

Ждид Гадир

**Новые бактериофаги патогенных и условно-патогенных  
бактерий: изучение их свойств и факторов, влияющих на их  
взаимодействие с бактериями**

1.5.3 – Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский национальный университет»

Научный руководитель:

**Нина Викторовна Тикунова**, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, заведующий лабораторией.

**Вера Витальевна Морозова**, к.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Официальные оппоненты:

**Мирошников Константин Анатольевич**, д.х.н., член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр РФ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии.

**Филипенко Максим Леонидович**, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, заведующий лабораторией фармакогеномики.

**Жожевникова Елена Николаевна**, к.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, заведующий лабораторией моделирования патологий человека.

Защита состоится «3» июля 2026 г. В 12 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан «...» мая 2026 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

к.х.н.

Пестряков П. Е.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

С ростом антибиотикорезистентности бактериофаги (фаги) вновь приобретают популярность как перспективная и эффективная терапевтическая альтернатива. Эти вирусы бактерий всё чаще используются для лечения пациентов, а правила их применения активно обсуждаются и внедряются по всему миру (*Huff et al., 2004; Furfaro et al., 2018*). Это сопровождается многочисленными исследованиями оптимальных способов применения фагов в терапии. Известно, что фаги обладают рядом преимуществ перед антибиотиками; в отличие от антибиотиков, они широко доступны в природе, они способны адаптироваться к своим бактериальным хозяевам и обладают высокой специфичностью, что позволяет им не повреждать здоровую микрофлору.

Эта высокая специфичность, характерная для большинства фагов, представляет потенциальный недостаток. Высокая специфичность означает, что подходящие фаги могут отсутствовать для конкретного патогенного бактериального штамма пациента. Для решения этой проблемы новый фаг может быть изолирован из природы с использованием патогенного штамма. В этом случае характеристики фага должны быть тщательно изучены для подтверждения его пригодности к терапии. Не все фаги можно использовать в терапии, например, лизогенные фаги, даже если они специфичны к патогенному штамму, непригодны, поскольку они могут усиливать негативные свойства целевой бактерии и даже защищать ее от других литических фагов. Слаболитические фаги также не являются предпочтительным вариантом для терапии, даже если это единственный доступный вариант, и поэтому их редко используют для фаготерапии (*Hassan et al., 2021*).

Важно отметить, что существующий литический фаг можно адаптировать к штамму пациента. Эта адаптация проводится путём инкубации фага с целевым штаммом в течение ряда пассажей (*Edigo et al., 2022*). Взаимодействие между фагом и бактерией может вызывать спонтанные мутации в геноме фага, позволяющие ему приспособиться и инфицировать новый штамм (*Habusha et al., 2019*). Результаты этой процедуры неоднозначны и зависят от множества факторов. Выбор правильных факторов может ускорить процесс адаптации и создать высоко литические фаги с расширенным спектром хозяев. Однако процесс адаптации фагов в различных условиях с последующим отбором факторов и скринингом лучших вариантов трудоёмок, и существует потребность в его совершенствовании.

Помимо изучения характеристик фагов и их взаимодействия с бактериями, крайне важно понимать бактериального хозяина и его механизмы защиты от фагов. В ходе эволюционной истории бактерии накопили широкий спектр антифаговых систем защиты и механизмов, позволяющих им уклоняться от потенциально терапевтических фагов (*Niault et al., 2025; Zhang et al., 2025*). Изучение распространения антифаговых систем позволяет выбирать терапевтические фаги с контрмеханизмами. Например, целевая бактерия может обладать системами рестрикции-модификации, разрушающими геномы фагов; в этом случае фаг, модифицирующий свой геном, сможет противостоять бактериальным ферментам и даст лучшие терапевтические результаты. Кроме того, бактерии могут избегать фаговой инфекции путём мутаций или снижения экспрессии мембранных белков, используемых фагами как рецепторы. Некоторые из этих белков играют роль в антибиотикорезистентности, и в этом случае,

при снижении их экспрессии и появлении резистентности к фагу восстанавливается чувствительность инфекционного агента к антибиотикам.

По всем вышеуказанным причинам изучение этих трёх направлений — пригодности фагов к терапии, спектра бактериальных систем защиты и возможной коэволюции между фагами и бактериями имеет критическое значение, поскольку это позволяет разрабатывать лучшие варианты лечения и расширять наше понимание факторов, способствующих успеху фаговой терапии.

**Целью** данной работы являлась микробиологическая и генетическая характеристика новых бактериофагов и изучение их взаимодействия со своими бактериальными хозяевами, включая противофаговые защитные системы последних. Исходя из поставленной цели, были решены следующие задачи:

1. Изучение биологических свойств фагов *Enterobacter cloacae* EC151 и EC152, *Aeromonas popoffii* AepP\_220 и *Stenotrophomonas maltophilia* StM171.

2. Анализ особенностей геномов фагов *E. cloacae* EC151 и EC152, *A. popoffii* AepP\_220 и *S. maltophilia* StM171 и определение их таксономического положения.

3. Изучение динамики эволюции фагов *E. cloacae* EC151 и EC152, а также фагов *S. maltophilia* StM171 и StenM174 при культивировании их с бактериями-хозяевами в различных условиях.

4. Пангеномный анализ систем защиты от фагов *S. maltophilia*, включая штаммы, чувствительные к фагу StM171, и поиск генов устойчивости к антибиотикам в геномах фагочувствительных штаммов.

**Научная новизна работы.** Впервые изучены литические свойства и организация геномов фагов *E. cloacae* EC151 и EC152, *A. popoffii* AepP\_220 и *S. maltophilia* StM171. Для таксономической классификации этих фагов были предложены три новых таксономических единицы. Проанализирована динамика эволюции фагов *E. cloacae* EC151 и EC152, а также *S. maltophilia* StenM171 и StenM174 в различных условиях. Для изучения ко-эволюции фагов была оптимизирован метод количественного ПЦР (qPCR). Изучены геномные особенности пяти новосибирских штаммов *S. maltophilia* – хозяев StM171 и определены системы устойчивости к антибиотикам. Впервые проведен пангеномный анализ для 72 штаммов *S. maltophilia*, имевших корректный уровень сборки геномов; проанализированы их системы антифаговой защиты.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В рамках данной работы были изучены четыре новых бактериофага и их взаимодействие с бактериальными хозяевами. Исследование предоставило новые сведения о факторах, которые могут быть использованы для адаптации фагов для терапевтических целей. Получены данные о системах антифаговой защиты *S. maltophilia* и имеющихся в геномах этих бактерий островках защиты, что позволяет более эффективно подбирать фаги для терапии и выявлять новые системы защиты. Эти результаты имеют важное значение для повышения эффективности фаговой терапии, особенно в отношении бактерий с высокой устойчивостью к антибиотикам.

**Методология и методы исследования.** В исследовании использовали методы микробиологии и молекулярной биологии, а также инструменты биоинформатики для анализа геномов фагов и бактерий.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Комплексная геномная характеристика показала, что фаг *S. maltophilia* StM171 является представителем нового вида *Nordvirus*, а фаг *A. popoffii* AerP\_220 – представителем нового рода *Yinyavirus* и нового подсемейства *Tolavirinae*.
2. Фаг StM171 может способствовать восстановлению чувствительности к бета-лактамам антибиотикам и появлению резистентности к эритромицину у бактерий-хозяев.
3. Адаптация фагов EC151, EC152, StM171 и StenM174 к их бактериальным хозяевам с течением времени зависит от особенностей фага и условий ко-эволюции; присутствие эволюционно наивного хозяина улучшает результаты адаптации.
4. Комплекс *S. maltophilia* содержит широкий набор систем защиты от фагов, которые значительно различаются у разных штаммов, и островки антифаговой защиты представляют собой консервативные участки генома *S. maltophilia*.

**Личный вклад соискателя.** Автор самостоятельно провел исследования биологических характеристик фагов и бактерий, в том числе: исследование бактериальных биопленок, исследование профиля антибиотикорезистентности бактериальных штаммов и др. Автор также самостоятельно провел биоинформационный анализ геномов фагов и бактерий, включая обработку данных секвенирования и исследование бактериальных систем защиты от фагов. Автор самостоятельно оптимизировал метод qPCR для изучения биологических характеристик фагов. Автор разработал концепцию и спланировал следующие исследовательские проекты: изучение фага StM171, исследование эволюции бактериофагов *in vitro* с использованием qPCR для определения эффективности фаговой инфекции, исследование *in silico* геномных особенностей изучаемых штаммов бактерий.

Изучаемые фаги первоначально были изолированы к.б.н. Ю.Н. Козловой, секвенирование геномов фагов было проведено к.б.н. А.Ю. Тикунным, (ЛММБ ИХБФМ СО РАН), секвенирование бактериальных геномов – к.б.н. А. Манаховым (Университет Сириус, Сочи), визуализация фагов с помощью электронной микроскопии была выполнена в лаборатории микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН, анализ полученных данных проводился совместно с к.б.н. Морозовой В.В. и д.б.н. Тикуновой Н.В.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Основные положения работы представлены на 13 международных конференциях: Open-Bio (Россия, 2020, 2023 и 2024), Evergreen (США, 2020), Конференция сирийских исследователей-эмигрантов (Сирия, 2020, 2022 и 2024), BioTop (Россия, 2020), От Молекулярной биологии до генетической диагностики (Россия, 2023), Европейский конгресс клинической микробиологии и инфекционных заболеваний (Дания, 2023), Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению (Россия, 2024).

По материалам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

**Объём и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Текст изложен на 174 страницах, иллюстрирован 41 рисунком, включает 8 таблиц, список литературы и содержит 365 библиографических источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Характеристика фагов EC151 и EC152, инфицирующих *E. cloacae*, AерP\_220, инфицирующего *A. popoffii*, и StM171, инфицирующего *S. maltophilia*.

Изучены биологические, геномные и таксономические характеристики четырех фагов, выделенных в Новосибирской области. Электронная микроскопия показала, что фаги EC151 и StM171 имеют сифовирусную морфологию; фаг EC152 - миовирус с длинным сокращающимся хвостом; а фаг AерP\_220 - подовирус с коротким хвостом (рис. 1). Фаги EC151 и EC151 образовывали мутные нечеткие бляшки, а у AерP\_220 и StM171 бляшки были прозрачными, при этом вокруг бляшек у AерP\_220 имелся полупрозрачный ареол. Все фаги обладали узким спектром специфичности к хозяину. EC151, EC152 и StM171 проявляли слабую литическую активность; фаг AерP\_220 уменьшал количество клеток штамма-хозяина на три порядка в течение 60 минут; выход фагового потомства составлял около 20 вирионов на клетку.

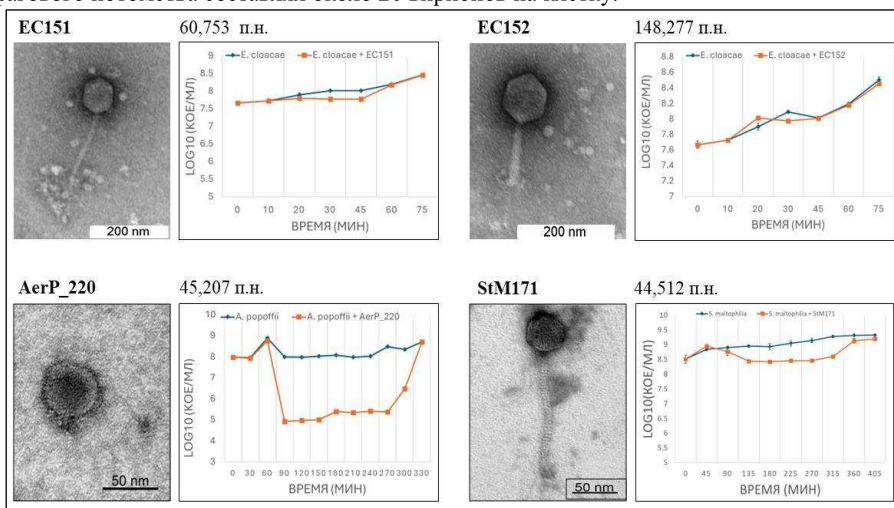
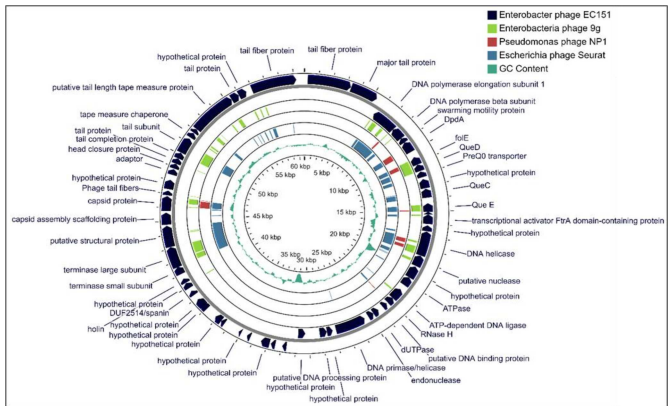


Рисунок 1. Размер геномов, морфология и литическая кривая изученных фагов (Morozova et al., 2021, 2022; Jdeed et al., 2023).

Геномы всех исследованных фагов представляли собой двухцепочечную ДНК и содержали гены, ответственные за ранние стадии инфекции, производство вирионов, инкапсуляцию, лизис клеток, хвостовые фибриллы и рецептор-связывающие белки, вспомогательные гены, а также механизмы противодействия бактериальным защитным системам против фагов.

В геноме фага EC151 (60753 bp; GenBank MW464860) обнаружено 58 открытых рамок трансляции (ORF), и был идентифицирован кластер генов, кодирующих компоненты деазагуанинового пути модификации ДНК (рис. 2А). Эти белки отвечают за модификацию гуанинов в геноме фага, защищая его от бактериальных эндонуклеаз. Было установлено, что ДНК EC151 обладает устойчивостью к эндонуклеазам, имеющим в сайте гидролиза гуанин. Нуклеотидная последовательность EC151 показала ограниченное сходство с геномами других фагов, а сравнительный протеомный анализ показал, что он образует отдельную ветвь в кластере, сформированном представителями

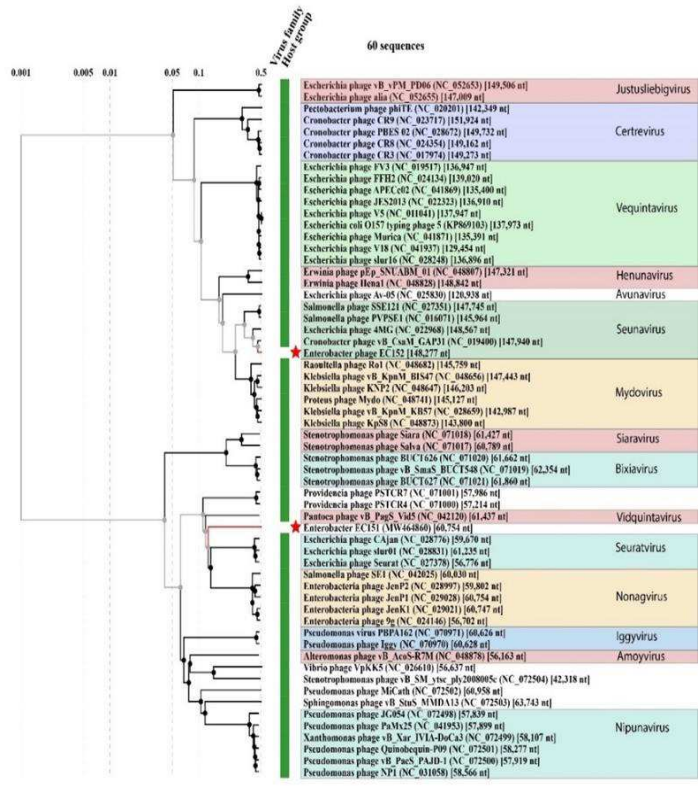


A

Left line: Virus family

Right line: Host group

Pseudomonadota (58)



Б

Рисунок 2. А. Карта генома фага EC151, построенная с использованием сервера Proksee. ORF генома EC151 обозначены тёмно-синим цветом в двух внешних кругах. TBLASTX использовали для сравнения сходства последовательностей EC151 с геномами подобных фагов (обозначения приведены в легенде) (Morozova et al., 2021). Б. Филогенетический протеомный анализ фагов EC151 и EC152 с использованием ViPTree.

родов *Seuratvirus* и *Nonagvirus*. Поскольку генетические расстояния между EC151 и близкими родами были схожи с генетическими расстояниями между этими родами (~0,7 замен на сайт), фаг EC151 может представлять собой новый род (рис. 2Б).

В геноме фага EC152 (148277 bp; GenBank PP681140) обнаружено 286 ORF. Он является умеренным фагом, поскольку имеет гены интегразы и транспозазоподобных белков (рис. 3). Фаг EC152 адаптировался к антифаговым системам защиты бактерий, используя гены gIIA и gIIB, а также ферменты ДНК-метилтрансферазы для защиты от бактериальных систем RerAB и эндонуклеаз, соответственно. Также этот фаг обладает полным путем восстановления NAD<sup>+</sup>, что редко встречается у фагов, и этот путь может позволять фагу эффективно захватывать предшественники NAD<sup>+</sup> из клетки-хозяина для обеспечения собственной репликации и защищать его от бактериальных антифаговых систем, которые деградируют NAD<sup>+</sup>, такие как система Thoeris. Фаг EC152 относится к роду *Seunavirus*, который включает фаги с размером генома ~150 кб. Все фаги этого рода включают полный путь восстановления NAD<sup>+</sup> (рис. 2Б).

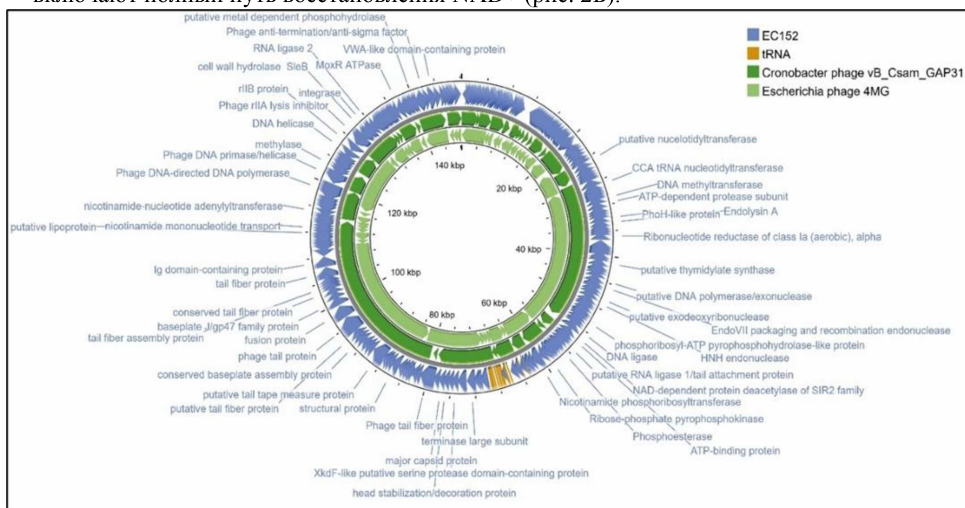
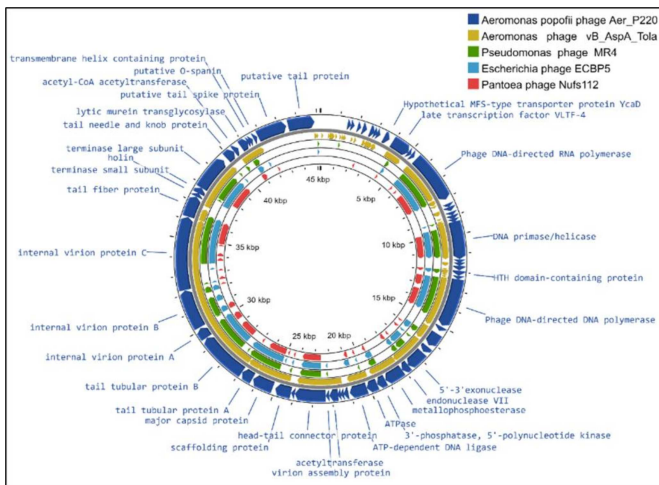
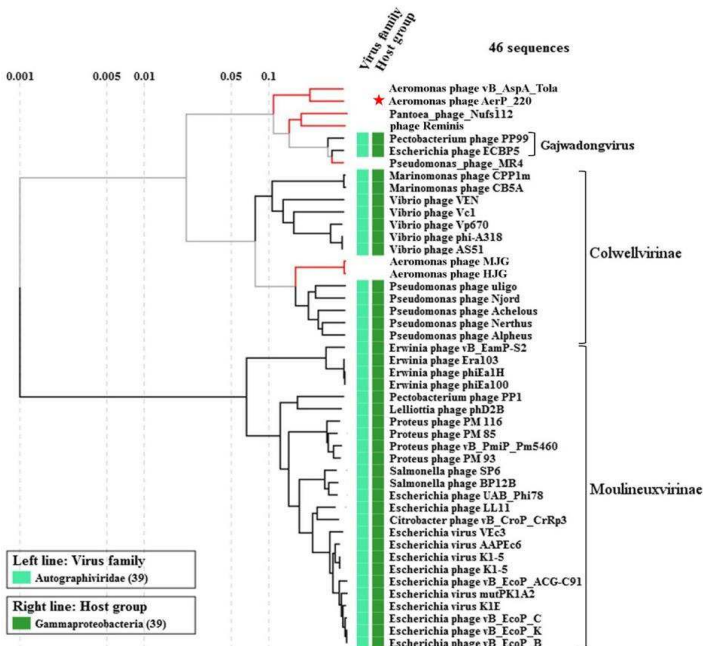


Рисунок 3. Карта генома фага EC152, построенная с использованием сервера Proksee. ORF генома EC152 обозначены синим цветом во внешнем круге; гены tRNA выделены коричневым цветом. Для сравнения сходства последовательностей использовали TBLASTX в сравнении с фагом *Escherichia* 4MG (светло-зеленый) и фагом *Cronobacter* vB\_Csam\_GAP31 (тёмно-зеленый).

В геноме фага AerP\_220 (45207 bp; GenBank ON624112) обнаружено 59 ORF. В геноме этого фага не были обнаружены гены, кодирующие факторы вирулентности и гены устойчивости к антибиотикам (рис. 4А). Сравнительный протеомный анализ показал, что фаги AerP\_220 и Tola образуют отдельную ветвь в кластере, содержащем фаги рода *Gajwadongvirus*. Однако, межгеномная идентичность геномов AerP\_220 и vB\_AspA\_Tola была менее 70%, и таксономический комитет выделил фаг AerP\_220 в новый род *Yinyavirus* (Рис. 4Б). На основе кластерного анализа, выполненного путем сопоставления протеомов этого фага и других фагов, предполагается, что род *Yinyavirus* вместе с родом *Gajwadongvirus* образует новое подсемейство. Сходство между фагами внутри предлагаемого подсемейства *Tolavirinae* сопоставимо со сходством между



A



Б

Рисунок 2. А. Карта генома фага *Aeromonas* AerP\_220, визуализированная с помощью Proksee. ORF генома AerP\_220 обозначены синим цветом и показаны во внешнем круге; подписаны белки с предсказанными функциями. Алгоритм TBLASTX использовался для сравнительного выравнивания геномов AerP\_220, фага *Aeromonas* vB\_AspA\_Tola (OM913599), фага *Pseudomonas* MR4 (MT104467), фага *Escherichia* ECBP5 (KJ749827) и фага *Pantoea* Nufs112 (OK570185). Б. Филогенетический протеомный анализ фага AerP\_220, выполненный с использованием ViPTree (Morozova et al., 2022).

фагами внутри подсемейств *Colwellvirinae* и *Moulineuxvirinae* и выше, чем сходство между этими подсемействами что подтверждает, что фаг AerP\_220 образует новое подсемейство с названием *Tolavirinae* (рис. 6А).

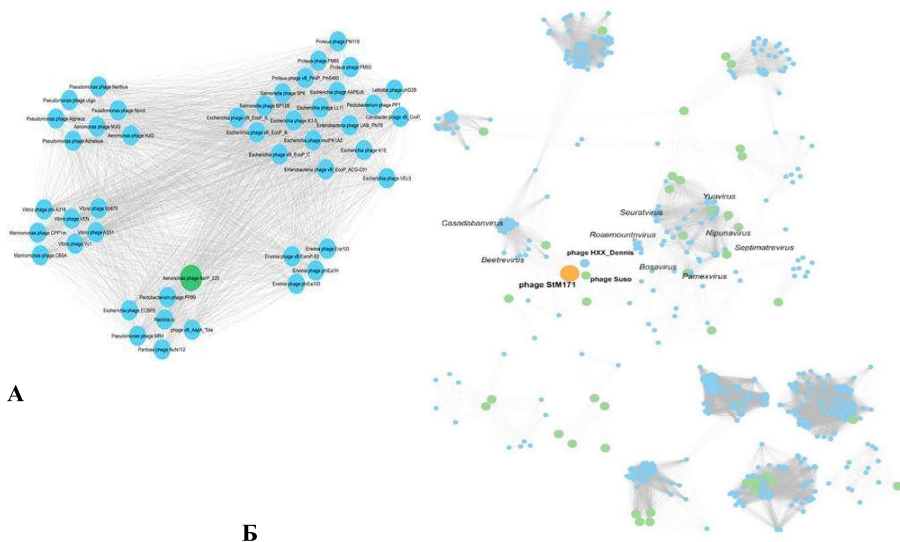


Рисунок 6. Кластерный анализ белков фагов (А) AerP\_220 (зелёный круг) и (Б) StM171 (оранжевый круг), выполненный с помощью VconTACT2. Визуализацию проводили с помощью программного обеспечения Cytoscape. Узлы указывают на геномы фагов, а ребра между каждым двумя узлами указывают на их статистически взвешенные попарные сходства. Длина ребра пропорциональна значениям сходства, оцененным с помощью гипергеометрического уравнения (Morozova et al., 2022; Jdeed et al., 2023).

В геноме фага StM171 (44512 bp; GenBank MZ611865) обнаружено 59 ORF. В отличие от других изученных фагов, гены, кодирующие ДНК- или РНК-полимеразы, в геноме этого фага обнаружены не были. Сравнительный анализ генома показал наибольшее сходство с двумя фагами с другого континента: фаги *S. maltophilia* Suso (MZ326866) и *Xanthomonas* HXX\_Dennis (ON711490). StM171 имеет высокий уровень нуклеотидной идентичности (95%) с этими фагами (рис. 7). Согласно протеомному филогенетическому анализу, выполненному с помощью ViPTree, эти три фага формируют отдельную ветвь в кладе с фагами из родов *Phrappuccinovirus*, *Skogvirus* и *Puppervirus* (рис. 8). Кластерный анализ, на основе сходства белков фагов с белками других фагов, подтвердил, что фаг StM171 не принадлежит ни к одному известному роду, хотя он сгруппирован с фагами Suso и HXX\_Dennis. Ближайшие к этой группе фаги отличались от выявленных с использованием ViPTree и относились к родам *Beetrevirus*, *Rosemountvirus* и другим. На основании этих данных мы предполагаем, что фаг StM171 с фагами Suso и HXX\_Dennis формирует новый вид *Nordvirus* (рис. 6Б).

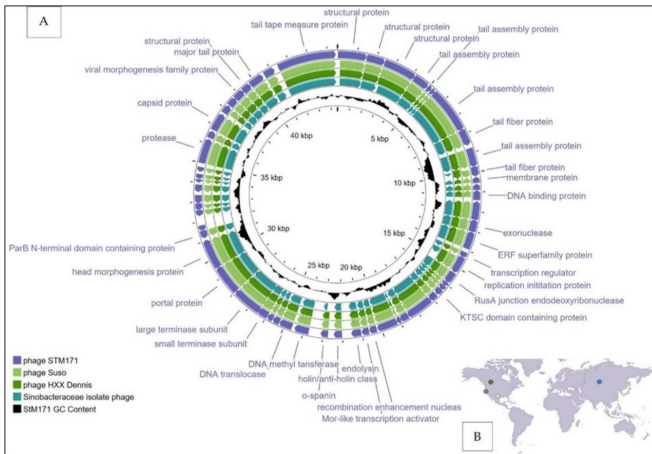


Рисунок 7. Геном фага StM171 в сравнении с геномами фагов с наибольшей нуклеотидной идентичностью - *Stenotrophomonas* Suso (MZ326866), *Xanthomonas* HXX\_Dennis (ON711490), а также геномом из образца метаногенных сточных вод (SSEB01000020.1); (A) диаграмма, построенная с использованием Proksee server. (B) Карта, составленная с использованием Saifu, на которой изображены места выделения вышеуказанных фагов: Новосибирск, Россия (StM171); Остин, США (Suso); Эдмонтон, Канада (HXX\_Dennis); Калифорния, США (сточные воды) (Jdeed et al., 2023).

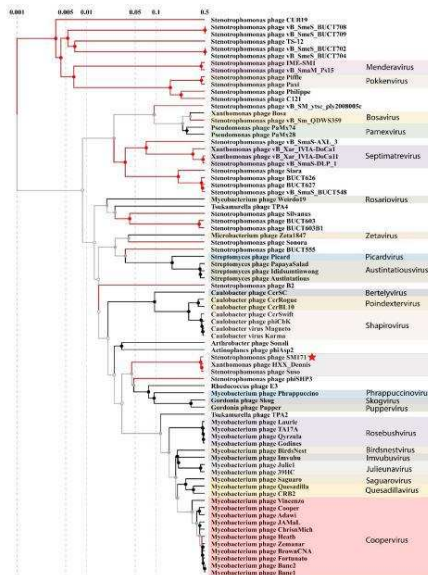


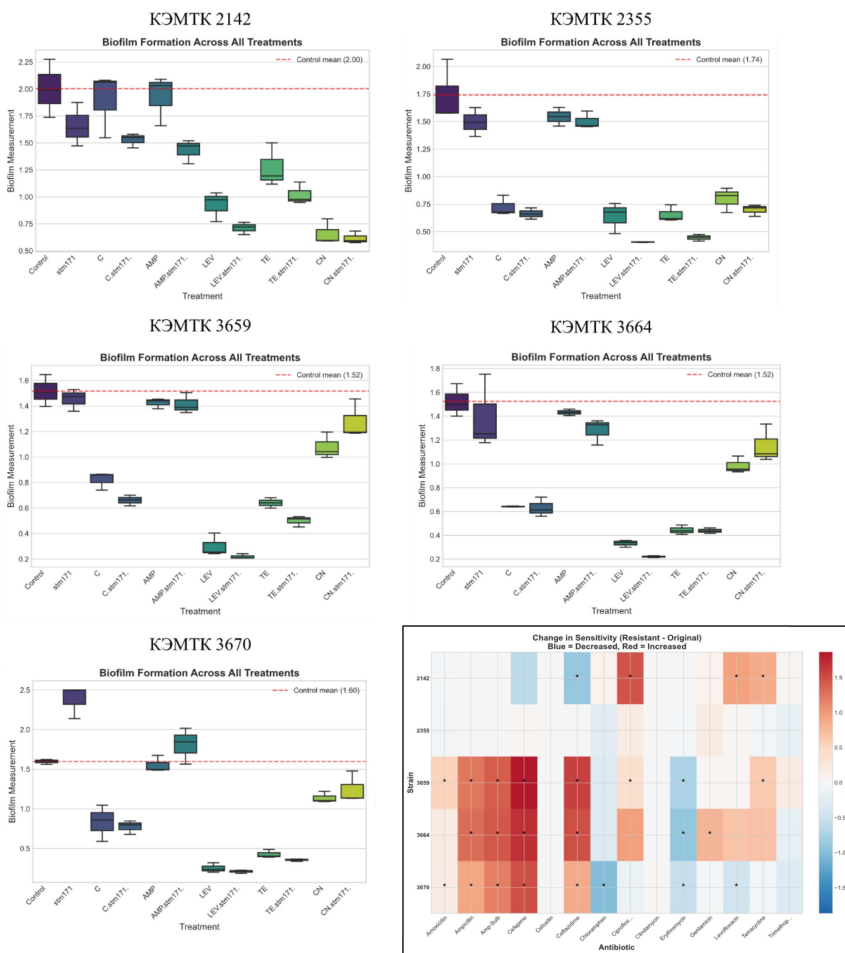
Рисунок 8. Филогенетический протеомный анализ фага StM171, выполненный с помощью сервера ViPTree. Красные ветви обозначают последовательности фагов, загруженные из базы данных NCBI GenBank и добавленные в анализ вручную. Изученный фог StM171 отмечен красной звездочкой (Jdeed et al., 2023).

## 2. Влияние фага StM171 на действие антибиотиков на штаммы *S. maltophilia*

Известно, что фаги могут усиливать или ослаблять действие антибиотиков. Мы исследовали это на примере фага StM171. Этот фаг инфицирует пять штаммов *S. maltophilia*. В зависимости от места выделения, штаммы были разделены на две группы: группа А, 2 штамма (КЭМТК 2142 и 2355), выделенных из сточных вод и от человека, и группа В, три штамма (КЭМТК 3659, 3664 и 3670), выделенных от насекомых. Все эти штаммы были способны образовывать биопленки. Мы протестировали способность разных антибиотиков по отдельности и в сочетании с фагом StM171 ингибировать образование биопленок. Оказалось, что добавленный отдельно фаг StM171 показал штаммовзависимый эффект: он ингибировал образование биопленок только у *S. maltophilia* КЕМТС 2142, снижая его на 17% ( $p < 0,05$ ). Напротив, у штамма *S. maltophilia* КЕМТС 3670 фаг способствовал образованию биопленки на 49% ( $p < 0,05$ ). Статистически значимого влияния на три других штамма (КЕМТС 2355, 3659 и 3664) фаг не оказал. Антибиотики, такие как хлорамфеникол, левофлоксацин, тетрациклин и гентамицин, значительно ( $p < 0,05$ ) ингибировали образование биопленок всеми штаммами на 50-80% (рис. 9А).

При сочетании антибиотиков с фагом StM171 эффект был штаммовзависимым и разнонаправленным. Хотя влияние фага на профиль антибиотикорезистентности было статистически значимым только для штаммов группы А, наблюдались специфические синергические взаимодействия лишь с отдельными антибиотиками: фаг StM171 значительно усиливал ингибирующее действие тетрациклина на штамм КЕМТС 2355 ( $p=0,023$ ) и левофлоксацина на штамм КЕМТС 3664 ( $p=0,035$ ). Наилучшие общие результаты были достигнуты при различных комбинациях: левофлоксацин + фаг снижали образование биопленки на 76-86% у четырех из пяти штаммов. С другой стороны, для штаммов группы В наблюдалась тенденция к ослаблению действия гентамицина фагом StM171, хотя эта тенденция не была статистически значимой.

Кроме того, фагорезистентные мутанты (ВІМ), возникшие после заражения фагами, были протестированы на предмет изменений в чувствительности к антибиотикам по сравнению с их фагочувствительными предшественниками. Результаты показали, что фагорезистентные штаммы из группы В стали значительно более чувствительными к бета-лактамам антибиотикам, со средним увеличением зон ингибирования до ~1,3-1,9 см для пенициллинов и цефалоспоринов ( $p < 0,05$ ). Одновременно эти штаммы приобрели устойчивость к эритромицину, при этом зоны ингибирования уменьшились до 0,93 см ( $p < 0,05$ ). Штамм *S. maltophilia* КЭМТК 2142 показал другие изменения, включая рост устойчивости к цефтазидиму, и повышенную чувствительность к фторхинолонам и тетрациклину (рис. 9Б).



A

B

Рисунок 9. (А) Профилактический эффект использования фага StM171 в сочетании с различными антибиотиками для предотвращения образования биопленок пятью различными штаммами *S. maltophilia* (Jdeed et al., 2024). (Б) Тепловая карта, отображающая изменения чувствительности к 14 антибиотикам, протестированным на фагоустойчивых штаммах.

### 3. Адаптация фагов EC151, EC152, StM171 и StenM174 к бактериальным хозяевам

Адаптация фагов к хозяйским штаммам может изменять их свойства. Этот процесс исследовался как способ улучшения фагов и сохранения их инфекционности после появления устойчивых к фагам бактериальных клонов. Для этого было изучено влияние эволюционно наивного бактериального хозяина и конкурирующего фага на адаптацию: 1) слаболитических *Enterobacter* фагов EC152 и EC151, способных заражать штамм *E. cloacae* КЭМТК 2064, а также 2) слаболитического фага StM171 и высоколитического фага StenM174 из коллекции ЛММБ ИХБФМ СО РАН. Фаг, StenM174 способен инфицировать штамм *S. maltophilia* КЭМТК 2355, как и фаг StM171.

Эксперименты по адаптации фагов проводили в ходе 10 пассажей при четырех разных сценариях: В сценарии (А) фаг просто пересевался вместе с бактериальным хозяином. В сценарии (В) в систему ежедневно добавлялся эволюционно наивный хозяин. В сценарии (С) в системе вместе с изученным фагом присутствовал конкурирующий за хозяина фаг. В сценарии (D) в систему добавляли и эволюционно наивного хозяина, и конкурирующего фага.

Фаги анализировали после 5-го и 10-го пассажей. Для оценки их эффективности против биологически переменчивых бактериальных популяций, подобных тем, которые встречаются во время фаготерапии, мы использовали эволюционировавшие бактериальные клоны после 5-го и 10-го пассажей, которые заражали изучаемым фагом, конкурирующим фагом или смесью обоих фагов (сценарии А и С). Эффективность адаптации тестировали методом qPCR для каждого фага против всех полученных бактериальных популяций с использованием двух разных контролей: один для определения приблизительного титра фага, а другой для определения увеличения числа фагов после бактериальной инфекции. Воспроизводимость данных qPCR подтверждали путем анализа одних и тех же образцов фагов (контроль #2) в 4 повторах. За исключением фага StM171, эффективность реакции составляла от 95% до 105%, а максимальное стандартное отклонение и вариация значений Cq для одних и тех же образцов в разных тестах считались приемлемыми ( $\leq 0,3$ ) (таблица 1). Роста сигнала при амплификации в отрицательных контролях (отсутствие матричной ДНК) не наблюдалось.

Таблица 1. Воспроизводимость данных qPCR и эффективность реакции для различных фагов в нескольких повторах

Образец	Максимальное стандартное отклонение	Стандартное отклонение между прогонами Cq	Slope	диапазон эффективности реакций (%)
EC152	0.19	$\pm 0.15$ цикла	-3.31	98.6 - 103
StenM174	0.24	$\pm 0.10$ цикла	-3.15	106.7 - 108
StM171	0.3	$\pm 0.62$ цикла	-2.92	104.6 - 134
EC151	0.1	$\pm 0.12$ цикла	-3.25	103 - 106

Для оценки успешности адаптации фагов в различных сценариях коэволюции мы оценили два ключевых показателя: (1) способность эволюционировавших популяций фагов инфицировать панель бактериальных клонов (адаптированных к самому фагу, к конкурирующему фагу или к коктейлю из обоих) и (2) повысил ли какой-либо сценарий адаптации эффективность инфицирования по сравнению с исходным фагом.

Для фага EC151 (рис. 10) все адаптированные популяции после десяти пассажей успешно инфицировали всю панель бактериальных клонов в одном биологическом повторе, при этом в сценарии С (адаптация с конкурирующим фагом EC152) также увеличилась инфекционность фага EC151 на 1-2 порядка. Во втором повторе в сценарии С также появились эффективные фаги, способные инфицировать пять из семи бактериальных клонов с увеличением инфекционности примерно на 1-2 порядка. Сценарий В (адаптация с наивным хозяином) оказался следующим по успешности, в результате чего были получены фаги, способные инфицировать все бактериальные

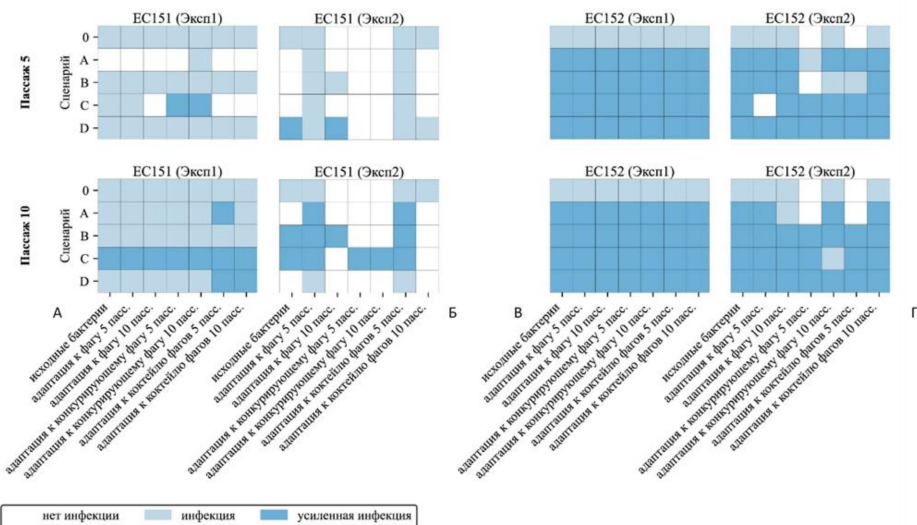


Рисунок 10. Тепловые карты фенотипов инфекционности для адаптированных фагов EC151 (А, Б) и EC152 (В, Г).

клоны в первом повторе и четыре из семи во втором, хотя повышенная инфекционность наблюдалась только во втором повторе (на 1-2 порядка) (рис. 10 А, Б).

Фаг EC152 продемонстрировал наиболее выраженную генерализацию среди всех четырех изученных фагов. После десяти пассажей популяции EC152, адаптированные в сценарии А (без наивного хозяина или конкурирующего фага), инфицировали большинство бактериальных клонов в обоих повторах. Примечательно также, что популяции фагов из сценариев В, С и D (с участием наивного хозяина, конкурирующего фага или обоих) последовательно инфицировали все эволюционировавшие бактериальные клоны в обоих повторах, одновременно увеличив инфекционность более чем на три порядка по сравнению с исходным фагом (рис. 4 В, Г).

Среди четырех фагов StM171 показал наихудшие результаты адаптации, часто полностью теряя способность инфицировать бактериальные клоны. Это было особенно очевидно в сценариях, включающих конкуренцию с фагом StenM174 (С и D), где инфекционность фага StM171 полностью утрачивалась для всех бактериальных клонов. Единственными исключениями были случаи, когда StM171 адаптировался самостоятельно (сценарий А) или с наивным хозяином (сценарий В) в течение десяти пассажей. В одном из двух биологических повторов эти условия привели к образованию популяций фагов, способных инфицировать большинство бактериальных клонов, включая те, которые адаптировались к фагам StM171 или StenM174 по отдельности, с повышением инфекционности на порядок. Однако даже эти успешные популяции не смогли инфицировать ни одну бактерию, адаптированную к смеси обоих этих фагов (рис. 11 А, Б).

Фаг StenM174 адаптировался к эволюционирующему хозяину лучше, чем StM171, хотя бактериальная фагорезистентность все же была отмечена в обоих

повторах. Более длительная адаптация (десять пассажей) с наивным хозяином (сценарий В) неизменно привела к образованию популяций фагов, способных инфицировать все бактериальные клоны, включая те, которые адаптировались к смеси фагов StM171 и StenM174. Фаг StM171 способствовал адаптации к StenM174 двумя способами. Во-первых, в одном из повторов наблюдалась перекрестная сенсibilизация: бактерии, адаптированные только к StM171 в течение пяти или десяти пассажей, стали восприимчивыми к StenM174. Во-вторых, в другом повторе адаптация StenM174 в коктейле с StM171 — как с наивным хозяином, так и без него (сценарии С и D) — привела к образованию популяций фагов, способных инфицировать все бактериальные клоны. Что касается повышенной инфекционности, только сценарий В (первый повтор) и сценарий D (второй повтор) привели к образованию популяций StenM174 с повышенной эффективностью инфицирования всей бактериальной панели примерно в пять раз и на два порядка соответственно (рис. 11 В, Г).

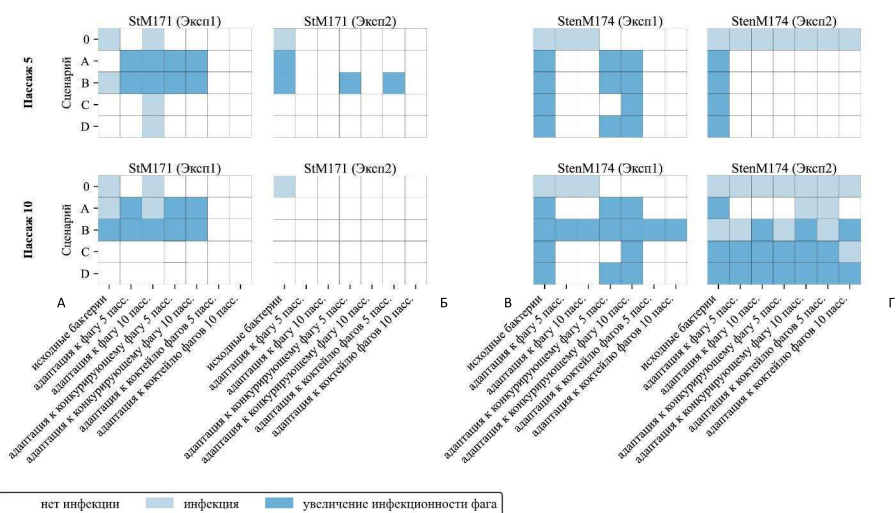


Рисунок 11. Тепловые карты фенотипов инфекции для адаптированных фагов StM171 (А, Б) и StenM174 (Б, Г).

#### 4. Анализ генов устойчивости к антибиотикам у новосибирских штаммов, и систем защиты от фагов у пангенома *S. maltophilia*

Чтобы понять фундаментальные барьеры, которые делают штаммы *S. maltophilia* высоко устойчивыми к антибиотикам, а также механизмы, которые ограничивают эффективность фаговой инфекции и адаптации к эволюционирующим бактериям, мы провели детальное изучение генов устойчивости к антибиотикам и систем защиты от фагов у одного из наших целевых видов, комплекса *S. maltophilia*.

Вначале мы секвенировали полные геномы пяти новосибирских штаммов *S. maltophilia*, чувствительных к фагам StM171 и StenM174, и проанализировали гены, ответственные за устойчивость к антибиотикам. Анализ выявил существование множества генов устойчивости к антибиотикам, общих для групп А и В, за исключением

гена устойчивости к аминогликозидам *aac(6')-Iz*, который был обнаружен только в группе А. В то время как опероны устойчивости к антибиотикам группы А отличались друг от друга и от оперонов группы В на уровне аминокислот, опероны группы В были идентичны (на рис. 12 высокий уровень идентичности показан линией, соединяющей опероны разных штаммов).

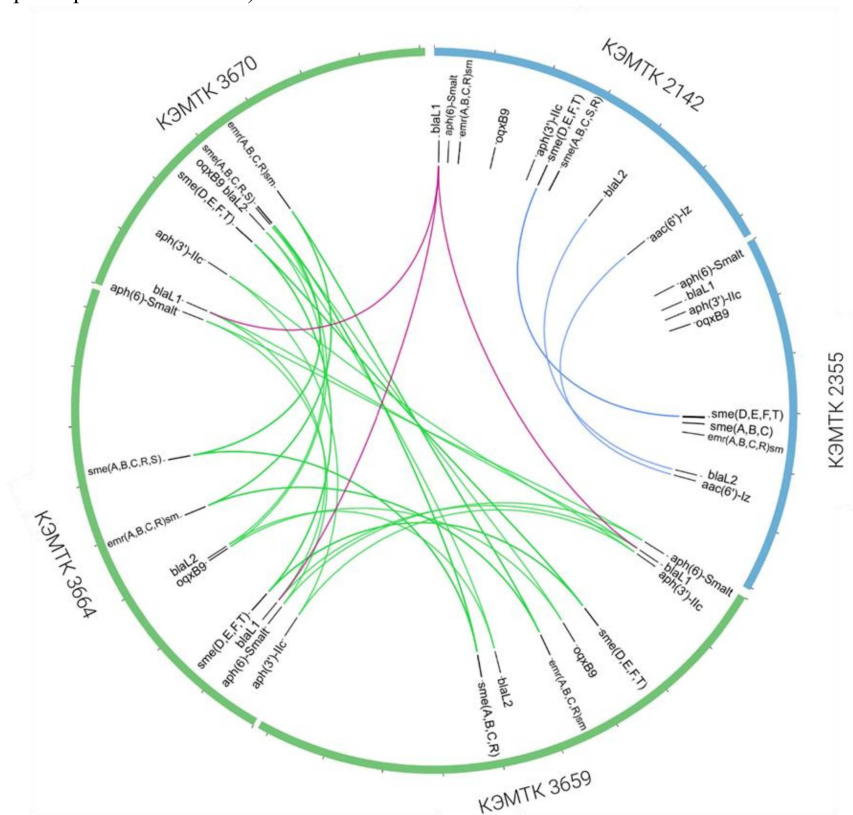


Рисунок 12. Диаграмма, показывающая гены, ответственные за устойчивость к антибиотикам, обнаруженные в геномах бактерий-хозяев StM171, со сходством более 80% с референсными генами из разных баз данных. Связи между генами соответствуют 100-процентной идентичности. *Jdeed et al. 2023*

В целом, геномы 5 новосибирских штаммов показали высокий уровень гомогенности, они имели 64% общих генов (рис. 13). Однако известно, что геномы комплекса *S. maltophilia* обладают высокой гетерогенностью. Пангеномный анализ, включавший все доступные полные корректные геномы из GenBank (n=67) плюс пять новосибирских штаммов, подтвердил это. Только 4% генов были общими для всех проанализированных штаммов; эти гены классифицируются как *кóровые* гены. Гены, общие не более чем для десяти штаммов (*cloud*-гены), составили большинство генов ~86% (рис. 13).

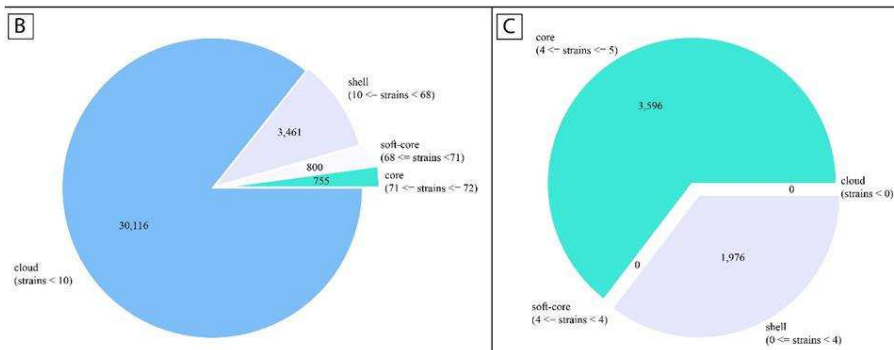
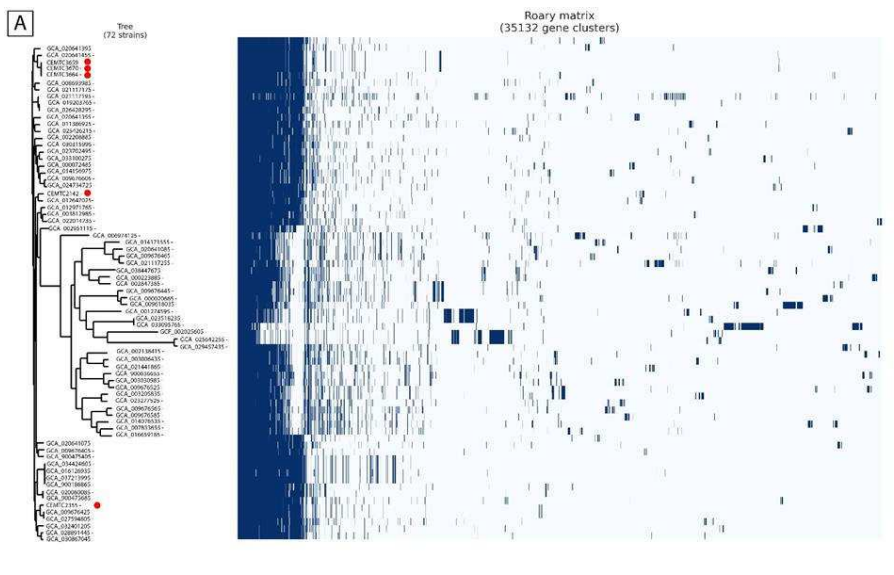


Рисунок 13. Пангеномный анализ штаммов *S. maltophilia*. (A) Матрица общих генов между 72 изученными штаммами; локальные штаммы отмечены красными кружками. (B) Распределение основных и дополнительных генов в 72 штаммах *S. maltophilia*. (C) Распределение основных и дополнительных генов в пяти штаммах *S. maltophilia* из Новосибирска (*Jdeed et al., 2024*).

Затем у всех этих штаммов мы проанализировали системы защиты от фагов. Мы выявили 500 случаев антифаговых систем защиты, представляющих 72 различных типа систем (рис. 14). Эти системы можно сгруппировать по их функциям: системы обнаружения фаговых белков (Avast, DSR, Gabija и Thoeris), системы abortивной инфекции (AbiE, AbiD, AbiO, Lamassu-Fam, Dazbog и Retron), системы рестрикции-модификации (RM), системы, подобные RM (BREX и SspBCDE), системы токсин-антитоксин (DarTG, PD-Lambda, PD-T7, SanaTA, ShosTA, RosmerTA и Rst-PARIS), системы CRISPR-Cas, системы, основанные на независимом от последовательности обнаружении нуклеиновых кислот (CBASS, Pycsar, recBCD и Wadjet) и другие системы с неизвестными механизмами антифаговой защиты (рис. 14).

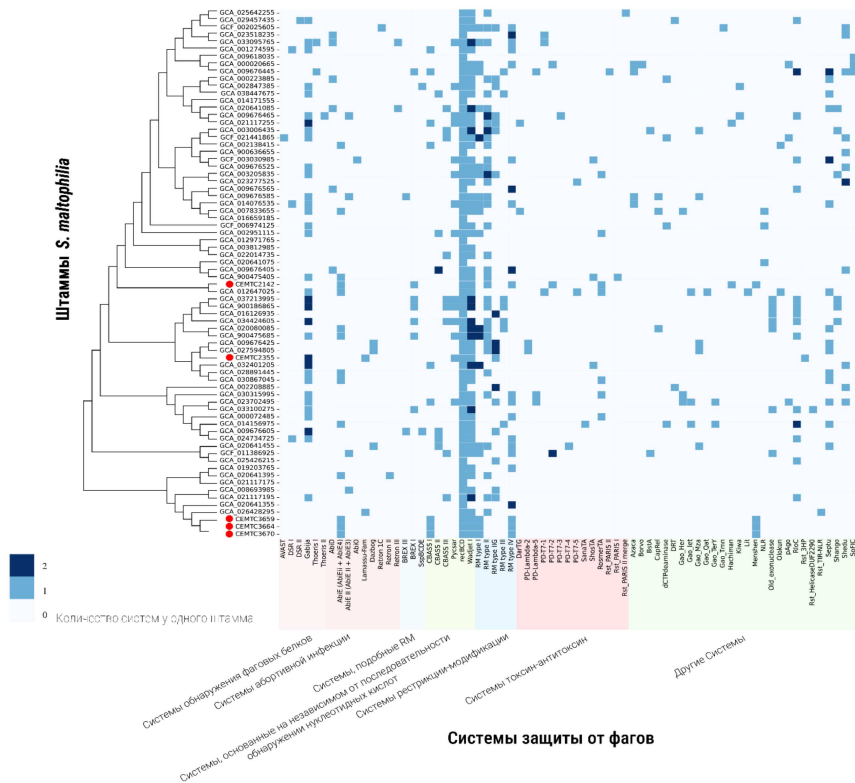


Рисунок 14. Системы защиты, обнаруженные в штаммах *S. maltophilia*. Локальные геномы отмечены красными кружками (Jeed et al., 2024).

Системы антифаговой защиты различались по частоте встречаемости. Так, несмотря на высокую гетерогенность комплекса *S. maltophilia* complex, система RecBCD присутствовала во всех изученных штаммах, а система Wadjet — в 80% штаммов, что значительно выше, чем ее распространенность в других бактериях, где она была найдена примерно в 6% штаммов (Deep et al., 2022). Другие системы защиты от фагов, обнаруженные в 20% – 50% изученных штаммов, включали системы RM разных типов, систему прерывания инфекции ABIE 4, а также системы Gabija и Septu которые распознают источник нуклеозидтрифосфатов после заражения фагом и активируют различные механизмы для остановки репликации фага (рис. 14).

Системы, которые высоко консервативны среди разных штаммов, являются приоритетом для отбора терапевтических фагов с контрмеханизмами. Была рассчитана степень сходства этих систем между исследованными штаммами на уровне аминокислотных остатков. Выяснилось, что большинство из них были очень гетерогенны между разными штаммами. На рис. 15 более яркими цветами обозначены высококонсервативные белки. Среди наиболее распространенных систем

высококонсервативными оказались белки RecBCD и AbiE 4, а также белки, кодируемые генами *jetA*, *jetB* и *jetC* системы Wadjet I. Напротив, другие распространенные системы, а именно система Gabija и все типы RM-систем, были вариабельны (рис. 15).

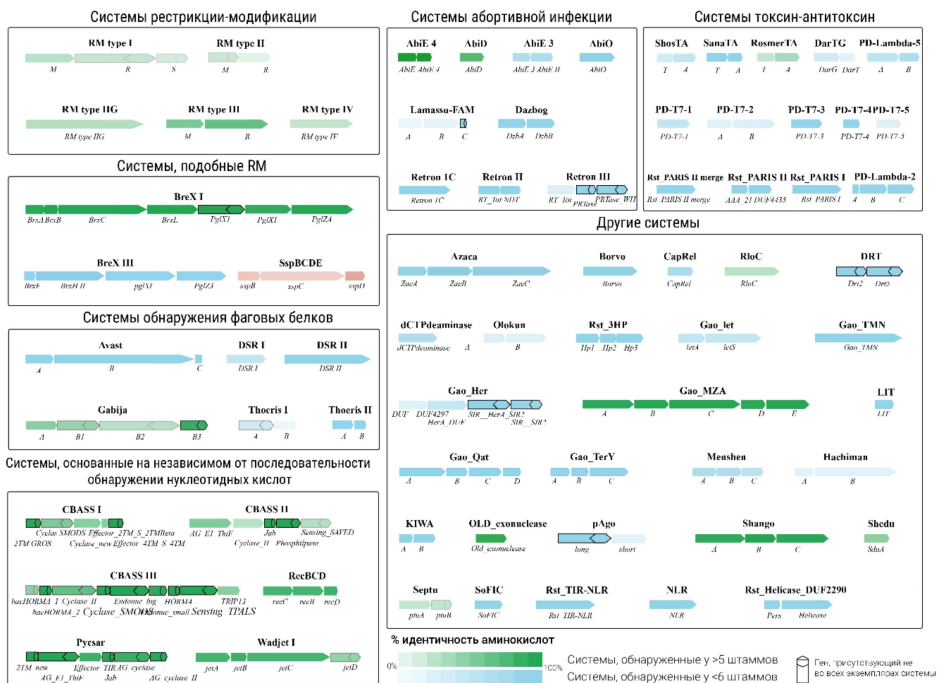


Рисунок 15. Классификация и консерватизм антифаговых систем защиты, обнаруженных у *S. maltophilia* (Jeed et al., 2024).

Обычно системы антифаговой защиты сгруппированы в определенных участках бактериального генома, называемых островками антифаговой защиты. Ранее островок антифаговой защиты был определен как локус генома, который содержит определенную систему защиты от фагов по крайней мере в двух штаммах, и фланкирован пятью коровыми генами на 5'- и 3'-концах. Эти коровые гены должны располагаться в том же порядке в штаммах, в которых выявлена определенная антифаговая система, и в референсном штамме *S. maltophilia* NCTC10258 (Johnson et al., 2023).

Изучение островков антифаговой защиты важно, поскольку позволяет открывать новые антифаговые системы. В проанализированных геномах *S. maltophilia* complex было идентифицировано 27 защитных островков, которые на рис. 16 наложены на референсный штамм. Частота присутствия антифаговых систем защиты варьировалась среди разных защитных островков. Четыре защитных островка с наибольшим количеством систем защиты были (№ 27, № 4, № 13, № 16) и содержали около 60% всех случаев защитных систем. Защитный островок № 27 был единственным защитным островком, содержащим гены для защиты от фаговой инфекции во всех изученных штаммах. Этот островок содержал гены оперона RecBCD и неполный вариант системы

Wadjet I. В островке № 4 было обнаружено 13% систем защиты от фагов *S. maltophilia*, включая большинство случаев RM типа II и другие (рис. 16).

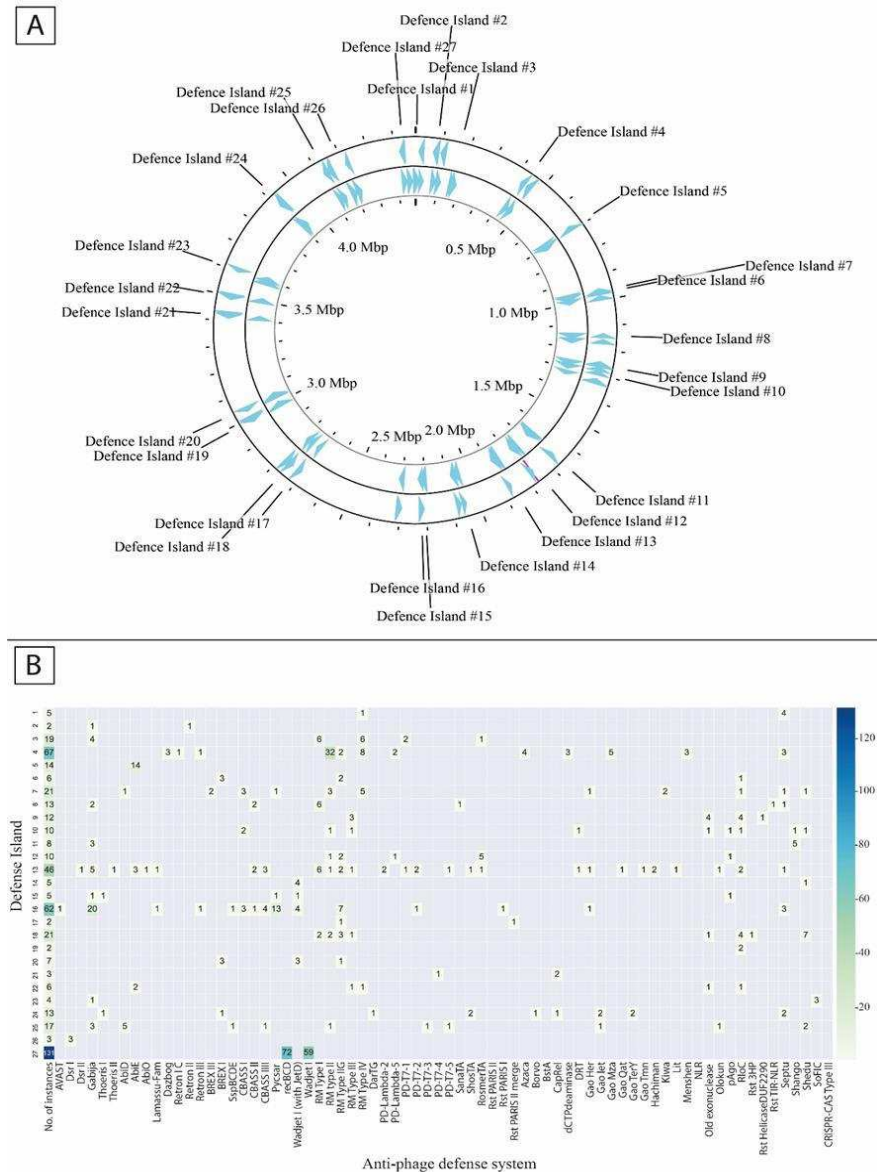


Рисунок 16. Островки антифаговых систем защиты у *S. maltophilia*. (A) Защитные островки, сопоставленные с эталонным штаммом *S. maltophilia* NCTC10258. (B) Распределение антифаговых систем в защитных островках; числа на диаграмме соответствуют случаям встречи каждой отдельной системы в данном защитном островке. (Jdeed et al., 2024).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были охарактеризованы четыре бактериофага, инфицирующих клинически значимые виды бактерий, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas popoffii* и *Stenotrophomonas maltophilia*. Три из них (EC151, StM171 и AerP\_220) представляют собой новые таксономические единицы (род, подсемейство). Геномный анализ выявил у фагов EC151 и EC152 уникальные стратегии контрзащиты от бактериального иммунитета: EC151 кодирует полный путь синтеза преQ0, модифицирующий гуанин в ДНК и делающий ее устойчивой к гидролизу рестриктазами, а EC152 - путь восстановления NAD<sup>+</sup>, позволяющий фагу не зависеть от метаболизма хозяина и обходить антифаговые защитные системы, реагирующие на истощение NAD<sup>+</sup> в клетке. На момент начала работы такие механизмы у фагов, инфицирующих энтеробактерии и *S. maltophilia*, системно не изучались, а их наличие у слаболитических фагов открывает перспективы для геной инженерии высоколитических терапевтических кандидатов. Из всех изученных фагов только AerP\_220 продемонстрировал прямую терапевтическую пригодность благодаря высокой литической активности и отсутствию генов вирулентности, тогда как остальные обладали слабой литической способностью.

Слаболитический фаг StM171 был исследован на предмет возможности его использования в комбинации с антибиотиками. Показано, что развитие резистентности к StM171 у штаммов *S. maltophilia* из окружающей среды ведет к восстановлению чувствительности к пяти бета-лактамам антибиотикам, предположительно за счет плейотропных мутаций, нарушающих работу эффлюксных насосов или проницаемость мембраны. Для клинических штаммов этот эффект не наблюдался, что указывает на их адаптацию к антибиотикам, даже после изменения фагочувствительности. В экспериментах по ингибированию биопленок синергизм фага и антибиотиков (гентамицина, тетрациклина, левофлоксацина) также оказался строго штаммоспецифичным и в ряде случаев даже антагонистичным. Эти результаты демонстрируют, что даже слаболитические фаги могут найти клиническое применение в качестве агентов, сенсibiliзирующих бактерии к антибиотикам, но требуют обязательного предварительного тестирования на конкретном штамме пациента.

Эксперименты по адаптивной эволюции фагов ставили целью преодолеть их слабую литическую активность и сохранить их способность заражать бактериальные клоны, которые, в свою очередь, адаптируются к фагам. Систематически сравнивали четыре сценария адаптации (в присутствии/отсутствии наивного хозяина и/или конкурирующего фага). Выявлены кардинальные различия в эволюционных траекториях четырех исследуемых фагов: EC151 и EC152, обладающие системами контрзащиты, демонстрировали непрерывное улучшение инфекционности по типу «гонки вооружений». Для фагов StM171 и StenM174 динамика носила флуктуирующий характер и успех адаптации зависел от присутствия наивного хозяина. Создание панели бактериальных клонов, адаптированных к эволюционному давлению разных фагов, является удобным инструментом для скрининга и отбора универсальных фаговых популяций, способных преодолевать различные механизмы резистентности, возникающие в ходе терапии.

Наконец, в работе впервые проведен масштабный биоинформатический анализ систем защиты от фагов у 72 штаммов *S. maltophilia*. Обнаружено, что каждый штамм несет в среднем пять антифаговых систем, при этом 60% из 500 выявленных систем сконцентрированы всего в четырех геномных островках защиты. Встречаемость

защитных систем в этих островках, по-видимому, является консервативной даже у штаммов из отдаленных географических регионов. Обнаруженная кластеризация защитных систем в консервативных локусах показывает мишень для рационального конструирования фагов: внедрение контрмер против антифаговых систем (например, RecBCD, AbeI, BREX I), доминирующих в этих островках, может способствовать созданию фаговых коктейлей с предсказуемо высокой эффективностью против широкого круга штаммов, несмотря на гетерогенность комплекса *S. maltophilia*.

## ВЫВОДЫ

1. Исследование характеристик фагов *Enterobacter cloacae* EC151 и EC152, *Aeromonas popoffii* AerP\_220 и *Stenotrophomonas maltophilia* StM171 показало, что:
  - фаги EC151 и StM171 имеют сифовирусную морфологию, фаг EC152 является миовирусом, а фаг AerP\_220 – подовирусом;
  - фаг AerP\_220 был единственным фагом, который обладал высокой литической активностью;
  - все фаги обладали узким спектром хозяйской специфичности.
2. Фаг StM171 подавлял образование биопленок у трех штаммов *S. maltophilia* и усиливал у одного штамма; фаг способствовал восстановлению чувствительности к бета-лактамам и увеличению резистентности к эритромицину у новосибирских штаммов группы В.
3. Анализ полногеномных последовательностей фагов EC151, EC152, AerP\_220 и StM171 показал, что:
  - геном фага EC151 содержит 58 ORF, включая полный кластер генов модификации 7-деазагуанина, что вероятно защищает его от бактериальных эндонуклеаз; фаг EC151 является представителем нового рода;
  - геном фага EC152 содержит 286 ORF и кодирует полный путь восстановления NAD<sup>+</sup>, а также метилтрансферазу и RII локус, которые вероятно защищают его от бактериальных антифаговых систем; фаг EC152 входит в род *Seunavirus*;
  - геном фага AerP\_220 включает 59 ORF; фаг является представителем нового рода *Yinyavirus* и нового подсемейства *Tolavirinae*;
  - геном фага StM171 включает 59 ORF и не содержит генов ДНК- и РНК-полимераз; фаг StM171 является представителем нового вида *Nordvirus*.
4. Изучение коэволюции фагов EC151, EC152, StM171 и StenM174 с их хозяевами показало, что для фагов *E. cloacae* присутствие эволюционно наивных хозяев и/или конкурирующего фага обеспечило специфичность ко всем адаптационным вариантам бактерий и увеличение инфекционности, тогда как для фагов *S. maltophilia* присутствие только наивного хозяина было более эффективным.
5. Пангеномный анализ *S. maltophilia* выявил 72 системы антифаговой защиты, различающиеся по встречаемости, уровню изменчивости и способу действия; наиболее распространенными являлись системы Wadjet I и RecBCD. Всего обнаружено 27 островков защиты, четыре из которых (№4, №13, №16 и №27) содержали 60% всех случаев антифаговых систем.

### Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Vera Morozova; **Ghadeer Jdeed**; Yuliya Kozlova; Igor Babkin; Artem Tikunov; Nina Tikunova. A New Enterobacter cloacae Bacteriophage EC151 Encodes the Deazaguanine DNA Modification Pathway and Represents a New Genus within the Siphoviridae Family. **Viruses** – 2021; 13(7), 1372, 10.3390/v13071372 WoS
2. Vera Morozova; Yuliya Kozlova; **Ghadeer Jdeed**; Artem Tikunov; Tatyana Ushakova; Alevtina Bardasheva; Elena Zhirakovskaia; Yuliya Poletaeva; Elena Ryabchikova; Nina V. Tikunova. A Novel Aeromonas popoffii Phage AerP\_220 Proposed to Be a Member of a New Tolavirus Genus in the Autographiviridae Family. **Viruses** – 2022; 14(12), 2733, 10.3390/v14122733 WoS
3. **Ghadeer Jdeed**; Vera Morozova; Yuliya Kozlova; Artem Tikunov; Tatyana Ushakova; Alevtina Bardasheva; Andrey Manakhov; Maria Mitina; Elena Zhirakovskaya; Nina Tikunova. StM171, a Stenotrophomonas maltophilia Bacteriophage That Affects Sensitivity to Antibiotics in Host Bacteria and Their Biofilm Formation. **Viruses** – 2023; 15(12), 2455 10.3390/v15122455 WoS
4. **Ghadeer Jdeed**; Vera V. Morozova; Nina V. Tikunova. Genome Analysis of Anti-Phage Defense Systems and Defense Islands in Stenotrophomonas maltophilia: Preservation and Variability. **Viruses** – 2024; 16(12) 1903: 10.3390/v16121903 WoS
5. **Ghadeer Jdeed**; Bogdana Kravchuk; Nina V. Tikunova. Factors Affecting Phage–Bacteria Coevolution Dynamics. **Viruses** – 2025; 17(2), 235 10.3390/v17020235 WoS