

Микобактериофаги – вирусы микобактерий

М.В.Фурсов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Микобактериофаги – бактериофаги, инфицирующие бактерии рода *Mycobacterium*, – вносят вклад в понимание вирусного разнообразия и эволюции. Более 10 000 микобактериофагов было выделено к настоящему времени, более 2000 геномов секвенировано и размещено в базах данных. Данный обзор посвящен актуальной теме использования микобактериофагов для лечения инфекций, вызванных микобактериями (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. chelonae* и др.), а также истории открытия, классификации и геномике микобактериофагов, их жизненному циклу и хозяйской специфичности.

Ключевые слова: микобактериофаги, *Mycobacterium spp.*, туберкулез

Для цитирования: Фурсов М.В. Микобактериофаги – вирусы микобактерий. Бактериология. 2023; 8(4): 76–79. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-76-79

Mycobacteriophages are viruses of mycobacteria

M.V.Fursov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Mycobacteriophages is bacteriophages infecting *Mycobacterium* cells, contributing to the understanding of viral diversity and evolution. More than 10 000 mycobacteriophages have been isolated to date, and more than 2000 genomes have been sequenced and submitted into different databases. This review is devoted to the current topic of using mycobacteriophages to treat infections caused by mycobacteria (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, etc.), as well as the history of discovery, classification and genomics of mycobacteriophages, their life cycle and host specificity.

Key words: mycobacteriophages, *Mycobacterium spp.*, tuberculosis

For citation: Fursov M.V. Mycobacteriophages are viruses of mycobacteria. Bacteriology. 2023; 8(4): 76–79. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-76-79

Бактериофаги – облигатные паразиты бактерий, которые были впервые описаны около ста лет назад и с тех пор их использование вносит значимый вклад в развитие молекулярной биологии, генетики и биотехнологии [1]. Преимущество использования бактериофагов в молекулярно-генетических исследованиях заключается в сравнительно небольшом размере их геномов, что позволило на их основе разрабатывать методы секвенирования ДНК еще до начала 1990-х гг. [2].

Бактериофаги широко распространены в окружающей среде, являясь частью самой распространенной в природе формы биологических объектов – вирусов (количество вирусных частиц в биосфере оценивается как 10^{31}) [3]. Предполагается, что фаговая популяция сформировалась более 3 млрд лет назад, а количество фаговых инфекций оценивается как 10^{23} событий в секунду, обновление мировой популяции происходит каждые несколько дней [4].

Для корреспонденции:

Фурсов Михаил Васильевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0000

Статья поступила 01.12.2023, принята к печати 25.12.2023

Генетически бактериофаги очень гетерогенны. Постоянно идет эволюционное «соревнование» между бактериями-хозяевами и фагами по созданию устойчивых к бактериофагам форм и преодолению этой устойчивости [5].

Бактериофаги могут вызывать два типа фаговой инфекции: литическую (вирулентную) и лизогенную (умеренную), причем из лизогенного состояния фаг может быть индуцирован с последующим развитием литической инфекции. Частота лизогении варьирует в зависимости от ряда параметров: видовой принадлежности хозяина, стадии роста бактериальной культуры, множественности инфекции и др. [6].

Микобактериофаги – это бактериофаги, которые инфицируют клетки микобактерий, среди которых выделяют патогенные для человека виды: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* комплекс (МАС) и *Mycobacterium abscessus* комплекс (МАВ), а также непатогенные виды,

For correspondence:

Mikhail V. Fursov, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000

The article was received 01.12.2023, accepted for publication 25.12.2023

такие как *Mycobacterium smegmatis* и др. [7]. Интерес к микобактериофагам объясняется тем, что они рассматриваются как кандидаты для разработки новых противотуберкулезных препаратов, которые могли бы внести вклад в решение проблемы терапии множественно-лекарственно устойчивого туберкулеза. К настоящему времени выделены и охарактеризованы более 10 тыс. штаммов микобактериофагов, размещенных в базе данных PhagesDB (<https://phagesdb.org/>, дата доступа 19.11.2023). Микобактериофаги широко используются для изучения генетики микобактерий, в т.ч. интегративных векторов, систем рекомбинации, а также систем эффективной доставки репортерных генов, транспозонов и субстратов аллельного обмена.

Данный обзор посвящен истории открытия микобактериофагов, их классификации, описанию фагового жизненного цикла, структуры геномов и использованию в молекулярной биологии, биотехнологии и медицине.

Открытие микобактериофагов

Первые микобактериофаги были выделены в 1954 г. из культуры *M. smegmatis* и в 1960–1970-х гг. использовались для фаготипирования микобактериальных инфекций. Некоторый из этих фагов сохранились до настоящего времени, а другие были утрачены [8]. Первый геном микобактериофага (L5) был секвенирован в Японии [9]. В дальнейшем были секвенированы геномы фагов D29, TM4 и Vxb1 [10]. В 2002 г. в США стартовала программа Phage Hunters Integrative Research and Education (PHIRE), в 2008 г. преобразованная в программу Science Education Alliance Phage

Hunters Advancing Genomics and Evolutionary Science (SEA-PHAGES), поддерживаемую Медицинским институтом Ховарда [11]. В рамках этих программ был создан большой архив данных о микобактериофагах (>10 000), выделенных на *M. smegmatis*, более 2000 из которых были секвенированы и геномы этих фагов аннотированы. Информация о данной коллекции фагов доступна на веб-ресурсе (<http://phagesdb.org>). На интерактивной карте ресурса представлены локации выделения микобактериофагов во всем мире (рисунок).

Классификация и геномика микобактериофагов

На основании схожести геномов (>50% генома) микобактериофаги сгруппированы в кластеры (А, В, С и т.д.) и подкластеры (например, А1, А2, А3). Фаги, для которых не найдены близкородственные, называются «одиночки» (singletons) [12]. По мере расширения коллекции секвенированных геномов микобактериофагов граница идентичности геномов между кластерами была снижена до 35% [13].

Ключевым параметром геномики микобактериофагов является их архитектурная мозаика. Каждый геном представляет собой композицию модулей, или мозаичных «плиток», которые могут быть собраны в огромное количество различных комбинаций [14]. Кроме того, средний размер генов микобактериофагов составляет около 600 п.н., что меньше такого показателя у бактерий (1000 п.н.), а гены собраны в более протяженные опероны (20–25 т.п.н.), чем у бактерий [15]. Большинство литических микобактериофагов относят к порядку *Caudovirales*, семейству *Siphoviridae* и кластеру К,



Рисунок. Карта локализации выделения микобактериофагов в GPS-координатах (<https://phagesdb.org/GPSmap/>, дата доступа 30 ноября 2023 г.). Буквами обозначены кластеры микобактериофагов.

Figure. Localization map of mycobacteriophage release in GPS coordinates (<https://phagesdb.org/GPSmap/>, accessed November 30, 2023). Letters indicate clusters of mycobacteriophages.

который подразделяется на 7 подкластеров [16]. Кластер К – один из известных кластеров, в котором все члены могут лизировать *M. tuberculosis*. Представители семейства Siphoviridae имеют длинный гибкий хвост и заостренный капсид, содержащий двухцепочечную ДНК [17]. В геномах около 2000 секвенированных микобактериофагов выявлено большое число генов с неизвестной функцией (>100 тыс.) [7], что указывает на наличие огромного резервуара неизвестных разнообразных функций генов.

Жизненный цикл микобактериофагов

Лизогенный цикл

Большинство выделенных к настоящему времени микобактериофагов относятся к умеренным фагам. Интересно, что литические и умеренные микобактериофаги могут относиться к одному и тому же кластеру, например, литический фаг D29 и умеренный фаг L5 относятся к одному и тому же подкластеру A2, их отличие состоит в наличии делеции гена-репрессора [18]. Умеренные фаги обычно содержат репрессор, который необходим для перехода в состояние лизогении, и интегразу, которая обеспечивает сайт-специфичную интеграцию в бактериальный геном и формирование профага. Некоторые микобактериофаги кластера А отличаются тем, что они формируют профаговые репликоны (плазмидные) за счет наличия системы *parAB* вместо интегразы [19]. У многих бактериофагов (кроме отмеченных выше из кластера А) ген-репрессор локализуется и транскрибируется среди ранних литических генов [20]. Формирование иммунности к суперинфекции у микобактериофагов отличается от канонической, описанной у бактериофага λ. Гены репрессора и интегразы котранскрибируются в опероне, и рекомбинация с *attP* сайтом происходит внутри самого гена-репрессора. Интеграция приводит к утрате 3' конца гена-репрессора, что приводит к продукции усеченного на С-конце белка-репрессора, который не подвергается протеолитической деградации и обеспечивает состояние иммунности к суперинфекции [21].

Литический цикл

Транскриптомный анализ показал, что многие микобактериофаги содержат два основных паттерна литических генов: ранние (~30 мин после инфекции) и поздние (~120 мин после инфекции) [22]. Промоторы ранних генов опознаются РНК-полимеразой клетки-хозяина по сайтам -35 и -10 [23]. Поздние гены считываются выше или начиная с последовательности *cos*-сайта, но процесс этот еще недостаточно изучен.

Хозяйская специфичность

В настоящее время хозяйская специфичность микобактериофагов изучена недостаточно. Важные сведения были получены при изучении спектров чувствительности к микобактериофагам клинических штаммов *M. tuberculosis* и *M. abscessus*, а также *M. smegmatis* [24, 25]. Была обнаружена корреляция между способностью фагов инфицировать два штамма – *M. smegmatis* mc²155 и *M. tuberculosis* H37Rv – и принадлежностью к определенному кластеру/подкластеру [26]. Фаги, изолированные на штамме *M. smegmatis* mc²155, за некоторыми исключениями, эффективно заражали *M. tuberculosis* H37Rv и другие штаммы туберкулезного ми-

кроба [25]. Специфичность микобактериофагов определяется множеством факторов, которые можно подразделить на действующие на поверхности клетки (например, рецепторы) и действующие после проникновения ДНК фага в клетку-хозяина (например, рестрикция). Известно, что многие штаммы вирулентных микобактерий не содержат CRISPR-систем, что исключает влияние таких систем на ограничение спектра активности микобактериофагов [27].

Терапевтическое использование микобактериофагов

Первое сообщение о применении микобактериофага в качестве терапевтического препарата было опубликовано в журнале Nature в 2019 г.: лечение детского муковисцидоза, вызванного диссеминированной инфекцией *M. abscessus*, с последующей двусторонней трансплантацией легких и иммуносупрессивной терапией. Примерно через 6 нед. лечения микобактериофагом наблюдалось значительное улучшение: уменьшение размеров узелков в печени и на коже, а также закрытие хирургической раны [28].

Позже были опубликованы результаты лечения еще 20 случаев инфекции, вызванных высокорезистентными штаммами *M. abscessus*. Как минимум в 11 случаях были отмечены благоприятные клинические или микробиологические результаты фаговой терапии, в 5 случаях – неполное излечение и в 4 случаях – незначительные изменения эффекта терапии [29].

Еще один случай успешной микобактериофаговой терапии описан при лечении в течение года инфекции *M. abscessus* у пациента с муковисцидозом в 2022 г. У пациента была достигнута эрадикация патогена, он был повторно включен в список для двусторонней трансплантации легких [30].

В этом же году был опубликован случай успешной фаговой терапии при внутривенном введении микобактериофага на фоне антибиотикотерапии пациенту с высокорезистентной кожной инфекцией *Mycobacterium chelonae* [31].

Сообщений об успешном применении микобактериофагов в качестве терапевтических препаратов пока не опубликовано. Трудности данного типа терапии заключаются в том, что клетки *M. tuberculosis* способны выживать внутри фагосом макрофагов, возможность доставки микобактериофагов в которые остается дискуссионной. На данный момент предложено два способа доставки фагов внутрь макрофагов: использование липосомированных препаратов микобактериофагов и авирулентных микобактерий для реализации стратегии «Троянский конь» [32, 33].

Глобальное распространение во всем мире штаммов *M. tuberculosis*, обладающих широкой лекарственной устойчивостью, и рост заболеваемости туберкулезом, вызванным подобными штаммами, указывает на необходимость поиска новых терапевтических препаратов, в т.ч. микобактериофагов или их компонентов, в комбинации с уже известными противотуберкулезными препаратами.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

The work was carried out within the framework of the industry program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

- Elois MA, Silva RD, Pilati GVT, Rodríguez-Lázaro D, Fongaro G. Bacteriophages as Biotechnological Tools. *Viruses*. 2023 Jan 26;15(2):349. DOI: 10.3390/v15020349
- Klumpp J, Fouts DE, Sozhamannan S. Next generation sequencing technologies and the changing landscape of phage genomics. *Bacteriophage*. 2012 Jul 1;2(3):190-199. DOI: 10.4161/bact.22111
- Mushegian AR. Are There 1031 Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? *J Bacteriol*. 2020 Apr 9;202(9):e00052-20. DOI: 10.1128/JB.00052-20
- Hendrix RW. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol*. 2002 Jun;61(4):471-80. DOI: 10.1006/tpbi.2002.1590
- Bernheim A, Sorek R. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nat Rev Microbiol*. 2020 Feb;18(2):113-119. DOI: 10.1038/s41579-019-0278-2
- Gummalla VS, Zhang Y, Liao YT, Wu VCH. The Role of Temperate Phages in Bacterial Pathogenicity. *Microorganisms*. 2023 Feb 21;11(3):541. DOI: 10.3390/microorganisms11030541
- Hatfull GF. Mycobacteriophages: From Petri dish to patient. *PLoS Pathog*. 2022 Jul 7;18(7):e1010602. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010602
- Engel HW. Mycobacteriophages and phage typing. *Ann Microbiol (Paris)*. 1978;129(1):75-90.
- Doke S. Studies on mycobacteriophages and lysogenic Mycobacteria. *J Kumamoto Med Soc*. 1960;34:1360-73.
- Mediavilla J, Jain S, Kriakov J, Ford ME, Duda RL, Jacobs WR Jr, et al. Genome organization and characterization of mycobacteriophage Bxb1. *Mol Microbiol*. 2000 Dec;38(5):955-70. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02183.x
- Hanauer DI, Graham MJ, Sea P, Betancur L, Bobrownicki A, Cresawn SG, et al. An inclusive Research Education Community (iREC): Impact of the SEA-PHAGES program on research outcomes and student learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Dec 19;114(51):13531-13536. DOI: 10.1073/pnas.1718188115
- Hatfull GF, Pedulla ML, Jacobs-Sera D, Cichon PM, Foley A, Ford ME, et al. Exploring the mycobacteriophage metaproteome: phage genomics as an educational platform. *PLoS Genet*. 2006 Jun;2(6):e92. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020092
- Pope WH, Mavrich TN, Garlena RA, Guerrero-Bustamante CA, Jacobs-Sera D, Montgomery MT, et al. Bacteriophages of *Gordonia* spp. Display a Spectrum of Diversity and Genetic Relationships. *mBio*. 2017 Aug 15;8(4):e01069-17. DOI: 10.1128/mBio.01069-17
- Pedulla ML, Ford ME, Houtz JM, Karthikeyan T, Wadsworth C, Lewis JA, et al. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell*. 2003 Apr 18;113(2):171-82. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00233-2
- Hatfull GF, Jacobs-Sera D, Lawrence JG, Pope WH, Russell DA, Ko CC, et al. Comparative genomic analysis of 60 Mycobacteriophage genomes: genome clustering, gene acquisition, and gene size. *J Mol Biol*. 2010 Mar 19;397(1):119-43. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.01.011
- Mayer O, Jain P, Weisbrod TR, Biro D, Ho L, Jacobs-Sera D, et al. Fluorescent Reporter DS6A Mycobacteriophages Reveal Unique Variations in Infectibility and Phage Production in Mycobacteria. *J Bacteriol*. 2016 Nov 4;198(23):3220-3232. DOI: 10.1128/JB.00592-16
- Guo S, Ao Z. Phage in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jun 1;17(7):2691-7. DOI: 10.2741/4080
- Dedrick RM, Mavrich TN, Ng WL, Hatfull GF. Expression and evolutionary patterns of mycobacteriophage D29 and its temperate close relatives. *BMC Microbiol*. 2017 Dec 2;17(1):225. DOI: 10.1186/s12866-017-1131-2
- Wetzel KS, Aull HG, Zack KM, Garlena RA, Hatfull GF. Protein-Mediated and RNA-Based Origins of Replication of Extrachromosomal Mycobacterial Prophages. *mBio*. 2020 Mar 24;11(2):e00385-20. DOI: 10.1128/mBio.00385-20
- Petrova ZO, Broussard GW, Hatfull GF. Mycobacteriophage-repressor-mediated immunity as a selectable genetic marker: Aephagia and BPs repressor selection. *Microbiology (Reading)*. 2015 Aug;161(8):1539-1551. DOI: 10.1099/mic.0.000120
- Little JW. Evolution of complex gene regulatory circuits by addition of refinements. *Curr Biol*. 2010 Sep 14;20(17):R724-34. DOI: 10.1016/j.cub.2010.06.028
- Dedrick RM, Guerrero Bustamante CA, Garlena RA, Pinches RS, Cornely K, Hatfull GF. Mycobacteriophage ZoeJ: A broad host-range close relative of mycobacteriophage TM4. *Tuberculosis (Edinb)*. 2019 Mar;115:14-23. DOI: 10.1016/j.tube.2019.01.002
- Broussard GW, Oldfield LM, Villanueva VM, Lunt BL, Shine EE, Hatfull GF. Integration-dependent bacteriophage immunity provides insights into the evolution of genetic switches. *Mol Cell*. 2013 Jan 24;49(2):237-48. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.11.012
- Dedrick RM, Smith BE, Garlena RA, Russell DA, Aull HG, Mahalingam V, et al. *Mycobacterium abscessus* Strain Morphotype Determines Phage Susceptibility, the Repertoire of Therapeutically Useful Phages, and Phage Resistance. *mBio*. 2021 Mar 30;12(2):e03431-20. DOI: 10.1128/mBio.03431-20
- Guerrero-Bustamante CA, Dedrick RM, Garlena RA, Russell DA, Hatfull GF. Toward a Phage Cocktail for Tuberculosis: Susceptibility and Tuberculocidal Action of Mycobacteriophages against Diverse *Mycobacterium tuberculosis* Strains. *mBio*. 2021 May 20;12(3):e00973-21. DOI: 10.1128/mBio.00973-21
- Jacobs-Sera D, Marinelli LJ, Bowman C, Broussard GW, Guerrero Bustamante C, Boyle MM, et al; Science Education Alliance Phage Hunters Advancing Genomics And Evolutionary Science Sea-Phages Program; Modlin RL, Hendrix RW, Hatfull GF. On the nature of mycobacteriophage diversity and host preference. *Virology*. 2012 Dec 20;434(2):187-201. DOI: 10.1016/j.virol.2012.09.026
- Shankar S, Tyagi AK. Purification and characterization of restriction endonuclease MgoI from *Mycobacterium goodii*. *Gene*. 1993 Sep 6;131(1):153-4. DOI: 10.1016/0378-1119(93)90686-w
- Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, Gilmour KC, Sothill J, Jacobs-Sera D, Schooley RT, Hatfull GF, Spencer H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med*. 2019 May;25(5):730-733. DOI: 10.1038/s41591-019-0437-z
- Dedrick RM, Smith BE, Cristinziano M, Freeman KG, Jacobs-Sera D, Belessis Y, et al. Phage Therapy of *Mycobacterium* Infections: Compassionate Use of Phages in 20 Patients With Drug-Resistant Mycobacterial Disease. *Clin Infect Dis*. 2023 Jan 6;76(1):103-112. DOI: 10.1093/cid/ciac453
- Nick JA, Dedrick RM, Gray AL, Vladar EK, Smith BE, Freeman KG, et al. Host and pathogen response to bacteriophage engineered against *Mycobacterium abscessus* lung infection. *Cell*. 2022 May 26;185(11):1860-1874.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2022.04.024
- Little JS, Dedrick RM, Freeman KG, Cristinziano M, Smith BE, Benson CA, et al. Bacteriophage treatment of disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection. *Nat Commun*. 2022 May 3;13(1):2313. DOI: 10.1038/s41467-022-29689-4
- Broxmeyer L, Sosnowska D, Miltner E, Chacón O, Wagner D, McGarvey J, et al. Killing of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens. *J Infect Dis*. 2002 Oct 15;186(8):1155-60. DOI: 10.1086/343812
- Foley-Thomas EM, Whipple DL, Bermudez LE, Barletta RG. Phage infection, transfection and transformation of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Microbiology (Reading)*. 1995 May;141(Pt 5):1173-1181. DOI: 10.1099/13500872-141-5-1173