagodnym. Wykazano, że terminaza bakteriofaga ϕ OS10 tnie genom w specyficznej sekwencji *cos*, którą określono w niniejszych badaniach. Określono szybkość adsorpcji bakteriofaga ϕ OS10 do komórek gospodarza. Ostatnim eksperymentem było określenie czasu latencji bakteriofaga ϕ OS10 i wielkości jego plonu fagowego. Niniejsza praca stanowi znaczny wkład w wiedzę o bakteriofagach z rodzaju *Serratia*. ϕ OS10 jest fagiem niepodobnym do innych dotychczas scharakteryzowanych fagów *Serratia*. Jego genom jest prawie 3,5 razy mniejszy od większości scharakteryzowanych genomów fagów *Serratia* oraz wykazuje podobieństwo sekwencji nukleotydowej tylko do dwóch z nich na poziomie mniejszym niż 1%, w związku z czym ϕ OS10 jest fagiem unikatowym. ϕ OS10 jest najmniejszym dotychczas poznanym fagiem *Serratia* z rodziny *Myoviridae* (nawet wliczając rodzinę *Ackermannviridae*). Jest to pierwsza praca o bakteriofagu *Serratia* przeprowadzona przez Zakład Wirusologii Uniwersytetu Warszawskiego.

7. Bibliografia

1. Abdollahi, A., Nasirpour, S., Shahmohammad, N., & Zolfaghari, A. (2008). *Serratia Marcescens*, an Opportunistic Gram Negative Infection in Cardiac Valve Surgery. *Iranian Journal of Pathology*, 3(1), 40-42.
2. Abedon, S. T., Herschler, T. D., & Stopar, D. (2001). Bacteriophage latent-period evolution as a response to resource availability. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(9), 4233-4241.
3. Altschul, S. F., & Gish, W. (1996). [27] local alignment statistics. In *Methods in enzymology* (Vol. 266, pp. 460-480). Academic Press.
4. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
5. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
6. Ashelford, K. E., Fry, J. C., Bailey, M. J., & Day, M. J. (2002). Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont et al. 1983 to *Serratia quinivorans* corrig., sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(6), 2281-2289.
7. Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., ... & Meyer, F. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9(1), 75.
8. Baj, J., Dziewit, L., Bartosik, D., Radlińska, M., Drewniak, L., Paterczyk, B. (2018). *Mikrobiologia*. Wydawnictwo naukowe PWN.
9. Baron, S. (1996). *Classification--Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston.
10. Barry, M., Van Buuren, N., Burles, K., Mottet, K., Wang, Q., & Teale, A. (2010). Poxvirus exploitation of the ubiquitin-proteasome system. *Viruses*, 2(10), 2356-2380.
11. Barylski, J., Enault, F., Dutilh, B. E., Schuller, M. B., Edwards, R. A., Gillis, A., ... & Lavigne, R. (2018). Taxonomy proposal: To create one (1) new family, Herelleviridae, in the order Caudovirales. *ICTV Online: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*.
12. Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., Madigan, M. T., & Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson.
13. Benedik, M. J., & Strych, U. (1998). *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease. *FEMS microbiology letters*, 165(1), 1-13.
14. Bergan, T., Grimont, P. A., & Grimont, F. (1983). Fatty acids of *Serratia* determined by gas chromatography. *Current Microbiology*, 8(1), 7-11.
15. Bernstein, H., & Bernstein, C. (1973). Circular and branched circular concatenates as possible intermediates in bacteriophage T4 DNA replication. *Journal of molecular biology*, 77(3), 355-361.
16. Bhadra, B., Roy, P., & Chakraborty, R. (2005). *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(5), 2155-2158.
17. Biemann, R., Habann, M., Eugster, M. R., Lurz, R., Calendar, R., Klumpp, J., & Loessner, M. J. (2015). Receptor binding proteins of *Listeria monocytogenes* bacteriophages A118 and P35 recognize serovar-specific teichoic acids. *Virology*, 477, 110-118.

18. Blum, J. S., Bindi, A. B., Buzzelli, J., Stolz, J. F., & Oremland, R. S. (1998). *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Archives of microbiology*, 171(1), 19-30.
19. Bobay, L. M., Touchon, M., & Rocha, E. P. (2014). Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(33), 12127-12132.
20. Bollivar, D. W., Bernardoni, B., Bockman, M. R., Miller, B. M., Russell, D. A., Delesalle, V. A., ... & Eppurath, A. (2016). Complete genome sequences of five bacteriophages that infect *Rhodobacter capsulatus*. *Genome Announc.*, 4(3), e00051-16.
21. Breed, R. S., Murray, E. G., & Kitchens, A. P. (1948). *Sergey's manual of determinative bacteriology*. Sixth edition.
22. Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., ... & Shukla, M. (2015). RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific reports*, 5, 8365.
23. Brissette, J. L., Weiner, L., Ripmaster, T. L., & Model, P. (1991). Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *Journal of molecular biology*, 220(1), 35-48.
24. Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W. D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(3), 560-602.
25. Bujnicki, J. M., Feder, M., Radlińska, M., & Blumenthal, R. M. (2002). Structure prediction and phylogenetic analysis of a functionally diverse family of proteins homologous to the MT-A70 subunit of the human mRNA: m6A methyltransferase. *Journal of molecular evolution*, 55(4), 431-444.
26. Cases, S., Smith, S. J., Zheng, Y. W., Myers, H. M., Lear, S. R., Sande, E., ... & Erickson, S. K. (1998). Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(22), 13018-13023.
27. Casey, E., Fitzgerald, B., Mahony, J., Lugli, G. A., Ventura, M., & van Sinderen, D. (2017). Genome sequence of *Serratia marcescens* phage BF. *Genome Announc.*, 5(23), e00211-17.
28. Casjens, S. (2003). Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far?. *Molecular microbiology*, 49(2), 277-300.
29. Casjens, S. R., Gilcrease, E. B., Winn-Stapley, D. A., Schicklmaier, P., Schmieger, H., Pedulla, M. L., ... & Hendrix, R. W. (2005). The generalized transducing *Salmonella* bacteriophage ES18: complete genome sequence and DNA packaging strategy. *Journal of bacteriology*, 187(3), 1091-1104.
30. Casjens, S., & Hayden, M. (1988). Analysis in vivo of the bacteriophage P22 headful nuclease. *Journal of molecular biology*, 199(3), 467-474.
31. Cenens, W., Makumi, A., Mebrhatu, M. T., Lavigne, R., & Aertsen, A. (2013). Phage–host interactions during pseudolysogeny: Lessons from the *Pid/dgo* interaction. *Bacteriophage*, 3(1), e1003269.
32. Cerritelli, M. E., Conway, J. F., Cheng, N., Trus, B. L., & Steven, A. C. (2003). Molecular mechanisms in bacteriophage T7 procapsid assembly, maturation, and DNA containment. *Advances in protein chemistry*, 64, 301-324.
33. Chandrakanth, K., Virupakshaiyah, D. B. M., Gavimath, C. C., Udaykumar, M., & Kangralkar, V. A. (2010). Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* Coagulase gene. *Journal of Advanced Bioinformatics Applications and Research*, 1(1), 31-36.
34. Chang, C. Y., Kemp, P., & Molineux, I. J. (2010). Gp15 and gp16 cooperate in translocating bacteriophage T7 DNA into the infected cell. *Virology*, 398(2), 176-186.
35. Charbit, A., Clement, J. M., & Hofnung, M. (1984). Further sequence analysis of the phage lambda receptor site: possible implications for the organization of the LamB protein in *Escherichia coli* K12. *Journal of molecular biology*, 175(3), 395-401.

36. CŁAPA, T., NAROŻNA, D., SIUDA, R., Borkowski, A., Selwet, M., MAĐRZAK, C. J., & KOŻLECKA, E. (2017). Bacterial communities from the arsenic mine in Złoty Stok, Sudety mountains, Poland. *Polish journal of microbiology*, 66(3), 375-381.
37. Collier L, Oxford J. *Wirusologia*. Wydawnictwo lekarskie PZWL. 2001.
38. Comeau, A. M., Arbiol, C., & Krisch, H. M. (2010). Gene network visualization and quantitative synteny analysis of more than 300 marine T4-like phage scaffolds from the GOS metagenome. *Molecular biology and evolution*, 27(8), 1935-1944.
39. Coordinators, N. R. (2017). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 45(Database issue), D12.
40. Creager, A. N., Scholthof, K. B. G., Citovsky, V., & Scholthof, H. B. (1999). Tobacco mosaic virus: pioneering research for a century.
41. Cumby, N., Edwards, A. M., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2012). The bacteriophage HK97 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein. *Journal of bacteriology*, 194(18), 5012-5019.
42. Cyr, D. M., Langer, T., & Douglas, M. G. (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends in biochemical sciences*, 19(4), 176-181.
43. d'Herelle, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad. Sci. Paris*, 165, 373-375.
44. Daugelavičius, R., Gaidelytė, A., Cvirkaitė-Krupovič, V., & Bamford, D. H. (2007). On-line monitoring of changes in host cell physiology during the one-step growth cycle of Bacillus phage Bam35. *Journal of microbiological methods*, 69(1), 174-179.
45. Davidson, A. R. (2018). A common trick for transferring bacterial DNA. *Science*, 362(6411), 152-153.
46. Denyes, J. M., Krell, P. J., Manderville, R. A., Ackermann, H. W., She, Y. M., & Kropinski, A. M. (2014). The genome and proteome of Serratia bacteriophage η which forms unstable lysogens. *Virology journal*, 11(1), 6.
47. Drewniak, L., Matlakowska, R., & Sklodowska, A. (2008). Arsenite and arsenate metabolism of Sinorhizobium sp. M14 living in the extreme environment of the Złoty Stok gold mine. *Geomicrobiology Journal*, 25(7-8), 363-370.
48. Drewniak, L., Matlakowska, R., Rewerski, B., & Sklodowska, A. (2010). Arsenic release from gold mine rocks mediated by the activity of indigenous bacteria. *Hydrometallurgy*, 104(3-4), 437-442.
49. Dziewit, L., Oscik, K., Bartosik, D., & Radlinska, M. (2014). Molecular characterization of a novel temperate Sinorhizobium bacteriophage, ΦLM21, encoding DNA methyltransferase with CcrM-like specificity. *Journal of virology*, 88(22), 13111-13124.
50. Echols, H., Green, L., Oppenheim, A. B., Oppenheim, A., & Honigman, A. (1973). Role of the cro gene in bacteriophage λ development. *Journal of molecular biology*, 80(2), 203-216.
51. Edwards, R. A., & Rohwer, F. (2005). Viral metagenomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), 504.
52. Eisenstein, E., Gilliland, G. L., Herzberg, O., Moul, J., Orban, J., Poljak, R. J., ... & Howard, A. J. (2000). Biological function made crystal clear—annotation of hypothetical proteins via structural genomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(1), 25-30.
53. Ellis, E. L., & Delbrück, M. (1939). The growth of bacteriophage. *The Journal of general physiology*, 22(3), 365-384.
54. Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., ... & Amitai, G. (2017). Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature*, 541(7638), 488.

55. Esposito, D., Fitzmaurice, W. P., Benjamin, R. C., Goodman, S. D., Waldman, A. S., & Scocca, J. J. (1996). The complete nucleotide sequence of bacteriophage HP1 DNA. *Nucleic acids research*, 24(12), 2360-2368.
56. EWING, W. H., DAVIS, B. R., FIFE, M. A., & LESSEL, E. F. (1973). Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) Bascomb et al.(formerly *Enterobacter liquefaciens*) and *Serratia rubidaea* (Stapp) comb. nov. and designation of type and neotype strains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23(3), 217-225.
57. Fan, L., Arvai, A. S., Cooper, P. K., Iwai, S., Hanaoka, F., & Tainer, J. A. (2006). Conserved XPB core structure and motifs for DNA unwinding: implications for pathway selection of transcription or excision repair. *Molecular cell*, 22(1), 27-37.
58. Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z., & Ladnyi, I. D. (1988). *Smallpox and its eradication* (Vol. 6). Geneva: World Health Organization.
59. Fitzmaurice, W. P., Waldman, A. S., Benjamin, R. C., Huang, P. C., & Scocca, J. J. (1984). Nucleotide sequence and properties of the cohesive DNA termini from bacteriophage HP1c1 of *Haemophilus influenzae* Rd. *Gene*, 31(1-3), 197-203.
60. Fokine, A., & Rossmann, M. G. (2014). Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*, 4(2), e28281.
61. Fortier, L. C., & Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), 354-365.
62. Fortuna, M. A., Barbour, M. A., Zaman, L., Hall, A. R., Buckling, A., & Bascombe, J. (2019). Coevolutionary dynamics shape the structure of bacteria-phage infection networks. *Evolution*, 73(5), 1001-1011.
63. Frederik A. Murphy, Claude M. Fauquet, David H.L. Bishop, Said A. Ghabrial, Audrey W. Jarvis, Giovanni P. Martelli, Mike A. Mayo, Max D. (2012) Summers Springer Science & Business Media.
64. Fujisawa, H., & Morita, M. (1997). Phage DNA packaging. *Genes to Cells*, 2(9), 537-545.
65. Gavini, F., Ferragut, C., Izard, D., Trinel, P. A., Leclerc, H., Lefebvre, B., & Mossel, D. A. A. (1979). *Serratia fonticola*, a new species from water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 29(2), 92-101.
66. Geiger, A., Fardeau, M. L., Falsen, E., Ollivier, B., & Cuny, G. (2010). *Serratia glossinae* sp. nov., isolated from the midgut of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiense*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(6), 1261-1265.
67. Gill, V. J., Farmer, J. J., Grimont, P. A., Asbury, M. A., & McIntosh, C. L. (1981). *Serratia ficaria* isolated from a human clinical specimen. *Journal of clinical microbiology*, 14(2), 234-236.
68. Graham, K., Freeman, M., Newkirk, H., Liu, M., Cahill, J., & Ramsey, J. (2019). Complete Genome Sequence of *Serratia marcescens* Phage MTx. *Microbiology Resource Announcements*, 8(25), e00573-19.
69. Grimes, M., & Hennerty, A. J. (1931). A study of bacteria belonging to the sub-genus *Aerobacter*. Royal Dublin Society.
70. Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2005). Genus XXXIV. *Serratia* Bizio 1823, 288AL. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. Volume two: the Proteobacteria, Part B: the Gammaproteobacteria. Springer, New York, 799-811.
71. Grimont, P. A. D., Farmer III, J. J., Grimont, F., Asbury, M. A., Brenner, D. J., & Deval, C. (1983, January). *Ewingella americana* gen. nov., sp. nov., a new Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. In *Annales De l'Institut Pasteur/Microbiologie* (Vol. 134, No. 1, pp. 39-52). Elsevier Masson.

72. Grimont, P. A. D., GRIMONT, F., Richard, C., Davis, B. R., Steigerwalt, A. G., & BRENNER, D. J. (1978b). Deoxyribonucleic acid relatedness between *Serratia plymuthica* and other *Serratia* species, with a description of *Serratia odorifera* sp. nov.(type strain: ICPB 3995). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 28(4), 453-463.
73. Grimont, P. A., & Grimont, F. (1978a). Biotyping of *Serratia marcescens* and its use in epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology*, 8(1), 73-83.
74. GRIMONT, P. A., JACKSON, T. A., AGERON, E., & NOONAN, M. J. (1988). *Serratia entomophila* sp. nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(1), 1-6.
75. Grkovic, S., Glare, T. R., Jackson, T. A., & Corbett, G. E. (1995). Genes Essential for Amber Disease in Grass Grubs Are Located on the Large Plasmid Found in *Serratia entomophila* and *Serratia proteamaculans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(6), 2218-2223.
76. Groth, A. C., & Calos, M. P. (2004). Phage integrases: biology and applications. *Journal of molecular biology*, 335(3), 667-678.
77. Guttman, B. S. (2001). Virus. *Encyclopedia of Genetics*, 2108–2114.
78. Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current opinion in virology*, 1(4), 298-303.
79. Hendrix, R. W. (2002). Bacteriophages: evolution of the majority. *Theoretical population biology*, 61(4), 471-480.
80. Henikoff, S., & Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(22), 10915-10919.
81. Heo, Y. J., Chung, I. Y., Choi, K. B., Lau, G. W., & Cho, Y. H. (2007). Genome sequence comparison and superinfection between two related *Pseudomonas aeruginosa* phages, D3112 and MP22. *Microbiology*, 153(9), 2885-2895.
82. Hunt, D. F., Yates, J. R., Shabanowitz, J., Winston, S., & Hauer, C. R. (1986). Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(17), 6233-6237.
83. ICTV (2018a). EC 50, Washington, DC, July 2018; Email ratification October 2018 (MSL #33)
84. ICTV (2018b). EC 50, Washington, DC, July 2018; Email ratification February 2019 (MSL #34)
85. Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., ... & Sebaihia, M. (2014). Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Genome biology and evolution*, 6(8), 2096-2110.
86. Iyer, L. M., Burroughs, A. M., & Aravind, L. (2005). The ASCH superfamily: novel domains with a fold related to the PUA domain and a potential role in RNA metabolism. *Bioinformatics*, 22(3), 257-263.
87. Janion, C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *International journal of biological sciences*, 4(6), 338.
88. Johnson, J. E. (2010). Virus particle maturation: insights into elegantly programmed nanomachines. *Current opinion in structural biology*, 20(2), 210-216.
89. Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research*, 36(suppl_2), W5-W9.
90. Juhala, R. J., Ford, M. E., Duda, R. L., Youlton, A., Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2000). Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdaoid bacteriophages. *Journal of molecular biology*, 299(1), 27-51.

91. Kemp, P., Garcia, L. R., & Molineux, I. J. (2005). Changes in bacteriophage T7 virion structure at the initiation of infection. *Virology*, 340(2), 307-317.
92. King, G., & Murray, N. E. (1995). Restriction alleviation and modification enhancement by the Rac prophage of *Escherichia coli* K-12. *Molecular microbiology*, 16(4), 769-777.
93. Kostyuchenko, V. A., Leiman, P. G., Chipman, P. R., Kanamaru, S., Van Raaij, M. J., Arisaka, F., ... & Rossmann, M. G. (2003). Three-dimensional structure of bacteriophage T4 baseplate. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(9), 688.
94. Krafft, T., & Macy, J. M. (1998). Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *European Journal of Biochemistry*, 255(3), 647-653.
95. Krasnykh, V., Belousova, N., Korokhov, N., Mikheeva, G., & Curiel, D. T. (2001). Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibritin. *Journal of virology*, 75(9), 4176-4183.
96. Kropinski, A., Turner, D., Nash, J., Ackermann, H. W., Lingohr, E., Warren, R., ... & Ehrlich, M. (2018). The sequence of two bacteriophages with hypermodified bases reveals novel phage-host interactions. *Viruses*, 10(5), 217.
97. Kropiński, A. M. (2018). Practical advice on the one-step growth curve. In *Bacteriophages* (pp. 41-47). Humana Press, New York, NY.
98. Krupovic, M., Prangishvili, D., Hendrix, R. W., & Bamford, D. H. (2011). Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 75(4), 610-635.
99. Labonté, J. M., Pachiadaki, M., Fergusson, E., McNichol, J., Grosche, A., Gulmann, L. K., ... & Stepanauskas, R. (2019). Single cell genomics-based analysis of gene content and expression of prophages in a diffuse-flow deep-sea hydrothermal system. *Frontiers in Microbiology*, 10.
100. Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317.
101. Laslett, D., & Canback, B. (2004). ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic acids research*, 32(1), 11-16.
102. Laverman, A. M., Blum, J. S., Schaefer, J. K., Phillips, E., Lovley, D. R., & Oremland, R. S. (1995). Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(10), 3556-3561.
103. Lawrence, J. G., Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2002). Imbrolios of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. *Journal of bacteriology*, 184(17), 4891-4905.
104. Lebedev, A. A., Krause, M. H., Isidro, A. L., Vagin, A. A., Orlova, E. V., Turner, J., ... & Antson, A. A. (2007). Structural framework for DNA translocation via the viral portal protein. *The EMBO journal*, 26(7), 1984-1994.
105. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (62), e3923.
106. Leplae, R., Lima-Mendez, G., & Toussaint, A. (2009). ACLAME: a CLAssification of Mobile genetic Elements, update 2010. *Nucleic acids research*, 38(suppl_1), D57-D61.
107. Lepore, B. W., Ruzicka, F. J., Frey, P. A., & Ringe, D. (2005). The x-ray crystal structure of lysine-2, 3-aminomutase from *Clostridium subterminale*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13819-13824.
108. Lin, H., & Black, L. W. (1998). DNA requirements in vivo for phage T4 packaging. *Virology*, 242(1), 118-127.

- 109.Lin, N. T., Chiou, P. Y., Chang, K. C., Chen, L. K., & Lai, M. J. (2010). Isolation and characterization of ϕ AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Research in microbiology*, 161(4), 308-314.
- 110.Loeffler, F., & Frosch, P. (1898). Report of the commission for research on foot-and-mouth disease. *Zentrabl. Bacteriol. Parasitenkunde Infektionkrankh.*, 23, 371-391.
- 111.Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage endolysins—current state of research and applications. *Current opinion in microbiology*, 8(4), 480-487.
- 112.Lopes, A., Tavares, P., Petit, M. A., Gu erois, R., & Zinn-Justin, S. (2014). Automated classification of tailed bacteriophages according to their neck organization. *BMC genomics*, 15(1), 1027.
- 113.Lu, M. J., & Henning, U. (1994). Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *Trends in microbiology*, 2(4), 137-139.
- 114.Ło , M., & Węgrzyn, G. (2012). Pseudolysogeny. In *Advances in virus research* (Vol. 82, pp. 339-349). Academic Press.
- 115.Mahony, J., Alqarni, M., Stockdale, S., Spinelli, S., Feyereisen, M., Cambillau, C., & Van Sinderen, D. (2016). Functional and structural dissection of the tape measure protein of lactococcal phage TP901-1. *Scientific reports*, 6, 36667.
- 116.Marsh, P., & Wellington, E. M. H. (1994). Phage-host interactions in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 15(1-2), 99-107.
- 117.Marsin, S., McGovern, S., Ehrlich, S. D., Bruand, C., & Polard, P. (2001). Early steps of *Bacillus subtilis* primosome assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 45818-45825
- 118.Matilla, M. A., & Salmond, G. P. (2012). Complete genome sequence of *Serratia plymuthica* bacteriophage ϕ MAM1. *J Virol*. 86(24):13872-3. doi: 10.1128/JVI.02702-12
- 119.Matsushita, N., Sogawa, K., Ema, M., Yoshida, A., & Fujii-Kuriyama, Y. (1993). A factor binding to the xenobiotic responsive element (XRE) of P-4501A1 gene consists of at least two helix-loop-helix proteins, Ah receptor and Arnt. *Journal of Biological Chemistry*, 268(28), 21002-21006.
- 120.Mc Grath, S., & van Sinderen, D. (Eds.). (2007). *Bacteriophage: genetics and molecular biology*. Horizon Scientific Press.
- 121.Mohl, D. A., Easter Jr, J., & Gober, J. W. (2001). The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology*, 42(3), 741-755
- 122.Mohr, I. J., Pe'ery, T., & Mathews, M. B. (2007). 20 Protein Synthesis and Translational Control during Viral Infection. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 48, 545-599.
- 123.Molineux, I. J. (2001). No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Molecular microbiology*, 40(1), 1-8.
- 124.Moore, S. D., & Prevelige Jr, P. E. (2002). Bacteriophage p22 portal vertex formation in vivo. *Journal of molecular biology*, 315(5), 975-994.
- 125.Murray, C. L., & Rabinowitz, J. C. (1982). Nucleotide sequences of transcription and translation initiation regions in *Bacillus* phage phi 29 early genes. *Journal of Biological Chemistry*, 257(2), 1053-1062.
- 126.Nicholson, W. L., Leonard, M. T., Fajardo-Cavazos, P., Panayotova, N., Farmerie, W. G., Triplett, E. W., & Schuerger, A. C. (2013). Complete genome sequence of *Serratia liquefaciens* strain ATCC 27592. *Genome Announc.*, 1(4), e00548-13.
- 127.Novick, R. P., Christie, G. E., & Penad s, J. R. (2010). The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 541.

128. Onesti, S., Miller, A. D., & Brick, P. (1995). The crystal structure of the lysyl-tRNA synthetase (LysU) from *Escherichia coli*. *Structure*, 3(2), 163-176.
129. Ostendorf, T., Cherepanov, P., de Vries, J., & Wackernagel, W. (1999). Characterization of a dam Mutant of *Serratia marcescens* and Nucleotide Sequence of the dam Region. *Journal of bacteriology*, 181(13), 3880-3885.
130. Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., ... & Vonstein, V. (2013). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research*, 42(D1), D206-D214.
131. PAINE, S. G., & Stansfield, H. (1919). STUDIES IN BACTERIOSIS. III.: A BACTERIAL LEAF-SPOT DISEASE OF *PEOTEA CYNAROIDES*, EXHIBITING A HOST REACTION OF POSSIBLY BACTERIOLYTIC NATURE. *Annals of Applied Biology*, 6(1), 27-39.
132. Parker, A. P., & Dean, D. H. (1986). Temperate *Bacillus* bacteriophage SP16 genome is circularly permuted and terminally redundant. *Journal of bacteriology*, 167(2), 719-721.
133. Paschen, E. (1906). Was wissen wir über den Vakzineerreger. *Münchener medizinische Wochenschrift*, 53, 2391-2393.
134. Pawluk, A., Staals, R. H., Taylor, C., Watson, B. N., Saha, S., Fineran, P. C., ... & Davidson, A. R. (2016). Inactivation of CRISPR-Cas systems by anti-CRISPR proteins in diverse bacterial species. *Nature microbiology*, 1(8), 16085.
135. Pennisi, E. (2011). Will computers crash genomics? doi:10.1126/science.331.6018.666
136. Perez, F. (2004). Serial Cloner v. 2.6. 0. Software SerialBasics.
137. Rafferty, J. B., Bolt, E. L., Muranova, T. A., Sedelnikova, S. E., Leonard, P., Pasquo, A., ... & Lloyd, R. G. (2003). The structure of *Escherichia coli* RusA endonuclease reveals a new Holliday junction DNA binding fold. *Structure*, 11(12), 1557-1567.
138. Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S., & Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol. J. Microbiol*, 59(3), 145-155.
139. Raya, R. R., Fremaux, C., De Antoni, G. L., & Klaenhammer, T. R. (1992). Site-specific integration of the temperate bacteriophage phi adh into the *Lactobacillus gasseri* chromosome and molecular characterization of the phage (attP) and bacterial (attB) attachment sites. *Journal of bacteriology*, 174(17), 5584-5592.
140. Reed, W., Carroll, J. A. S., & Agramonte, A. (1901). THE ETIOLOGY OF YELLOW FEVER.: AN ADDITIONAL NOTE. *Journal of the American Medical Association*, 36(7), 431-440.
141. Rekapalli, B., Halloy, C., & Zhulin, I. B. (2009, March). HSP-HMMER: a tool for protein domain identification on a large scale. In *Proceedings of the 2009 ACM symposium on Applied Computing* (pp. 766-770). ACM.
142. Roberts, J. W., Yarnell, W., Bartlett, E., Guo, J., Marr, M., Ko, D. C., ... & Roberts, C. W. (1998, January). Antitermination by bacteriophage λ Q protein. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 63, pp. 319-326). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
143. Rohozková, J., Šebela, M., & Navrátil, M. (2014). P1 peptidase of Pea seed-borne mosaic virus contains non-canonical C2H2 zinc finger and may act in a truncated form. *Journal of Plant Science and Molecular Breeding*, 3(1), 1.
144. Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A., & Barrell, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16(10), 944-945.
145. Sabri, A., Leroy, P., Haubruge, E., Hance, T., Frere, I., Destain, J., & Thonart, P. (2011). Isolation, pure culture and characterization of *Serratia symbiotica* sp. nov., the R-type of secondary endosymbiont of the black bean aphid *Aphis fabae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(9), 2081-2088.

146. Santiago, A. E., Ruiz-Perez, F., Jo, N. Y., Vijayakumar, V., Gong, M. Q., & Nataro, J. P. (2014). A large family of antivirulence regulators modulates the effects of transcriptional activators in Gram-negative pathogenic bacteria. *PLoS pathogens*, 10(5), e1004153.
147. Santos, S. B., Kropinski, A. M., Ceysens, P. J., Ackermann, H. W., Villegas, A., Lavigne, R., ... & Azeredo, J. (2011). Genomic and proteomic characterization of the broad-host-range *Salmonella* phage PVP-SE1: creation of a new phage genus. *Journal of Virology*, 85(21), 11265-11273.
148. Schuch, R., & Fischetti, V. A. (2009). The secret life of the anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage-mediated ecological adaptations. *PloS one*, 4(8), e6532.
149. Schwartz, M. (1976). The adsorption of coliphage lambda to its host: effect of variations in the surface density of receptor and in phage-receptor affinity. *Journal of molecular biology*, 103(3), 521-536.
150. Sebahia, M., Wren, B. W., Mullany, P., Fairweather, N. F., Minton, N., Stabler, R., ... & Holden, M. T. (2006). The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature genetics*, 38(7), 779.
151. Seki, M., Enomoto, T., Yanagisawa, J., Hanaoka, F., & Ui, M. (1988). Further characterization of DNA helicase activity of mouse DNA-dependent adenosine triphosphatase B (DNA helicase B). *Biochemistry*, 27(5), 1766-1771.
152. Shen, M., Yang, Y., Shen, W., Cen, L., McLean, J. S., Shi, W., ... & He, X. (2018). A linear plasmid-like prophage of *Actinomyces odontolyticus* Promotes Biofilm Assembly. *Applied and environmental microbiology*, 84(17), e01263-18.
153. Shin, J., Jardine, P., & Noireaux, V. (2012). Genome replication, synthesis, and assembly of the bacteriophage T7 in a single cell-free reaction. *ACS synthetic biology*, 1(9), 408-413.
154. Shinder, G. A. Y. L. E., & Gold, M. A. R. V. I. N. (1988). The Nul subunit of bacteriophage lambda terminase binds to specific sites in cos DNA. *Journal of virology*, 62(2), 387-392.
155. Sillankorva, S., Neubauer, P., & Azeredo, J. (2008). Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens*. *BMC biotechnology*, 8(1), 80.
156. Slater, S. C., Lifshits, M. R., O'Donnell, M., & Maurer, R. (1994). holE, the gene coding for the theta subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*: characterization of a holE mutant and comparison with a dnaQ (epsilon-subunit) mutant. *Journal of Bacteriology*, 176(3), 815-821.
157. Söding, J. (2004). Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics*, 21(7), 951-960.
158. Srinivasiah, S., Bhavsar, J., Thapar, K., Liles, M., Schoenfeld, T., & Wommack, K. E. (2008). Phages across the biosphere: contrasts of viruses in soil and aquatic environments. *Research in Microbiology*, 159(5), 349-357.
159. Stapp, C. (1940). *Bacterium rubidaenum* nov. spec. *Zentralbl Bakteriol Abt*, 102, 251-261.
160. Stern, A., & Sorek, R. (2011). The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes. *Bioessays*, 33(1), 43-51.
161. Sullivan, M. B., Lindell, D., Lee, J. A., Thompson, L. R., Bielawski, J. P., & Chisholm, S. W. (2006). Prevalence and evolution of core photosystem II genes in marine cyanobacterial viruses and their hosts. *PLoS biology*, 4(8), e234.
162. Sun, S., Rao, V. B., & Rossmann, M. G. (2010). Genome packaging in viruses. *Current opinion in structural biology*, 20(1), 114-120.
163. Sun, X., Göhler, A., Heller, K. J., & Neve, H. (2006). The ltp gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 confers superinfection exclusion to *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. *Virology*, 350(1), 146-157.

164. Susskind, M. M., Botstein, D., & Wright, A. (1974). Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*: III. Failure of superinfecting phage DNA to enter *sieA*⁺ lysogens. *Virology*, 62(2), 350-366.
165. Suttle, C. A. (2005). Viruses in the sea. *Nature*, 437(7057), 356.
166. Tang, J., Lander, G. C., Olia, A., Li, R., Casjens, S., Prevelige Jr, P., ... & Johnson, J. E. (2011). Peering down the barrel of a bacteriophage portal: the genome packaging and release valve in p22. *Structure*, 19(4), 496-502.
167. Taylor, K., & Węgrzyn, G. (1995). Replication of coliphage lambda DNA. *FEMS microbiology reviews*, 17(1-2), 109-119.
168. Touchon, M., Bernheim, A., & Rocha, E. P. (2016). Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. *The ISME journal*, 10(11), 2744.
169. Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 186(4814), 1241-1243
170. Vandamme, E. J., & Mortelmans, K. (2019). A century of bacteriophage research and applications: impacts on biotechnology, health, ecology and the economy!. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(2), 323-342.
171. Vogel, W., & Schmieger, H. (1986). Selection of bacterial *pac* sites recognized by *Salmonella* phage P22. *Molecular and General Genetics MGG*, 205(3), 563-567.
172. Walker, D. H., & Anderson, T. F. (1970). Morphological variants of coliphage P1. *Journal of virology*, 5(6), 765-782.
173. Walters, J. P., Meng, X., Chaudhary, V., Oliver, T., Yeow, L. Y., Schmidt, B., ... & Landman, J. (2007). MPI-HMMER-boost: distributed FPGA acceleration. *The Journal of VLSI Signal Processing Systems for Signal, Image, and Video Technology*, 48(3), 223-238.
174. Wang, X., Kim, Y., Ma, Q., Hong, S. H., Pokusaeva, K., Sturino, J. M., & Wood, T. K. (2010). Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nature communications*, 1, 147.
175. Wei, Y., Vollmer, A. C., & LaRossa, R. A. (2001). In vivo titration of mitomycin C action by four *Escherichia coli* genomic regions on multicopy plasmids. *Journal of bacteriology*, 183(7), 2259-2264.
176. Weinbauer, M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS microbiology reviews*, 28(2), 127-181.
177. Wilson, C. R. (2014). *Applied plant virology*. CABI.
178. Wilson, G. G., & Murray, N. E. (1991). Restriction and modification systems. *Annual review of genetics*, 25(1), 585-627.
179. Wommack, K. E., & Colwell, R. R. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(1), 69-114
180. Xu, J., & Xiang, Y. (2017). Membrane penetration by bacterial viruses. *Journal of virology*, 91(13), e00162-17.
181. Yu, L., Wen, Z., Yang, W., Li, N., Wang, J., Lu, J., & Li, J. (2008). Isolation and characterization of *Serratia marcescens* phage. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 48(4), 498-502.
182. Zhang, C. X., Yang, S. Y., Xu, M. X., Sun, J., Liu, H., Liu, J. R., ... & Zhang, K. Y. (2009). *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditidoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(7), 1603-1608.
183. Zhang, J., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. J. (2019). Overview of Viruses. *Diseases of Swine*, 425-437.

184.Zięcina M., 2014. Analiza genomyczna bakteriofagów łagodnych z psychrofilnych szczepów *Pseudomonas* spp. *Praca dyplomowa realizowana na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.*

Strony:

- talk.ictvonline.org/taxonomy
- texasgateway.org
- viralzone.expasy.org
- biodev.cea.fr/virfam
- ebi.ac.uk
- wikipedia.org