

На правах рукописи

Морозова Наталия Евгеньевна

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СИСТЕМ ЗАЩИТЫ *Escherichia coli*
ОТ БАКТЕРИОФАГОВ**

03.01.03 — «Молекулярная биология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2018

Работа выполнена в Научно-исследовательском комплексе «Нанобиотехнологии» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Научный руководитель:

Северинов Константин Викторович, д.б.н., профессор, зав. лаб. молекулярной микробиологии НИК «Нанобиотехнологии» ФГАОУ ВО «СПбПУ».

Официальные оппоненты:

Константин Анатольевич Мирошников, д.х.н., заведующий Лабораторией молекулярной биоинженерии Института Биоорганической Химии РАН

Спирин Сергей Александрович, к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник Отдела математических методов в биологии НИИ Физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Ведущая организация:

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Защита диссертации состоится «18» октября 2019 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института цитологии Российской академии наук по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте института по адресу <https://www.incras.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

кандидат биологических наук

Безбородкина Н.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Взаимоотношения бактерий и их вирусов представляют значительный практический интерес. С одной стороны, остро стоит проблема поиска новых антибактериальных агентов, одними из которых могут выступать вирусы бактерий – бактериофаги. С другой стороны, массовая гибель бактерий от вирусов также является существенной проблемой, например, в пищевой промышленности [1]. Многие бактерии используют разнообразные механизмы противовирусной защиты, не позволяющие бактериофагу уничтожать бактериальную популяцию. Одними из самых распространённых защитных систем являются системы рестрикции-модификации (РМ) [2-5]. Принцип их действия основан на активностях двух ферментов. Метилтрансфераза (МТ) метилирует ДНК в определённых сайтах узнавания, защищая её от действия эндонуклеазы рестрикции (ЭР), способной внести двунитевой разрыв ДНК в тех же, но только неметилированных сайтах узнавания. ДНК вируса при попадании в бактериальную клетку не метилирована и, следовательно, уничтожается ЭР. Однако, несмотря на высокий уровень защиты, в некоторых случаях ДНК бактериофага успевает метилироваться, в результате чего вирус становится устойчивым к действию системы РМ. Молекулярные механизмы, которые позволяют фагам преодолевать защиту, обеспечиваемую системами РМ, не вполне понятны. Регуляторные механизмы данных систем также плохо изучены.

Другими активно изучаемыми в настоящее время защитными системами бактерий являются системы CRISPR-Cas [6, 7]. Их действие обусловлено наличием в клетках кассеты, содержащей небольшие участки ДНК вируса, разделённые одинаковыми повторами (CRISPR - clustered regularly interspaced short palindromic repeats), а также белков, связанных с этими повторами (англ. Cas — CRISPR-Associated), в том числе белков,

разрушающих участки ДНК вируса, комплементарные записанным в кассете. Существуют значительные пробелы в понимании механизмов работы систем CRISPR-Cas, связанных с адаптацией и интерференцией.

Ещё в начале 1980-х годов была открыта система бактериального иммунитета Pgl [8], однако механизм её действия до сих пор остаётся плохо изученным. Было показано, что система состоит из четырёх генов, функции которых позже были предсказаны биоинформационически.

Анализ большого количества бактериальных геномов выявил встречаемость генов, гомологичных генам системы Pgl примерно в 10% всех секвенированных геномов бактерий [9]. В 2014 году была открыта ещё одна система из *Bacillus cereus*, названная BREX и состоящая из Pgl-подобных и ещё двух дополнительных генов [10]. Данная система обеспечивает устойчивость к большому набору бактериофагов. Системы BREX являются настолько плохо изученными, что неизвестно даже точное число и особенности различных типов этих систем.

Подробное изучение подобных защитных систем и использование современных одномолекулярных методов должно позволить глубже понять механизмы преодоления их защитного действия вирусами и использовать полученные знания для создания эффективных антибактериальных фаговых препаратов [11]. Кроме того, изучение систем CRISPR-Cas может позволить продвинуться в успешном редактировании геномов, в том числе и человеческого.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы явилось выявление молекулярных механизмов работы защитных систем бактерий от вирусов, в частности, системы рестрикций-модификации Esp1396I, системы BREX из *Escherichia coli*, а также системы CRISPR-Cas первого типа.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Разработка методики проведения экспериментов с длительным наблюдением (более 12 часов) за функционированием живых клеток с помощью флуоресцентной микроскопии, а также калибровка оптической системы для измерения концентрации флуоресцентных белков в одиночных клетках.
2. Изучение динамики появления белков системы рестрикции-модификации Esp1396I в новой бактериальной клетке-хозяине.
3. Оценка влияния копийности плазмида, несущий систему рестрикции-модификации Esp1396I, на концентрации метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в клетках, и на эффективность противовирусной защиты.
4. Осуществление контролируемого сдвига соотношений ферментов системы PM Esp1396I в клетках и оценка влияния различных соотношений МТ/ЭР на эффективность защиты от бактериофага.
5. Выявление механизмов регуляции системы рестрикции-модификации Esp1396I. Создание генетических конструкций для искусственного варьирования концентрации С-белка системы Esp1396I в клетках.
6. Исследование процесса инфекции бактериофагом T7 клеток *E. coli*, защищенных CRISPR-Cas системой, методами флуоресцентной микроскопии.
7. Изучение механизмов работы системы BREX методами флуоресцентной микроскопии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Динамика экспрессии генов системы Esp1396I определяется действием регуляторного С-белка.

2. Вероятность преодоления фагом системы Esp1396I зависит как от абсолютных значений концентраций метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции, так и от их соотношения.
3. Динамика заражения бактериофагом T7 бактериальных клеток с системой CRISPR-Cas не зависит от того, на какие гены (ранние, средние или поздние) направлена система CRISPR-Cas.
4. Защитная система BREX не влияет на выход профага λ из клеток. Бактериофаг, вышедший из клеток с системой BREX, оказывается модифицированным и устойчивым к действию этой защитной системы.

Научная новизна и практическая ценность работы

Изучение защитных систем бактерий от вирусов ведётся уже длительное время, что привело к открытию эндонуклеаз рестрикции, повсеместно используемых для молекулярного клонирования. Ранее такие системы изучали классическими микробиологическими методами, которые позволяли рассматривать одновременно целые популяции клеток, что при измерении различных параметров обеспечивало получение только усредненных данных. Развитие флуоресцентной микроскопии и использование в нашей работе флуоресцентных белков позволило впервые изучить защитные системы на уровне одиночных бактериальных клеток. Благодаря применению этих методов нами было установлено, что даже в генетически однородной популяции клеток действительно существуют значительные вариации в экспрессии генов системы РМ [12].

Методами математического моделирования было показано [13], что либо вероятность метилирования ДНК бактериофага и последующего преодоления защиты системы РМ связана с вариацией уровней экспрессии генов МТ и ЭР, а также их отношения в одиночных бактериальных клетках, либо же это

стохастический процесс, не зависящий от количества этих двух ферментов в клетке. Однако этот вопрос до сих пор остаётся открытым.

Более полное понимание механизмов резистентности бактерий к вирусам, а также выяснение механизмов регуляции защитных систем может помочь в создании эффективных антибактериальных фаговых препаратов. Кроме того, подробное изучение систем CRISPR-Cas может привести к созданию прецизионных методов редактирования геномов различных живых организмов, включая человека. Поэтому изучение механизмов работы защитных систем бактерий является чрезвычайно важной задачей.

Финансовая поддержка

Диссертационная работа выполнена в рамках работ по ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (Соглашение № 14.606.21.0006 от 26.10.2017 г. УИ RFMEFI60617X0006) и Государственного задания (Шифр: 3.8742.2017/БЧ) с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий «СПбПУ» на базе ФГАОУ ВО «СПбПУ».

Структура и объем работы

Работа построена по стандартной схеме и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, выводы, а также список использованной литературы (174 источника). Объём работы составляет 111 страниц. Работа содержит 1 таблицу, 7 формул, 36 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение динамики возникновения белков системы рестрикций-модификации Esp1396I в наивной клетке

В работе использовали модифицированную систему рестрикций-модификации Esp1396I_Fluo, находящуюся на высококопийной плазмиде pUC19. В данной системе РМ метилтрансфераза была слита с флуоресцентным белком Venus, а эндонуклеаза рестрикции — с флуоресцентным белком mCherry.

Для того, чтобы наблюдать малоэффективный процесс трансформации клеток *E. coli* флуоресцентно-меченной системой РМ Esp1396I, использовали коммерческие высококомпетентные клетки *E. coli*, штамм XL-1Blue (Евроген).

После трансформации плазмидой, несущей систему РМ, клетки помещали в микроскопный слайд, после чего наблюдали в течение 12 часов в двух флуоресцентных каналах, а также в режиме проходящего света.

Интенсивность флуоресценции одиночных бактерий, наблюдалась при помощи флуоресцентного микроскопа, считали пропорциональной количеству молекул флуоресцентных белков в клетках, которое в свою очередь считали пропорциональным количеству МТ и ЭР. Проведённая калибровка, описанная ранее [12], позволила оценить количество МТ и ЭР в одиночных клетках.

Изучение влияния копийности плазмиды, несущей систему рестрикций-модификации Esp1396I, на эффективность защиты от вируса

Система РМ Esp1396I_Fluo была помещена на три плазмиды, имеющие различную копийность: высококопийную pUC19, среднекопийную pBR322 и

низкокопийную pSC101. Копийности плазмид были определены методом ПЦР в режиме реального времени.

Плазмидами, несущими исследуемую систему РМ, трансформировали клетки штамма DH5α *E. coli*. Была проведена проверка эффективности защиты от бактериофага λ клеток с плазмидами различной копийности, а также метилирования вируса, преодолевшего защитное действие системы РМ. Для всех трёх случаев в одиночных клетках были измерены количества МТ и ЭР.

Искусственное изменение отношения концентраций МТ/ЭР в клетках и его влияние на защиту от вируса

Методами молекулярного клонирования были созданы генетические конструкции pACYCBad_R_fлуо и pACYCBad_M_fлуо, представляющие собой векторы на основе плазмиды pACYC184, несущие белки слияния МТ::Venus или ЭР::mCherry под арабинозным промотором. Полученные плазмиды сообщают клеткам устойчивость к хлорамфениколу и совместимы с плазмидами pUC19_Esp1396I_Fluo, pBR322_Esp1396I_Fluo и pSC101_Esp1396I_Fluo.

Полученными плазмидами были трансформированы клетки *E. coli* DH5α, также несущие плазмиду pBR322_Esp1396I_Fluo. Таким образом, были получены два типа клеток с системой РМ, в которых можно контролируемо изменять концентрацию МТ либо ЭР, чтобы изучить влияние изменения отношения концентраций белков системы РМ Esp1396I в клетках на эффективность противовирусной защиты.

В качестве индуктора добавляли арабинозу в различных концентрациях (1мкМ, 10мкМ, 100мкМ, 1мМ, 10мМ) для индукции дополнительной

экспрессии генов МТ или ЭР. Далее клетки заражали бактериофагом λ для проверки эффективности действия системы РМ.

Роль С-белка в регуляции системы рестрикции-модификации Esp1396I

Для изучения роли С-белка в системе РМ была создана генетическая конструкция, несущая гены системы РМ Esp1396I без гена, кодирующего регуляторный С-белок (pUC-MV). Кроме того, была создана конструкция, несущая ген С-белка под контролем индуцибельного арабинозного промотора (pC) для его регулируемой экспрессии в клетках.

Чтобы оценить влияние различных количеств С-белка на концентрации МТ и ЭР, клетки *E. coli* DH5 α трансформировали двумя плазмидами, pUC-MV и pC, по стандартной методике. Далее выращивали ночную культуру, вносили её в свежую питательную среду в соотношении 1:100 и продолжали культивировать до оптической плотности $OD_{600} \approx 0.2$, после чего добавляли различные концентрации арабинозы (0.1 мкМ, 10мкМ, 0.13мМ, 13 мМ, 100мМ). Далее клетки продолжали культивировать при $+37^\circ\text{C}$, каждый час отбирая аликвоту (1 мкл) для наблюдения за интенсивностью их флуоресценции. Отобранные клетки помещали в микроскопный слайд на слой 1,5% агарозы, после чего фотографировали в трёх каналах: зелёном флуоресцентном канале (Venus), красном флуоресцентном канале (Cherry), а также в режиме проходящего света.

Процесс инфекции бактериофагом T7 клеток с системой CRISPR-Cas

Изучали динамику инфекции бактериофагом T7 клеток *E. coli* с активной и неактивной системой CRISPR-Cas I-E, направленной на ранние, средние или поздние гены вируса.

Бактериальные клетки с активной и неактивной CRISPR-Cas системой смешивали с бактериофагом T7 и помещали в микроскопный слайд на

подложку из 1,5% агарозы с добавлением питательной среды LB. Для визуализации актов бактериальной смерти к образцу добавляли красный флуоресцентный краситель йодид пропидия (Molecular Probes), который способен проникать исключительно через повреждённую клеточную мембрану и таким образом визуализировать только мёртвые бактерии.

Выявление механизмов работы BREX системы

Методами флуоресцентной микроскопии изучали работу системы BREX из *E. coli*. Были проведены эксперименты по анализу процессов заражения и индукции профага λ из клеток с BREX системой и без неё (BREX+ и BREX-).

Бактериальные клетки *E. coli* BW25113 заражали флуоресцентным бактериофагом λ D-EYFP cI857, имеющим ген устойчивости к канамицину и способным встраиваться в геном бактерии, после чего отбирали лизогенные клетки.

Клетки с профагом трансформировали плазмидой на основе вектора pBTB-2 с системой BREX или с вектором pBTB-2 в качестве контроля. Полученные BREX+ и BREX- лизогенные клетки выращивали до оптической плотности $OD_{600} \approx 0,4-0,6$, после чего инкубировали при 42°C 20 мин для обеспечения выхода профага из бактериальных клеток. Затем к клеткам добавляли красный флуоресцентный краситель йодид пропидия (Molecular Probes) в конечной концентрации 20 мкМ для более наглядной визуализации лизиса клеток. Непосредственно после этого бактерии наносили в микроскопный слайд на подложку из агаризованной питательной среды LB.

На полученных флуоресцентных изображениях, а также изображениях в проходящем свете подсчитывали количество живых и мёртвых клеток на поле в каждый момент времени, а также оценивали интенсивность флуоресценции клеток в зелёном флуоресцентном канале, характеризующем интенсивность размножения фага в клетках.

Аналогичным образом бактериофаг λ D-EYFP cI857, вышедший из клеток BREX- и BREX+, использовали для наблюдения за инфекцией клеток BREX- и BREX+.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика синтеза белков системы рестрикции-модификации Esp1396I в «наивной» клетке *E. coli*

Полученные флуоресцентные изображения, а также изображения в проходящем свете позволили наблюдать за актами трансформации одиночных клеток плазмидой Esp1396I, и за их судьбой на протяжении нескольких часов.

В процессе формирования микроколонии флуоресценция белка слияния MT::Venus появлялась первой и детектировалась, когда микроколония состояла из 1-2 клеток (Рисунок 1). Флуоресценция белка слияния ЭР::mCherry начинала появляться с задержкой в 30-60 мин относительно появления флуоресценции Venus. В течение эксперимента измеряли флуоресценцию индивидуальных клеток, после чего с помощью калибровки пересчитывали в количество белков MT::Venus и ЭР::mCherry (Рисунок 1В). Кривая зависимости средней концентрации MT::Venus в клетке от времени имеет явно выраженный пик с максимумом на 150-250 мин после трансформации, после чего имеет место резкое уменьшение концентрации до значения, характерного для стабильно трансформированных клеток. Накопление ЭР::mCherry имеет абсолютно другой, более медленный и монотонный характер. Таким образом, данная зависимость наглядно демонстрирует наличие регуляции системы РМ, обусловленной необходимостью метилирования генома клетки-хозяина до его деградации эндонуклеазой рестрикции.

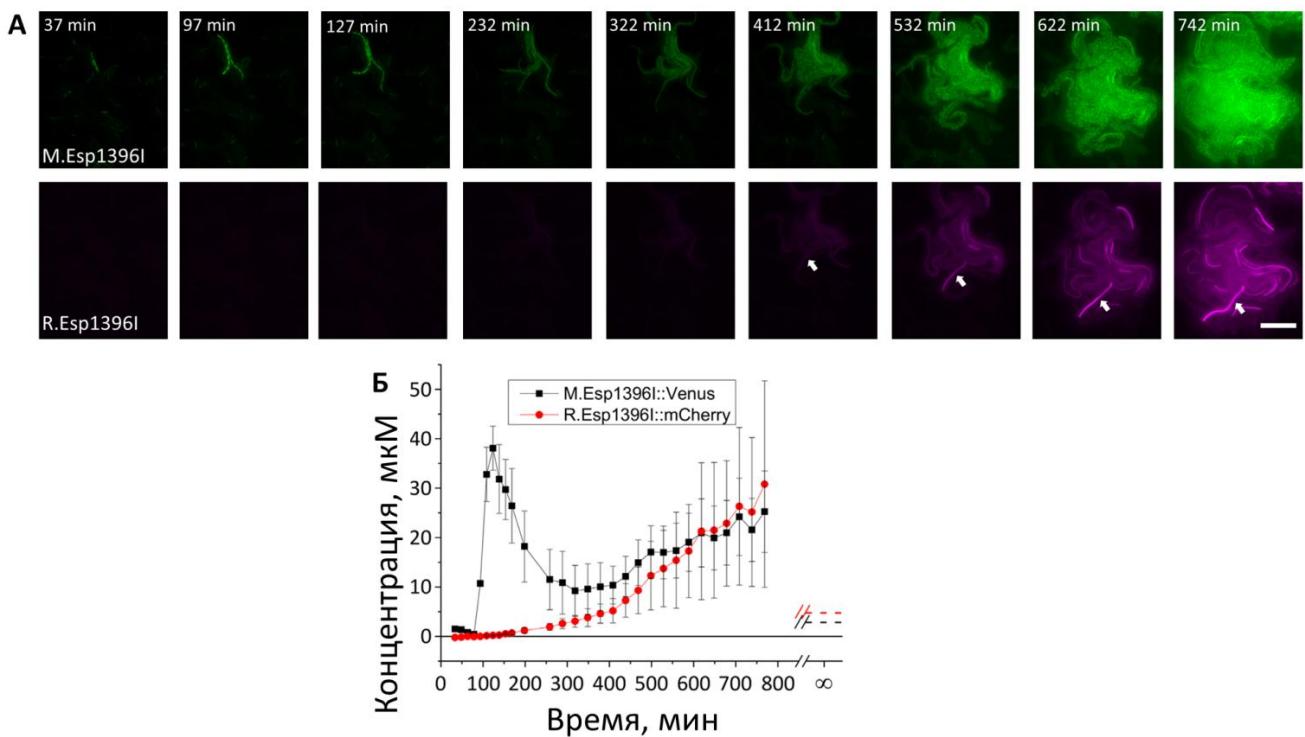


Рисунок 1. Динамика появления и накопления МТ и ЭР в отдельных клетках *E. coli*. **А.** Серия изображений, иллюстрирующих динамику появления МТ (зелёный) и ЭР (фиолетовый); **Б.** Зависимости средней концентрации МТ и ЭР в клетках от времени. Пунктирной линией на графике указаны концентрации ЭР и МТ в стабильно трансформированных клетках. Шкала — 20 мкм

Для данного процесса было выполнено моделирование, учитывающее все имеющиеся знания о регуляции транскрипции системы рестрикция-модификации Esp1396I С-белком, скорости деления клеток и динамике экспрессии белков в эксперименте (Рисунок 2).

Модель, построенная для ЭР, хорошо согласуется с экспериментальными данными (Рисунок 2В), в то время как моделирование процесса появления и накопления МТ хорошо согласуется с экспериментальными данными только в первые ≈ 160 мин (Рисунок 2Б). Видно, что модель хорошо описывает резкое увеличение и спад количества МТ::Venus в клетке, однако, в

следующем временном интервале, когда скорость деления клеток становится ниже, мы наблюдаем расхождение экспериментальных и расчётных данных.

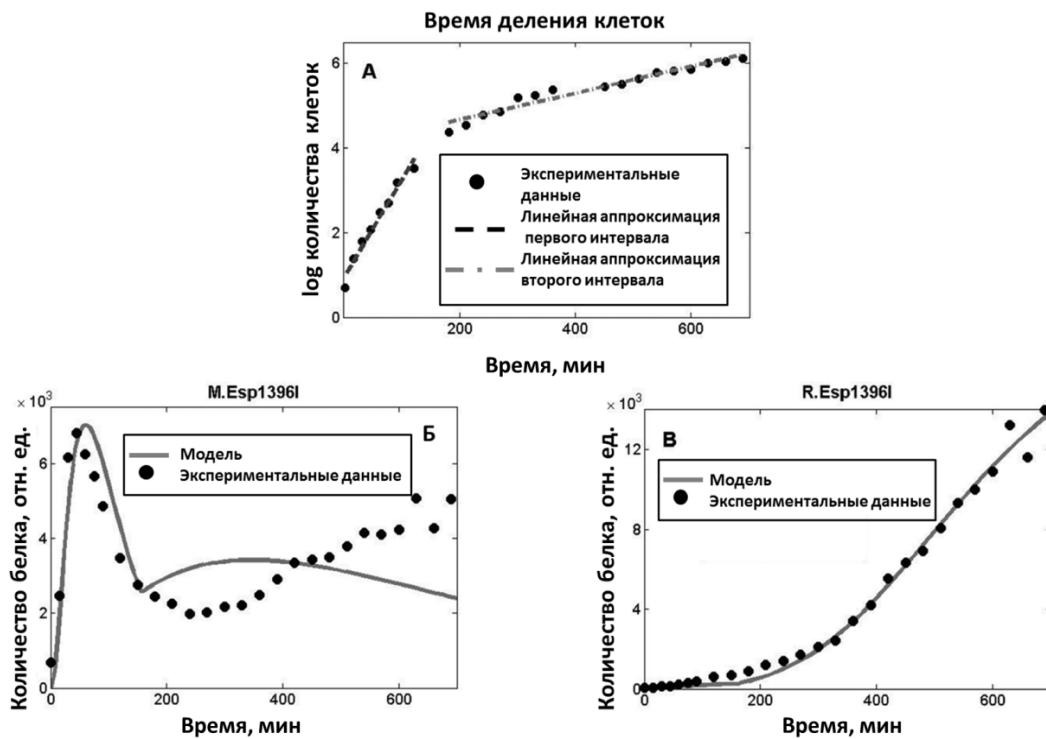


Рисунок 2. А. Кривая роста бактерий в микроколонии в процессе эксперимента. Б, В. Моделирование динамики накопления белков системы РМ *Esp1396I* в одиночных клетках: (Б) сравнение экспериментальных данных и расчётных данных динамики экспрессии МТ; (В) Сравнение экспериментальных и расчётных данных динамики экспрессии ЭР.

Влияние копийности плазмида с системой рестрикции-модификации *Esp1396I* на эффективность защиты клетки от вируса

Было установлено, что в условиях данных экспериментов плазмида *pUC19_Esp1396I_Fluo*, *pBR322_Esp1396I_Fluo*, *pSC101_Esp1396I_Fluo* имеют 54 ± 21 , $30 \pm 12,5$ и $8,5 \pm 3,5$ копии на клетку, соответственно.

Также было показано, что титр бактериофага λ в клетках с системой РМ на плазмиде *pUC19_Esp1396I_Fluo* оказывается на 4-5 порядков ниже, чем для

контрольных клеток без защитной системы. Для плазмид pBR322_Esp1396I_Fluo и pSC101_Esp1396I_Fluo характерно повышение титра на 2 и 3-3,5 порядка по сравнению с плазмидой pUC19_Esp1396I_Fluo соответственно.

Также для разных плазмид, несущих систему РМ была проведена проверка метилирования бактериофага, преодолевшего защиту системы. Показано, что независимо от того, какой уровень защиты от вируса обеспечивает система рестрикции-модификации, фаговое потомство, преодолевшее её действие, оказывается модифицированным.

Полученные флуоресцентные изображения клеток, несущих флуоресцентно-меченную систему рестрикции-модификации на плазмидах различной копийности позволили измерить количества белков МТ::Venus и ЭР::mCherry в одиночных бактериальных клетках. Оказалось, что они значительно варьируются для различных типов клеток, кроме того отношение МТ/ЭР также изменяется (Рисунок 3). Наибольшие концентрации МТ::Venus и ЭР::mCherry наблюдаются в клетках с плазмидой высокой копийности (pUC19_Esp1396I_Fluo), тогда как наименьшие оказываются в клетках с плазмидой низкой копийности (pSC101_Esp1396I_Fluo). При этом наблюдается существенное изменение соотношения МТ и ЭР в клетках. Также показано (Рисунок 3Г), что с уменьшением копийности плазмиды и ростом отношения МТ/ЭР значительно ухудшается эффективность защиты системы рестрикции-модификации от вируса.

Таким образом, показано, что чем меньше белков МТ и ЭР в клетках, и больше отношение МТ/ЭР, тем хуже система РМ защищает клетки от бактериофага.

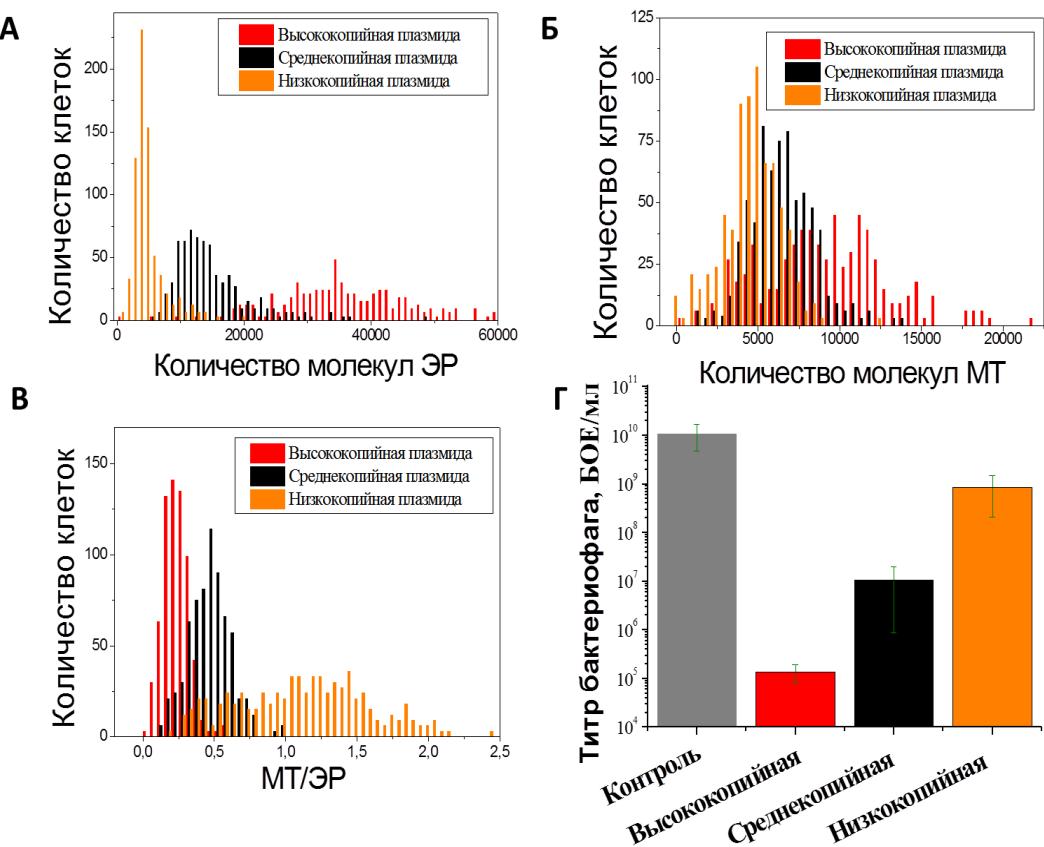


Рисунок 3. Распределение клеток с высококопийной, среднекопийной и низкокопийной плазмидами (pUC19_Esp1396I_Fluo, pBR322_Esp1396I_Fluo и pSC101_Esp1396I_Fluo соответственно) по количествам ЭР (А) и МТ (Б). В. Отношение количества МТ к ЭР в одиночных клетках с высококопийной, среднекопийной и низкокопийной плазмидами Г. Титр бактериофага λ , заражающего клетки без системы рестрикции-модификации, и клетки с высококопийной, среднекопийной и низкокопийной плазмидами с системой рестрикции-модификации.

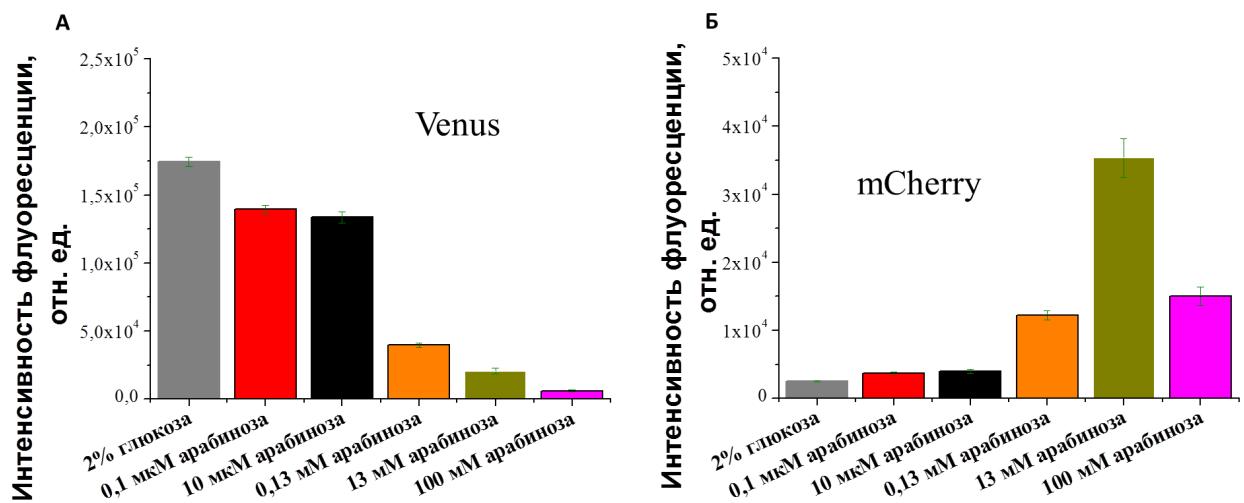
Искусственное изменение соотношения метилтрансферазы к эндонуклеазе рестрикции в клетках с системой рестрикции-модификации

Чтобы выяснить, что играет ключевую роль в изменении уровня противовирусной защиты: отношение концентраций белков системы рестрикции-модификации или абсолютные значения концентраций, соотношение МТ/ЭР в клетках было искусственно смещено.

В результате индукции МТ или ЭР в дополнение к уже присутствующей в клетках системе PM pBR322_Esp1396I_Fluo, показано, что при увеличении концентрации ЭР в клетках относительно количества МТ происходит улучшение защитных свойств системы рестрикции-модификации приблизительно на 1 порядок. В то же время, смещение отношения МТ/ЭР в сторону увеличения МТ приводит к ухудшению защиты системы на 1,5-2 порядка.

Роль С-белка в регуляции системы рестрикции-модификации Esp1396I

Оценка влияния различных количеств С-белка в клетке на концентрацию МТ и ЭР показала, что с ростом количества С-белка в клетках абсолютные количества МТ и ЭР также значительно изменяются (Рисунок 4).



Ген регуляторного белка С экспрессируется с плазмиды pC, а его количество в клетках регулируется добавлением различных концентраций индуктора. А. Интенсивность флуоресценции белка Venus, имитирующего экспрессию метилтрансферазы в

клетках *E. coli*. **Б.** Интенсивность флуоресценции белка mCherry, имитирующего экспрессию эндонуклеазы рестрикции в клетках.

В результате экспрессии различного количества С-белка в клетках при добавлении к ним индуктора в различной концентрации показано, что в отсутствии регуляторного белка (при добавлении 2% глюкозы) происходит продукция большого количества белка Venus без продукции mCherry. Для концентраций индуктора 0,1 и 10 мкМ интенсивности флуоресцентных белков изменяются незначительно. Для концентрации 0,13 мМ же видно, что Venus синтезируется гораздо хуже, в то время как флуоресценция mCherry начинает активно расти. При дальнейшем росте концентрации индуктора (13мМ) происходит резкое ингибирование экспрессии гена Venus и активирование экспрессии mCherry, что иллюстрирует ситуацию, когда С-белок связывается с сайтом в промоторной области Venus (МТ), ингибируя его транскрипцию. При этом происходит связывание дистального сайта в промоторной области гена mCherry (ЭР), отвечающего за индукцию его экспрессии. При ещё большем увеличении концентрации индуктора и, следовательно, большем росте количества С-белка в клетках происходит его связывание со всеми тремя сайтами (один в промоторной области МТ, а два других в промоторной области ЭР), что приводит к ингибированию экспрессии обоих генов системы РМ.

Процесс инфекции бактериофагом Т7 клеток с системой CRISPR-Cas типа I-E

В процессе работы была исследована динамика инфекции бактериофагом Т7 клеток *E. coli* с активированной и не активированной системой CRISPR-Cas I-E (Рисунок 5). При этом наблюдалось заражение клеток с системой CRISPR-Cas, активной против ранних, средних и поздних генов бактериофага. Для всех типов кассет CRISPR со спейсерами к ранним,

средним и поздним генам вируса наблюдали схожую динамику развития вирусной инфекции.

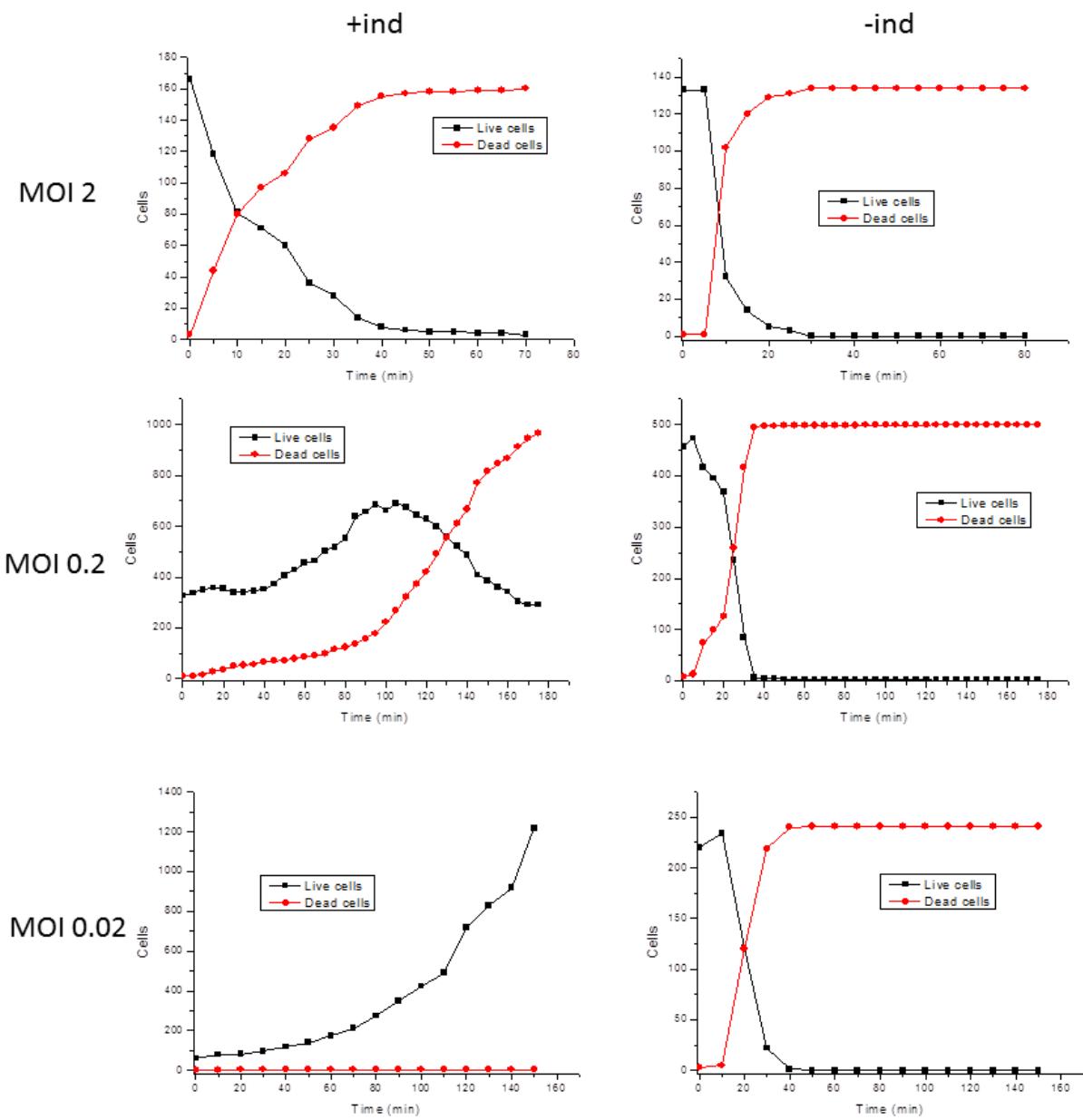


Рисунок 5. Количество живых (чёрный) и мёртвых (красный) клеток на поле зрения в процессе инфекции бактериофагом T7 клеток *E. coli* с активированной (слева) и не активированной (справа) системой CRISPR-Cas I-E при различной множественности инфекции.

Механизмы работы защитной системы BREX

Показано, что защитная система BREX не мешает выходу бактериофага λ из клеток, в случае если он находился в состоянии профага до внесения в эти клетки защитной системы. На рисунке 6 представлена динамика выхода бактериофага λ , находящегося в лизогенном состоянии, из клеток с системой BREX и без неё. Видно, что вирус выходит одинаково эффективно как из клеток без системы BREX, так и из клеток с нею.

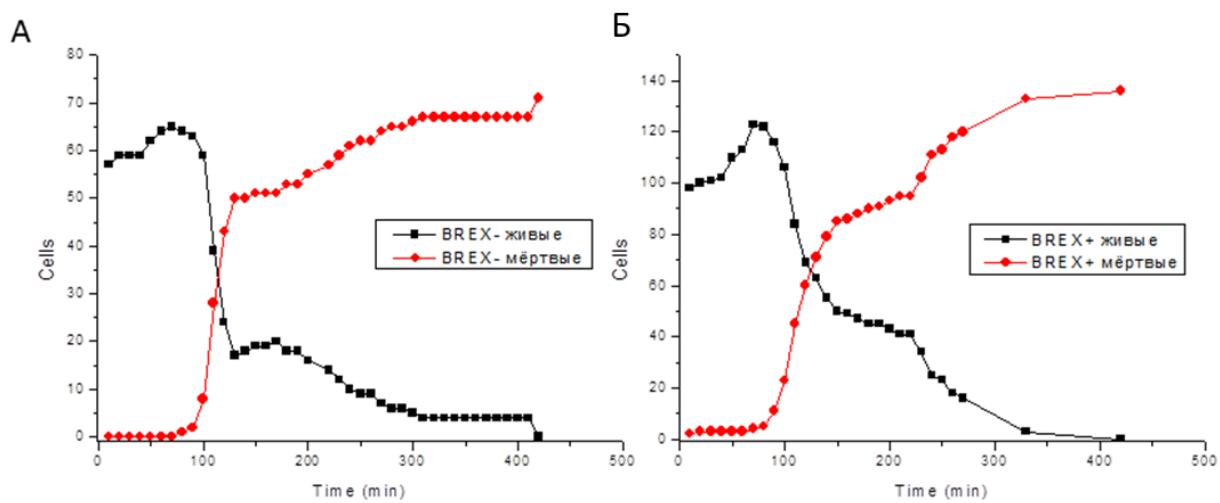


Рисунок 6. Динамика выхода бактериофага λ , находившегося в лизогенном состоянии, из клеток без системы BREX (А) и клеток с системой BREX (Б)

В процессе заражения клеток бактериофагом, вышедшим из клеток без системы BREX ($\lambda_{\text{BREX-}}$), актов бактериальной смерти практически не происходит (Рисунок 6Б). При заражении же клеток вирусом, вышедшим из клеток с системой BREX ($\lambda_{\text{BREX+}}$), наблюдается заметный лизис культуры (Рисунок 7Рисунок 6В). Кроме того оказалось, что бактериофаг, индуцированный из клеток с системой BREX, приобретает модификацию по сайтам GGTAAG, которые также являются модифицированными в геноме клеток с системой BREX, а потомство такого бактериофага становится устойчивым к её действию.

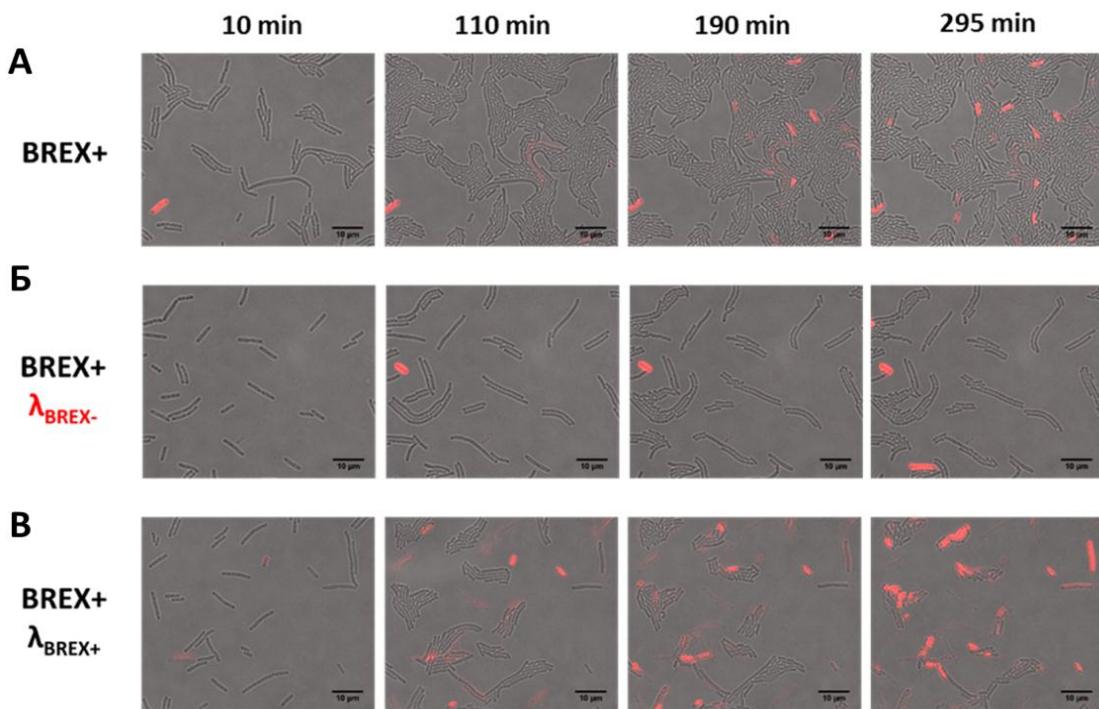


Рисунок 7. Динамика заражения клеток с системой BREX. **А.** Клетки с системой BREX и без вируса. **Б.** Клетки с BREX- вирусом. **В.** Клетки с BREX+ вирусом. Красным цветом показана флуоресценция клеток, окрашенных иодидом пропидия для визуализации актов бактериального лизиса

ВЫВОДЫ

1. После введения системы-рестрикции модификации Esp1396I в бактериальную клетку эндонуклеаза рестрикции начинает синтезироваться с задержкой 30-60 мин относительно синтеза метилтрансферазы.
2. Экспрессия генов системы Esp1396I определяется действием регуляторного С-белка.
3. Уменьшение копийности плазмида, несущей систему рестрикции модификации, приводит к уменьшению количества ферментов метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в клетке.

4. Абсолютные значения концентраций метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции и их соотношение влияют на вероятность преодоления фагом системы рестрикции-модификации Esp1396I.
5. Динамика заражения бактериофагом T7 бактериальных клеток с системой CRISPR-Cas не зависит от того, на какие гены (ранние, средние или поздние) направлена система CRISPR-Cas.
6. При малой множественности инфекции ($MOI = 0,02$) система CRISPR – Cas демонстрирует высокий уровень защиты (культура заражённых клеток ведёт себя так же, как и незаражённых). При большой множественности инфекции ($MOI = 0,2-2$) защита оказывается недостаточной. Все фаговые частицы после выхода из клеток оказываются мутантными.
7. Защитная система BREX не влияет на выход профага λ из клеток. Бактериофаг, вышедший из клеток с системой BREX, оказывается метилированным и устойчивым к действию данной системы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хочу поблагодарить всех, без кого эта работа не состоялась бы. Прежде всего, благодарю своего научного руководителя Северинова Константина Викторовича за возможность работы над невероятно интересным проектом, за бесценные идеи и замечания.

Также хочу поблагодарить директора НИК «Нанобиотехнологии» СПбПУ Ходорковского Михаила Алексеевича за обеспечение уникальных условий работы и создание замечательной, доброй и уютной атмосферы в лаборатории, а также за поддержку, ценные идеи и советы.

Огромное спасибо Сабанцеву Антону Владимировичу за то, что научил меня микроскопии, привил невероятный интерес к биологии и науке вообще, научил постоянно учиться, а также за интересное общение.

Благодарю Ведяйкина Алексея Дмитриевича, за теплоту, помощь, поддержку и ценные советы.

Благодарю Строцскую Александру и Гордееву Юлию за предоставленную возможность работы по изучению защитных систем CRISPR-Cas и BREX.

Благодарю Фёдорову Яну, Ширяеву Анну, Майкову Анну, Полиновскую Василису, Резинюк Дарью, Смирнова Сергея за помощь в работе по изучению системы рестрикции-модификации.

Благодарю Побегалова Георгия, Арсениева Анатолия, Якунину Марию, Зюбко Татьяну, Кириллова Александра за ценные советы, а также интересное общение.

Также благодарю весь коллектив НИК «Нанобиотехнологии» СПбПУ за помощь, поддержку и эту невероятную рабочую атмосферу.

Благодарю своих родителей за воспитание, образование и поддержку.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных журналах:

1. N. Morozova, A. Sabantsev, E. Bogdanova, Y. Fedorova, A. Maikova, A. Vedyaykin, A. Rodic, M. Djordjevic, M. Khodorkovskii, K. Severinov. Temporal dynamics of methyltransferase and restriction endonuclease accumulation in individual cells after introducing a restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(2):790-800.
2. Alexandra Strotskaya, Ekaterina Savitskaya, Anastasia Metlitskaya, Natalia Morozova, Kirill A. Datsenko, Ekaterina Semenova, Konstantin Severinov. The action of *Escherichia coli* CRISPR–Cas system on lytic bacteriophages with different lifestyles and development strategies. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45 (4): 1946-1957.

3. Gordeeva J, Morozova N, Sierro N, Isaev A, Sinkunas T, Tsvetkova K, Matlashov M, Truncaite L, Morgan RD, Ivanov NV, Siksnys V, Zeng L, Severinov K. BREX system of *Escherichia coli* distinguishes self from non-self by methylation of a specific DNA site. Nucleic Acids Res. 2018.

Публикации в сборниках тезисов конференций:

1. N.E. Morozova, Y.V. Fedorova, E.S. Bogdanova, A.D. Vedyaykin, N.N. Konstantinova, A.V. Sabantsev, M.A. Khodorkovskiy, K.V. Severinov. An assay for the study of Type II restriction - modification system in *E.coli* at the single - cell level, Bangalore Microscopy Course 2014 Bangalore, India, 21.09.2014 - 28.09.2014.
2. N. Morozova, A. Sabantsev, E. Bogdanova, Y. Fedorova, A. Maykova, A. Vedyaykin, M. Khodorkovskii, K. Severinov. Study of a TypeII Restriction - Modification system at the single-cell level using fluorescence microscopy, EMBL Symposium: New Approaches and Concepts in Microbiology Heidelberg, Germany, 11.10.2015 - 14.10.2015.
3. N. Morozova, A. Sabantsev, E. Bogdanova, Y. Fedorova, A. Maykova, A. Vedyaykin, M. Khodorkovskii, K. Severinov. Study of effect of gene expression variations on phage infection probability in *E.coli* cells with a type II restriction - modification system, SBBI'2016 Санкт – Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, 30.06.2016 - 02.07.2016.
4. N. Morozova, A. Sabantsev, E. Bogdanova, Y. Fedorova, A. Maikova, A. Shiriaeva, A. Vedyaykin, A. Rodic, M. Djordjevic, M. Khodorkovskii, and K. Severinov Study of restriction – modification system Esp1396I in *E. coli* at the single - cell level using fluorescence microscopy, International conference AFLIM Сочи, Дагомыс, 03.10.2016 - 06.10.2016.

5. Морозова Н.Е., Сабанцев А.В., Богданова Е.С., Фёдорова Я.В., Майкова А.С., Ведяйкин А.Д., Ходорковский М.А., Северинов К.В. Изучение процессов появления и накопления белков системы рестрикции-модификации II типа Esp1396I после её внесения в бактериальную клетку с использованием флуоресцентной микроскопии. 50 - я зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии Петербургского Института Ядерной Физики НИЦ КИ, Роцино, 23.02.2016 - 05.03.2016 .
6. А.А. Кириллов, Н.Е. Морозова, А.С. Майкова, М.А. Ходорковский, К.В. Северинов. Исследование системы рестрикции-модификации II типа Esp1396I в клетках *Escherichia coli*. Конференция с международным участием «Неделя Науки СПбПУ», Санкт-Петербург, 14-19 ноября 2016 г.
7. Е.А. Знобищева, Н.Е. Морозова, М. Л. Соколова, М.А. Ходорковский, К.В. Северинов. Редактирование генома бактериофага T7 с помощью белка Cas 9 из *Streptococcus pyogenes*. Конференция с международным участием XLVI «Неделя Науки СПбПУ», Санкт-Петербург, 13-19 ноября 2017 г.
8. Д.А. Резинюк, Н.Е. Морозова, А.А. Ширяева, М.А. Ходорковский, К.В. Северинов. Изучение регуляции системы рестрикции-модификации II типа Esp1396I. Конференция с международным участием XLVI «Неделя Науки СПбПУ», Санкт-Петербург, 13-19 ноября 2017 г.
9. С.В. Смирнов, Н.Е. Морозова, М.А. Ходорковский, К.В. Северинов. Влияние отношения концентраций белков системы рестрикции-модификации II типа в клетках *E. coli* на эффективность защиты от бактериофага. VI Молодёжная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН 25–27 апреля 2018 г.
10. Смирнов С. В., Морозова Н. Е., Ходорковский М. А., Северинов К. В. Использование флуоресцентной микроскопии в изучении влияния концентрации белков системы Esp1396I на степень защиты от бактериофага.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J.E. Garneau, S. Moineau. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. // *Microb Cell Fact*, 2011. 10 Suppl 1: p. S20.
2. H.W. Boyer. DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. // *Annu Rev Microbiol*, 1971. 25: p. 153-76.
3. D.L. Boyle, Z. Han, J.L. Rutter, C.E. Brinckerhoff, G.S. Firestein. Posttranscriptional regulation of collagenase-1 gene expression in synoviocytes by adenosine receptor stimulation. // *Arthritis Rheum*, 1997. 40(10): p. 1772-9.
4. A. Pingoud, G.G. Wilson, W. Wende. Type II restriction endonucleases--a historical perspective and more. // *Nucleic Acids Res*, 2014. 42(12): p. 7489-527.
5. R.J. Roberts, M. Belfort, T. Bestor at al., A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. // *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(7): p. 1805-12.
6. E.V. Koonin, K.S. Makarova, F. Zhang. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. // *Curr Opin Microbiol*, 2017. 37: p. 67-78.
7. F.J. Mojica, C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez, E. Soria. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. // *J Mol Evol*, 2005. 60(2): p. 174-82.
8. T.A. Chinenova, N.M. Mkrtumian, N.D. Lomovskaya. [Genetic characteristics of a new phage resistance trait in *Streptomyces coelicolor* A3(2)]. // *Genetika*, 1982. 18(12): p. 1945-52.
9. K.S. Makarova, Y.I. Wolf, S. Snir, E.V. Koonin. Defense islands in bacterial and archaeal genomes and prediction of novel defense systems. // *J Bacteriol*, 2011. 193(21): p. 6039-56.
10. R. Barrangou, J. van der Oost. Bacteriophage exclusion, a new defense system. // *EMBO J*, 2015. 34(2): p. 134-5.
11. I.U. Haq, W.N. Chaudhry, M.N. Akhtar, S. Andleeb, I. Qadri. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. // *Virol J*, 2012. 9: p. 9.
12. N. Morozova, A. Sabantsev, E. Bogdanova, Y. Fedorova, A. Maikova, A. Vedyaykin, A. Rodic, M. Djordjevic, M. Khodorkovskii, K. Severinov. Temporal dynamics of methyltransferase and restriction endonuclease accumulation in individual cells after introducing a restriction-modification system. // *Nucleic Acids Res*, 2016. 44(2): p. 790-800.

13. F.N. Enikeeva, K.V. Severinov, M.S. Gelfand. Restriction-modification systems and bacteriophage invasion: who wins? // *J Theor Biol*, 2010. 266(4): p. 550-9.