

Санкт-Петербургский политехнический университет  
Петра Великого  
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций

На правах рукописи

**Морозова Наталия Евгеньевна**

**Изучение взаимодействия индивидуальных бактериальных клеток с  
мобильными генетическими элементами флуоресцентными методами**

Направление подготовки

**03.06.01 Физика и астрономия**

---

*Код и наименование*

Направленность

**03.06.01 12 «Биофизика»**

---

*Код и наименование*

## **НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**

об основных результатах научно-квалификационной работы  
(диссертации)

Автор работы: Морозова Наталия  
Евгеньевна  
Научный руководитель: профессор,  
д.б.н., Северинов Константин  
Викторович

Санкт Петербург – 2018

Научно-квалификационная работа выполнена в НИК «Нанобиотехнологии» ИФНИТ федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Директор НИК  
Нанобиотехнологии СПбПУ:

*Ходорковский М.А.,  
к.ф.-м.н.*

Научный руководитель:

*Северинов К.В., д.б.н.,  
профессор*

Рецензент:

*Петухов М.Г., д.ф.-м.н.,  
НИЦ «Курчатовский  
институт» ФГБУ ПИЯФ им. Б.П.  
Константинова, Старший  
научный сотрудник*

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

## Содержание

Аннотация .....	4
<b>ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ</b> .....	5
Актуальность работы.....	5
Цель и задачи исследования .....	5
Научная новизна.....	6
Теоретическая и практическая значимость .....	7
Апробация работы.....	7
Публикации.....	8
Представление научного доклада: основные положения .....	9
<b>СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ</b> .....	10
Введение.....	10
Объекты, (предмет) и методы исследования .....	11
Результаты и их обсуждение.....	17
Заключение .....	28
Список использованной литературы .....	29
Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации).....	30

## **Аннотация**

В работе с помощью флуоресцентной микроскопии на уровне одиночных клеток изучались свойства различных защитных систем бактерий от вирусов. В частности изучалась динамика появления системы рестрикции-модификации II-го типа Esp1396I в новой хозяйской клетке. Также изучалось влияние концентраций белков этой системы на эффективность защиты от вируса. Кроме того, изучались некоторые механизмы работы систем BREX и CRISPR-Cas.

Выпускная квалификационная работа (научный доклад) изложена на 31 страницах машинописного текста и включает: общую характеристику работы; основную часть (содержание работы), в том числе объекты и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы (9 источников); список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации). Работа содержит 10 иллюстраций.

Ключевые слова: флуоресцентная микроскопия, флуоресцентные белки, бактериофаги, защитные системы бактерий от вирусов, система рестрикции-модификации, BREX, CRISPR-Cas.

In this work the properties of different antiviral bacterial defense systems were studied using fluorescence microscopy at the single-cell level. In particular, the dynamics of a type II Esp1396I restriction-modification system appearance in a new host cell was studied. The influence of Esp1396I proteins concentrations on the effectiveness of protection against the virus was also studied. In addition, we studied some BREX and CRISPR-Cas systems mechanisms of action.

Key words: fluorescence microscopy, fluorescent proteins, bacteriophages, antiviral bacterial defense systems, restriction-modification system, BREX, CRISPR-Cas

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность работы**

В естественной среде обитания бактерии постоянно подвергаются заражению вирусами, называемыми также бактериофагами или фагами. Инфицированные клетки погибают, высвобождая вирусное потомство в окружающую среду. Данный процесс может с высокой вероятностью привести к уничтожению бактериальной популяции. Для защиты от вирусов бактерии выработали целый набор защитных систем, таких как CRISPR-Cas, BREX, системы рестрикции-модификации и другие.

Защитные системы бактерий важны в микробиологических производствах, а также представляют значительный интерес в других областях. Например, система CRISPR-Cas является частью перспективного инструмента, позволяющего прецизионно редактировать геномы высших организмов, включая человека. В последнее время появляется всё больше мультирезистентных бактериальных штаммов, против которых большинство известных антибиотиков оказываются неэффективными. Изучение противовирусных бактериальных систем и механизмов их регуляции может помочь в создании новых эффективных антибактериальных препаратов на основе фагов.

### **Цель и задачи исследования**

Целью исследования является изучение различных аспектов работы систем рестрикции-модификации, CRISPR-Cas и BREX методами флуоресцентной микроскопии.

Для достижения данной цели решались такие задачи, как:

1. Изучение влияния концентраций белков системы рестрикции-модификации Esp1396I в одиночных бактериальных клетках *Escherichia coli* на эффективность защиты от вируса.

2. Изучение динамики появления белков системы рестрикции-модификации Esp1396I в новой бактериальной клетке-хозяине.
3. Изучение механизмов регуляции системы рестрикции-модификации Esp1396I.
4. Изучение процесса инфекции бактериофагом T7 клеток *E. coli*, защищенных CRISPR-Cas системой методами флуоресцентной микроскопии.
5. Изучение некоторых аспектов работы системы BREX методами флуоресцентной микроскопии.

### **Научная новизна**

Изучение защитных систем бактерий ведётся уже длительное время и привело к значительному прогрессу в различных областях биологии. Так, например, открытие эндонуклеаз рестрикции привело к бурному развитию методов молекулярного клонирования. В последнее время системы CRISPR-Cas эффективно применяются для редактирования геномов различных организмов. Стоит, однако, заметить, что для применения таких систем в качестве терапевтических методов для лечения человека необходимо решить несколько принципиальных проблем.

Ранее такие системы изучались классическими микробиологическими методами, которые предусматривали усреднение параметров целых популяций клеток. Развитие же разнообразных методов флуоресцентной микроскопии и использование флуоресцентных белков позволило изучать защитные системы на уровне одиночных бактериальных клеток и оценивать влияние генетического шума на защитные функции этих систем. Например, мы показали, что даже в генетически однородной популяции клеток существуют значительные вариации в экспрессии генов системы рестрикции-модификации.

## **Теоретическая и практическая значимость**

Изучение вирусов и бактериальных механизмов защиты от них является важной задачей, имеющей как теоретическую, так и практическую значимость. Например, разнообразные вирусные ферменты, а также ферменты системы рестрикции-модификации широко используются в молекулярном клонировании, первыми отсеквенированными ДНК были ДНК вирусов, антибактериальные фаговые препараты эффективны против мультирезистентных к антибиотикам бактериальных штаммов, а с помощью систем CRISPR-Cas удаётся редактировать разнообразные живые организмы, внося направленные мутации в их геном.

## **Апробация работы**

1. Bangalore Microscopy Course 2014 Bangalore, India, 21.09.2014 - 28.09.2014 An assay for the study of Type II restriction - modification system in E.coli at the single - cell level.

2. EMBL Symposium: New Approaches and Concepts in Microbiology Heidelberg, Germany, 11.10.2015 - 14.10.2015 Study of a TypeII Restriction - Modification system at the single -cell level using fluorescence microscopy.

3. SBBI'2016 Санкт – Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, 30.06.2016 - 02.07.2016 ., Study of effect of gene expression variations on phage infection probability in E.coli cells with a type II restriction - modification system.

4. International conference ADFLIM Сочи, Дагомыс, 03.10.2016 - 06.10.2016 Study of restriction – modification system Esp1396I in E. coli at the single - cell level using fluorescence microscopy. Всероссийский симпозиум и

5. 50 - я зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии Петербургского Института Ядерной Физики НИЦ КИ Рощино, 23.02.2016 - 05.03.2016 Изучение процессов появления и накопления белков системы рестрикции - модификации II типа Esp1396I после её внесения в бактериальную клетку с использованием флуоресцентной микроскопии.

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.

### **Публикации**

1. Morozova N, Sabantsev A, Bogdanova E, Fedorova Y, Maikova A, Vedyaykin A, et al. 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. doi: 10.1093/nar/gkv1490. PubMed PMID: 26687717; PubMed Central PMCID: PMC4737168.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4737168/>)

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. doi:10.1093/nar/gkx042

3. B. Wilcox, I. Osterman, M. Serebryakova, D. Lukyanov, E. Komarova, B. Gollan, N. Morozova, Y.I. Wolf, K.S. Makarova, S. Helaine, P. Sergiev, S. Dubiley, S. Borukhov, K. Severinov. *Escherichia coli* ItaT is a type II toxin that inhibits translation by acetylating isoleucyl-tRNA<sup>Ile</sup>. // *Nucleic Acids Res*, 2018.



doi: 10.1093/nar/gky560, PMID: 29931259, (<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gky560>)

### **Представление научного доклада: основные положения**

В данной работе изучались различные аспекты работы трёх защитных систем бактерий от вирусов на уровне одиночных клеток методами флуоресцентной микроскопии.

Нами была разработана методика по длительному наблюдению за ростом живых бактерий под микроскопом, в частности разработана особая конструкция микроскопного слайда; разработан алгоритм и осуществлена калибровка для определения концентраций белков в одиночных клетках по их флуоресцентным изображениям; подобраны условия длительной съёмки и составы твёрдых питательных сред, используемых для микроскопии.

Было показано, что концентрации белков системы рестрикции-модификации Esp1396I в одиночных бактериальных клетках, а также их количества друг относительно друга влияют на степень защиты клеток от вируса.

Была исследована динамика появления белков системы рестрикции-модификации Esp1396I после попадания плазмиды, несущей гены системы, в клетку. Показано, что первой в такой клетке начинает синтезироваться метилтрансфераза, а эндонуклеаза рестрикции появляется со значительной задержкой.

В результате изучения влияния регуляторного C-белка на концентрации метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в клетках, несущих систему рестрикции-модификации Esp1396I, определена динамика синтеза этих ферментов при разных концентрациях C-белка и без него.

Исследована динамика заражения бактериофагом T7 бактерий, несущих систему CRISPR-Cas, направленную против различных участков ДНК фага, получены кривые роста/смерти клеток, заражённых вирусом в различной множественности в условиях противодействия CRISPR-Cas системой.

Показано, что динамика заражения не отличается для систем CRISPR-Cas, активных против ранних, средних или поздних генов вируса.

В процессе работы с BREX системой было показано, что она не мешает индукции бактериофага  $\lambda$ , находящегося в лизогенном состоянии в геноме бактерии, и что индуцированный вирус становится устойчивым защитному действию системы BREX.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Введение

Бактериофаги являются самыми распространёнными биологическими объектами на Земле: их популяция оценивается на уровне около  $10^{31}$  вирусных частиц [1]. Такие вирусы способны эффективно заражать бактериальные клетки, размножаясь в них. Однако в процессе эволюции бактерии выработали большое количество разнообразных систем защиты от бактериофагов. Таким образом непрерывно происходит “гонка вооружений”, позволяющая бактериофагам обходить противовирусную защиту бактерий, а бактериям эффективнее защищаться от заражения.

Бактериофаги имеют достаточно простую организацию и состоят из молекулы ДНК (или РНК), упакованной в белковую оболочку, как правило, состоящую из многогранника-капсида, хвоста и фибрилл [2].

Цикл размножения вируса в бактериальной клетке имеет несколько этапов, первым из которых является адсорбция к бактерии. Вирус распознаёт бактериальную клетку благодаря определённым рецепторам на её поверхности, таким как различные белки, липиды, сахара, пили и другие [3]. После адсорбции следует этап инъекции генетического материала в бактерию. Механизмы инъекции могут быть различными [4, 5].

Далее в клетке происходит размножение вируса, после чего следует её лизис. Однако существует также состояние, при котором вирусная ДНК

встраивается в ДНК клетки-хозяина и размножается вместе с ней. Такое состояние называется лизогенией, а бактериофаг, находящийся в нём, профагом. Как правило, при изменении параметров окружающей среды бактериофаг может выходить из лизогенного состояния, размножаться и лизировать клетку.

Лизис клетки осуществляется за счёт эндолизина, разрушающего клеточную стенку, и холина, делающего мембрану проницаемой для эндолизина [6].

После открытия бактериофагов в начале XX века [7] были попытки их использования в качестве антибактериальных агентов, однако с появлением антибиотиков исследования в этой области практически прекратились. В данный момент появляется большое количество мультирезистентных бактериальных штаммов, и бактериофаги снова рассматриваются в качестве агентов для борьбы с ними [8].

Сопrotивляясь вирусной инфекции, бактерии приобрели множество защитных механизмов, направленных на различные этапы развития бактериофага в клетках [9]. Можно выделить такие из них, как модификация рецепторов, abortивные системы защиты, системы рестрикции-модификации, CRISPR-Cas и BREX системы.

Таким образом, в природе существует большое количество противовирусных защитных систем бактерий, которые могут препятствовать эффективному терапевтическому применению бактериофагов. Защитные системы сами по себе представляют большой научный интерес, и их изучение уже подарило миру множество ферментов и методов, широко используемых в микробиологии, а дальнейшее доскональное изучение этих систем представляется чрезвычайно важной и актуальной задачей.

## **Объекты, (предмет) и методы исследования**

### **Система рестрикции-модификации Esp1396I**

Первая часть данной работы посвящена изучению системы рестрикции-модификации Esp1396I на уровне одиночных бактериальных клеток.

Системы рестрикции-модификации играют важную роль в эволюционной биологии бактерий и представляют собой набор ферментов, обеспечивающих защиту клетки от чужеродной ДНК. Работа систем рестрикции-модификации основана на активности двух ферментов: метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции. Ферментативная активность эндонуклеазы рестрикции заключается во внесении двунитового разрыва в определённых сайтах узнавания ДНК. Метилтрансфераза осуществляет метилирование оснований в этом же сайте узнавания, что предотвращает его деградацию эндонуклеазой рестрикции. Таким образом, ДНК клетки, несущей систему рестрикции-модификации, обычно оказывается метилирована и тем самым защищена от воздействия эндонуклеазы рестрикции, а чужеродная неметилированная ДНК, попадая в клетку, подвергается деградации эндонуклеазой рестрикции.

Несмотря на достаточно высокую эффективность, системы рестрикции-модификации не способны обеспечить бактериям абсолютную защиту от бактериофага. Небольшая доля вирусов подвергается метилированию быстрее, чем деградации, в результате чего появляется устойчивое к действию системы рестрикции-модификации потомство. Методами математического моделирования было показано, что преодоление защиты системы рестрикции-модификации некоторыми вирусами может быть связано либо со стохастичностью процесса рестрикции/метилирования ДНК бактериофага при относительно постоянных концентрациях метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в клетках, либо с высоким относительным количеством метилтрансферазы в отдельных бактериях вследствие вариации экспрессии генов системы рестрикции-модификации в одиночных клетках.

В данной работе в качестве объекта исследования была выбрана система рестрикции-модификации II типа Esp1396I, ферменты которой узнают палиндромные последовательности 5' – CCA(N)<sub>5</sub>TGG – 3'. Система состоит из трех генов, кодирующих метилтрансферазу, эндонуклеазу рестрикции и

регуляторный С-белок. Для визуализации эндонуклеазы рестрикции и метилтрансферазы в клетках бактерий при помощи флуоресцентной микроскопии были созданы плазмиды, несущие гены системы рестрикции-модификации Esp1396I, слитые с флуоресцентными белками mCherry и Venus соответственно.

Интенсивность флуоресценции одиночных бактерий, наблюдаемая при помощи флуоресцентного микроскопа, пропорциональна количеству молекул флуоресцентных белков в клетках, которое в свою очередь пропорционально количеству метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции. Таким образом, уровень флуоресценции изображений бактерий можно сопоставить с относительными количествами белков системы рестрикции-модификации в них. Однако для определения абсолютных количеств этих ферментов в клетках необходимо определить средний флуоресцентный сигнал, приходящийся на одну молекулу красителя. Для этого была проведена процедура калибровки, состоявшая из нескольких этапов, предполагавших клонирование генетических конструкций, содержащих гены mCherry и Venus под индуцируемыми промоторами; наработку и выделение флуоресцентных белков mCherry и Venus, измерение их концентрации; измерение флуоресценции известных концентраций mCherry и Venus на спектрофлуориметре с целью определить примерную интенсивность флуоресценции одной молекулы белка; разработку методики точного измерения концентрации клеток в объёме с помощью световой микроскопии; измерение флуоресценции mCherry и Venus в клетках точно измеренной концентрации с целью определения среднего количества молекул флуоресцентного белка в клетке; получение флуоресцентных изображений этих же клеток, их обработка и оценка интенсивности флуоресценции одной молекулы белка.

Далее методами флуоресцентной микроскопии на уровне одиночных бактериальных клеток изучались различные аспекты работы системы рестрикции-модификации Esp1396I.

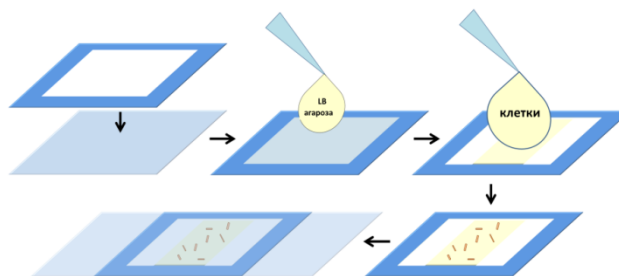
Одной из целей данной работы являлось изучение влияния относительных концентраций метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в клетках на степень их защиты от вируса. Для этого система была помещена на три плазмиды (pUC19, pBR322, pSC101), имеющие различную копияность, после чего была произведена оценка уровня защиты клеток, несущих такие плазмиды, и были измерены концентрации белков системы рестрикции-модификации в них.

Кроме того, были созданы генетические конструкции, несущие ген метилтрансферазы или эндонуклеазы рестрикции под индуцируемыми промоторами. Для оценки влияния сдвига взаимного отношения концентраций метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции на эффективность защиты от бактериофага, такие плазмиды помещались в клетки, несущие также систему рестрикции-модификации Esp1396I, находящуюся на плазмиде pBR322. Далее производилась дополнительная индукция одного из ферментов системы Esp1396I и оценивался сдвиг отношения метилтрансферазы к эндонуклеазе рестрикции в одиночных бактериальных клетках, кроме того оценивалось изменение эффективности защиты системы.

Другой целью работы было изучение кинетики появления метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в одиночной клетке после введения в неё плазмидной ДНК, кодирующей систему рестрикции-модификации Esp1396I.

В процессе экспериментальной работы был проведён ряд экспериментов, предполагающих осуществление процесса трансформации бактерий непосредственно под микроскопом.

Нами была разработана особая конструкция камеры, в которой обеспечивается фиксация покровного стекла относительно микроскопного столика, благодаря чему смещение фокуса по оси  $Z$  минимально, что делает камеру удобной для длительного наблюдения за бактериальными клетками (рисунок 1).



**Рисунок 1** Процесс изготовления камеры для роста бактерий под микроскопом

В процессе трансформации производилась автофокусировка и съёмка длительностью более 12 часов. Одновременно наблюдались 30 полей зрения бактерий в проходящем свете и двух флуоресцентных каналах Venus (метилтрансферазы) и mCherry (флуоресценция эндонуклеазы рестрикции). За это время в успешно трансформированных клетках появлялись белки системы рестрикции-модификации.

Для данного процесса также было выполнено математическое моделирование. Построение модели основывалось на знаниях о регуляции транскрипции в данной системе С-белком и динамике экспрессии белков в эксперименте. Она представляет собой связь термодинамической модели, принимающей во внимание активацию и репрессию генов Р-М системы С-белком, посредством вычисления вероятностей релевантных конфигураций промотора, с кинетической моделью, рассматривающей транскрипцию и экспрессию белков Р-М системы. Кроме того, в модели учитывается

полученная экспериментально скорость деления клеток, которая отражает процесс накопления и “разбавление” транскриптов и белков.

Ещё одной важной задачей было изучение роли С-белка в регуляции данной системы и его влияния на концентрации эндонуклеазы рестрикции и метилтрансферазы в клетках, а также на динамику их появления в новой хозяйской клетке. Для решения этой задачи была создана генетическая конструкция, несущая систему рестрикции-модификации Esp1396I без регуляторного С-белка (pUC-MV), и конструкция, необходимая для осуществления регулируемой экспрессии в клетках и несущая ген С-белка под контролем индуцируемого промотора (pC).

### **Исследование методом флуоресцентной микроскопии процесса инфекции бактериофагом T7 клеток с системой CRISPR-Cas**

Открытые в конце XX века системы CRISPR-Cas могут распознавать и деградировать вирусную ДНК и состоят из CRISPR-кассет, представляющих собой небольшие участки ДНК бактериофагов, разделённых одинаковыми повторами, и Cas-генов, кодирующих белки Cas, отвечающие за процессинг CRISPR РНК, деградацию ДНК-мишени, встраивание новых спейсеров в CRISPR-кассету.

В рамках данной работы изучалась динамика инфекции бактериофагом T7 клеток *E. coli* с включенной и выключенной системой CRISPR-Cas типа I-E против ранних, средних или поздних генов бактериофага. Для визуализации актов бактериальной смерти использовался красный флуоресцентный краситель йодид пропидия.

### **Изучение системы BREX методом флуоресцентной микроскопии**

В начале 1980-х годов была открыта ещё одна система бактериального иммунитета - Pgl. Однако механизм её действия до сих пор остаётся плохо изученным. Было показано, что система состоит из четырёх генов: PglW(предсказана функция протеинкиназы), PglX (аденин-специфичная



метилтрансфераза), PglZ (щелочная фосфатаза), а PglY (предположительно имеет мотивы связывания и гидролиза АТФ/ГТФ).

Анализ большого количества бактериальных геномов выявил встречаемость генов, гомологичных генам Pgl системы, примерно в 10% всех секвенированных геномов бактерий. В 2014 году была открыта ещё одна система из *Bacillus cereus*, названная BREX и состоящая из Pgl-подобных и ещё двух дополнительных генов. Данная система обеспечивают устойчивость к большому набору бактериофагов. Все системы BREX можно разделить на шесть групп по составу генов и порядку их расположения.

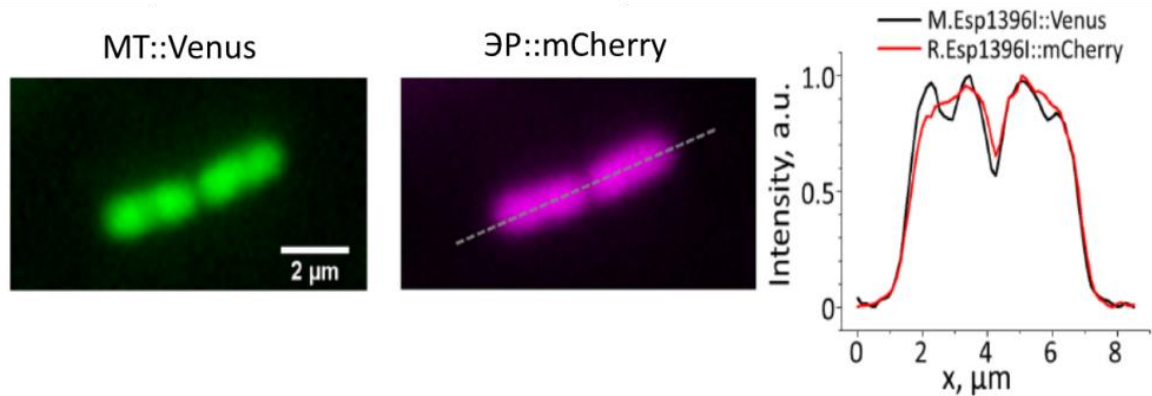
В настоящей работе с помощью флуоресцентной микроскопии изучалась система BREX из *Escherichia coli*. Были проделаны опыты по изучению процесса индукции профага  $\lambda$  из клеток с BREX системой и без неё.

## **Результаты и их обсуждение**

### **Система рестрикции-модификации Esp1396I**

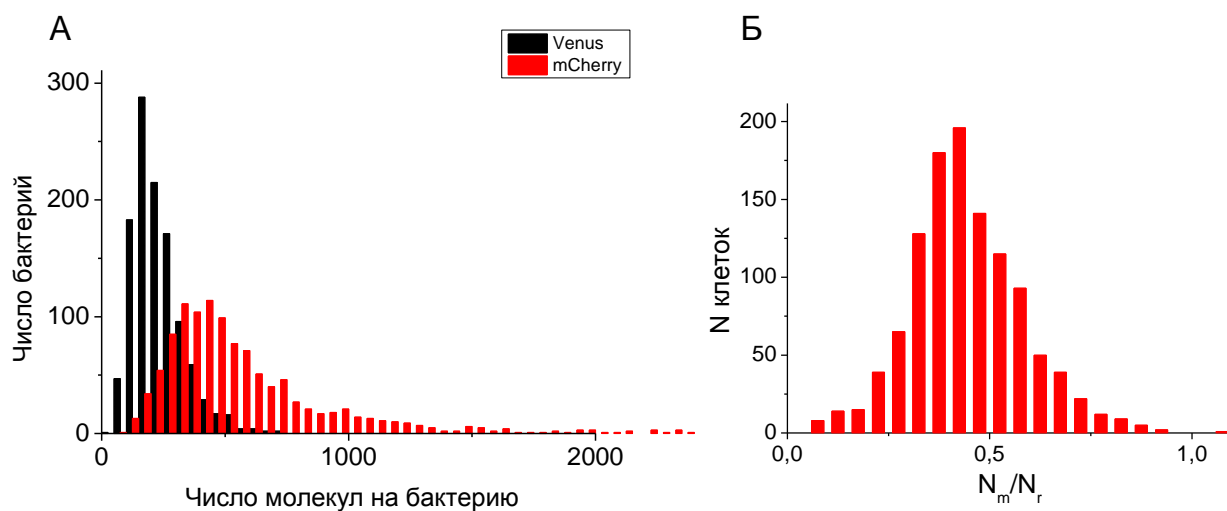
После калибровки и анализа изображений бактерий, содержащих флуоресцентно-меченные метилтрансферазу и эндонуклеазу рестрикции на плазмиде pUC19, были измерены средние количества этих белков в клетке, которые составили ~13000 молекул ~25000 молекул для метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции, соответственно. Также было показано, что существует сильная корреляция ( $r=0.67$ ) между количествами метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в клетке.

Кроме того было обнаружено, что характер локализации метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в клетке различается (рисунок 2). Метилтрансфераза связана с ДНК, в то время как эндонуклеаза рестрикции распределена в клетке относительно равномерно.



**Рисунок 2.** Распределение метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в клетке

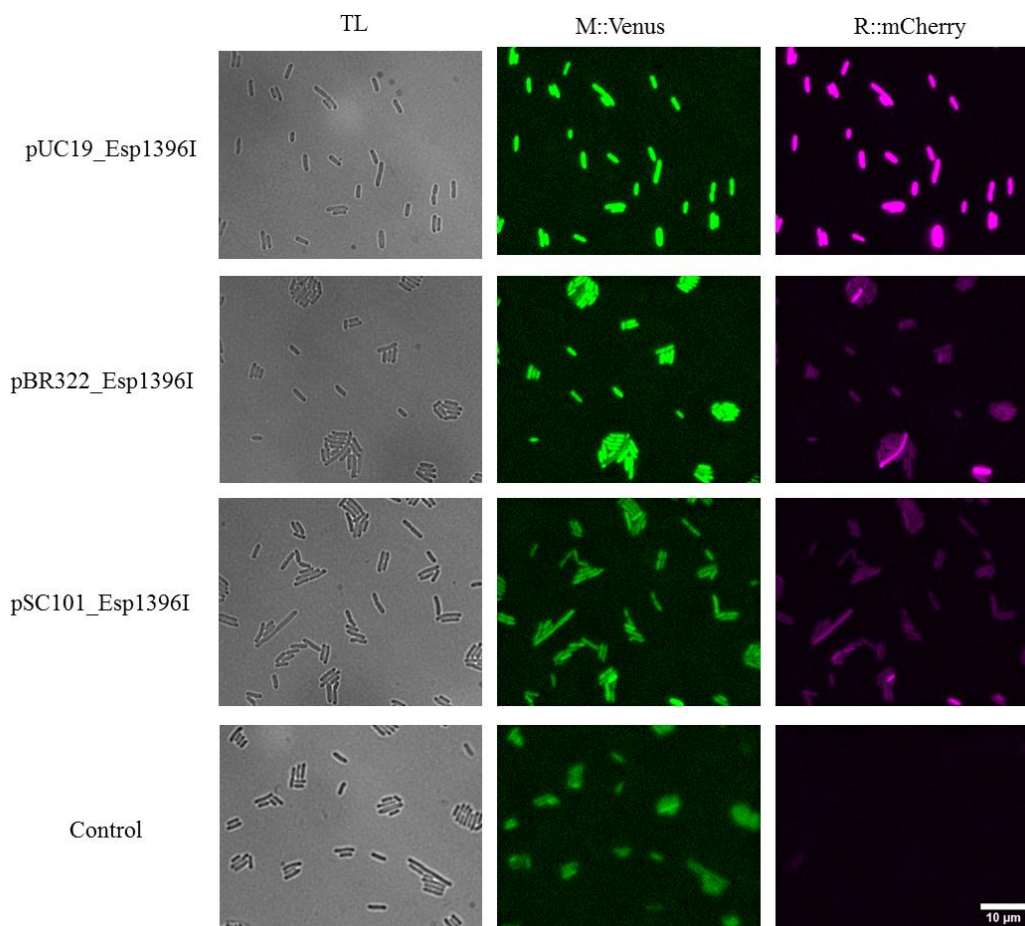
Также в результате анализа флуоресцентных изображений были получены распределения (рисунок 3) бактерий *E. coli*, несущих плазмиду pUC19\_Esp1396I, по количествам и соотношению метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции.



**Рисунок 3 А.** Распределение числа молекул метилтрансферазы (Venus) и эндонуклеазы рестрикции (mCherry) в бактериях *E. coli*; Б. Распределение числа бактериальных клеток по соотношению ферментов метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции

Полученные данные свидетельствуют о том, что количества метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в популяции бактерий, несущих систему рестрикции-модификации Esp1396I, варьируются в широких пределах, также как и соотношение этих ферментов. При этом уровень эндонуклеазы рестрикции демонстрирует более высокую вариабельность.

Кроме того, система рестрикции-модификации Esp1396I была помещена на три плазмиды pUC19, pBR322, pSC101, имеющие высокую, среднюю и низкую копийность соответственно. Было показано, что чем выше копийность плазмиды, тем больше белков системы рестрикции-модификации в клетке и лучше защита от вируса (рисунок 4). Также было показано, что отношение ферментов метилтрансферазы к эндонуклеазе рестрикции в клетках с разными плазмидами изменяется. Так, для клеток, в которых защитная система находится на высококопийной плазмиде, это отношение является наименьшим, а для низкокопийной - наибольшим. Данное наблюдение свидетельствует в пользу важности соотношений белков системы рестрикции-модификации в клетках для эффективной защиты от вируса.

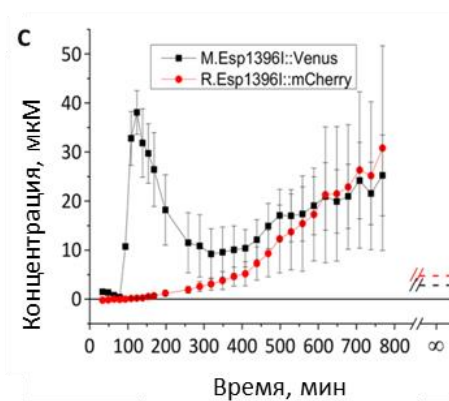
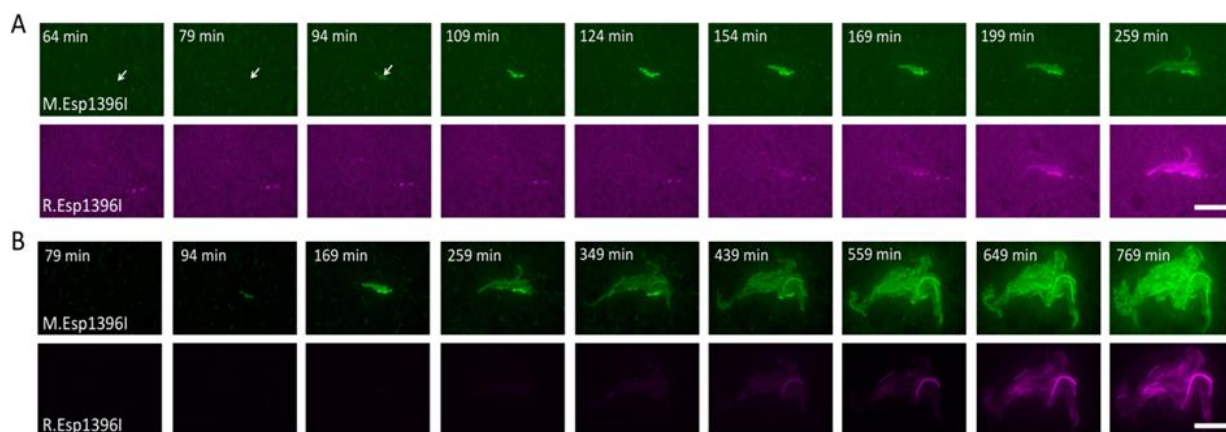


**Рисунок 4.** Изображения клеток *E. coli*, несущих систему рестрикции-модификации Esp1396I на плаزمидах высокой (pUC19\_Esp1396I), средней (pBR322\_Esp1396I), низкой (pSC101\_Esp1396I) копийности, а также контрольные клетки (control) без флуоресцентных белков (во флуоресцентном канале Venus наблюдается автофлуоресценция бактерий). TL – изображение в проходящем свете, M::Venus (зелёным) – канал флуоресценции белка Venus, R::mCherry (фиолетовым) – канал флуоресценции белка mCherry

Чтобы полнее понять роль отношения ферментов системы рестрикции-модификации в противовирусной защите нами были созданы плазмиды, содержащие отдельно эндонуклеазу рестрикции и метилтрансферазу под индуцируемыми промоторами. Дополнительная индукция эндонуклеазы рестрикции в клетках *E. coli* с системой рестрикции-модификации,

находящейся на плазмиде pBR322, увеличила противовирусную защиту на 1.5 порядка, в то время как дополнительная индукция метилтрансферазы напротив уменьшила уровень защиты на 1.5—2 порядка.

На следующем этапе работы были проведены эксперименты по изучению кинетики появления метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в одиночной клетке после введения в неё плазмидной ДНК, кодирующей систему рестрикции-модификации Esp1396I (см. рисунок 5). В процессе работы нам удалось экспериментально обнаружить задержку между появлениями метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции после трансформации индивидуальных клеток *E. coli* плазмидной ДНК, несущей флуоресцентно-меченную систему рестрикции-модификации, тем самым напрямую подтвердив теоретические предсказания и эксперименты, проведённые другими методами на популяциях бактерий.



**Рисунок 5** Динамика появления и накопления метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в отдельных трансформированных клетках *E.*

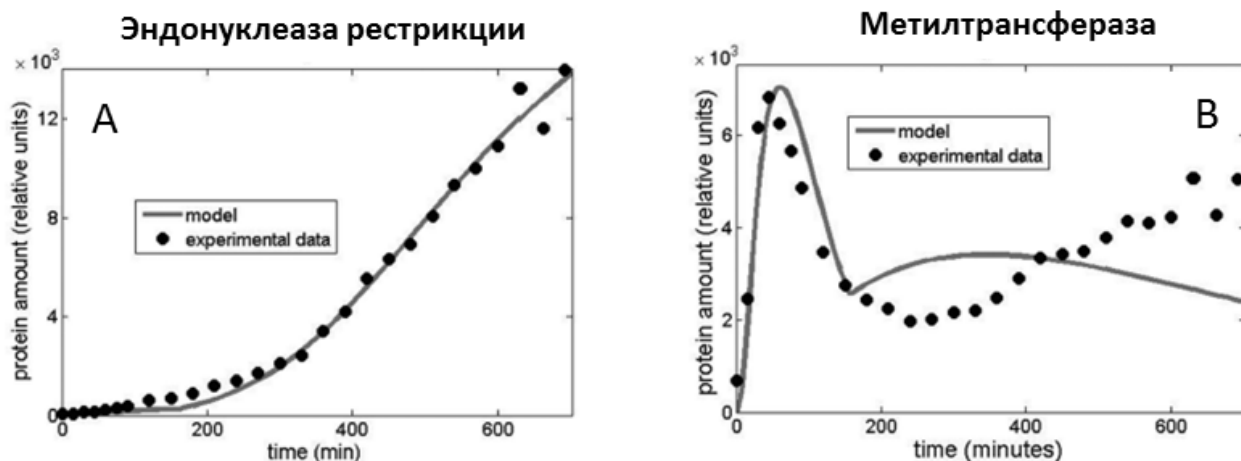
*coli*; **A, B.** Серии изображений, иллюстрирующие динамику накопления метилтрансферазы (обозначена зелёным) и эндонуклеазы рестрикции (обозначена фиолетовым) на разных временных точках после трансформации; **C.** Зависимости средней концентрации метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в клетках от времени. Пунктирной линией на графике указаны концентрации метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в стабильно трансформированных клетках

Таким образом, из серии экспериментов было получено, что свечение метилтрансферазы появляется тогда, когда трансформированная клетка ещё не успела поделиться или поделилась один раз. При этом задержка в появлении эндонуклеазы рестрикции относительно метилтрансферазы составляет 30-60 минут.

Также для данного процесса было выполнено математическое моделирование. Экспериментальные данные о регуляции транскрипции в рассматриваемой системе рестрикции-модификации дают следующую информацию: промоторы оперона С-белок-эндонуклеаза рестрикции и гена метилтрансферазы имеют по одному сайту связывания РНК-полимеразы (РНКП). При этом промотор С-белка и эндонуклеазы рестрикции имеет два сайта связывания димера С-белка. Связывание С-белка с дистальным сайтом приводит к активации, а связывание с обоими сайтами - к репрессии транскрипции. Промотор метилтрансферазы имеет всего один сайт связывания, с которым может связываться димер С-белка, тем самым это приводит к репрессии транскрипции метилтрансферазы.

Термодинамическая модель регуляции транскрипции С-эндонуклеазы рестрикции и метилтрансферазы основывается на классической модели Шеа-Акерса. А именно, транскрипционная активность промотора пропорциональна отношению вероятностей активных конфигураций, при которых РНКП связывается с промотором.

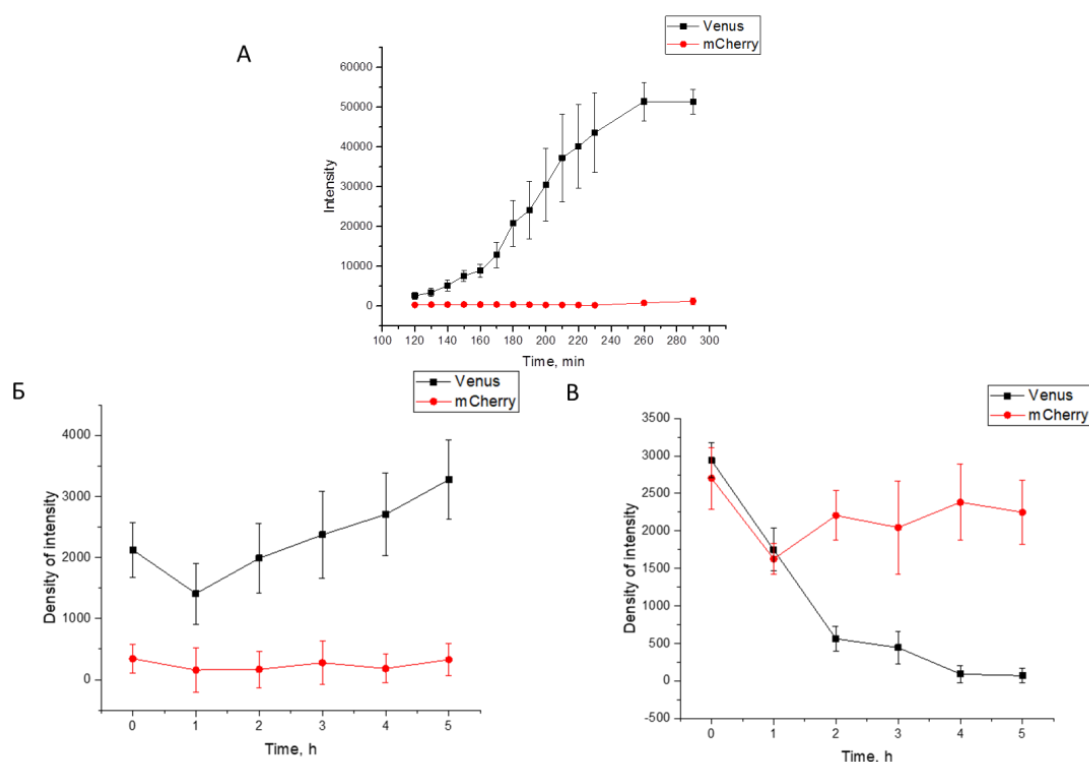
Построенная для эндонуклеазы рестрикции модель имеет хорошее качественное и количественное согласование с экспериментальными данными (рисунок 6А). Моделирование процесса появления и накопления метилтрансферазы (рисунок 6В) хорошо согласуется с экспериментальными данными только в первые ~160 минут.



**Рисунок 6** Динамическое моделирование накопления белков системы рестрикции-модификации Esp1396I в одиночных клетках. **А.** Сравнение экспериментальных данных с моделированием динамики экспрессии эндонуклеазы рестрикции. **В.** Сравнение экспериментальных данных с моделированием динамики экспрессии метилтрансферазы

Ещё одной важной задачей было изучение роли С-белка в регуляции данной системы и его влияния на концентрации эндонуклеазы и метилтрансферазы в клетках, а также на динамику их появления в новой хозяйской клетке. Для решения этой задачи была создана генетическая конструкция, несущая систему рестрикции-модификации Esp1396I без регуляторного С-белка (pUC-MV) и конструкция, кодирующая С-белок под индуцируемым промотором (pC) для его дополнительной регулируемой экспрессии в клетках.

Было показано, что при попадании в клетку системы рестрикции-модификации без С-белка происходит экспрессия только метилтрансферазы, так как этот ген имеет сильный промотор, а с более слабого промотора эндонуклеазы рестрикции экспрессия практически не наблюдается (рисунок 7А). Также было показано, что при включении экспрессии С-белка изменяется концентрация ферментов системы рестрикции-модификации (рисунок 7Б-В). Данный эффект можно использовать в дальнейшем для изучения эффективности заражения клеток с различным соотношением ферментов системы рестрикции-модификации, а также для оценки концентрации С-белка в клетках, необходимого для достижения определённого уровня метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в них.



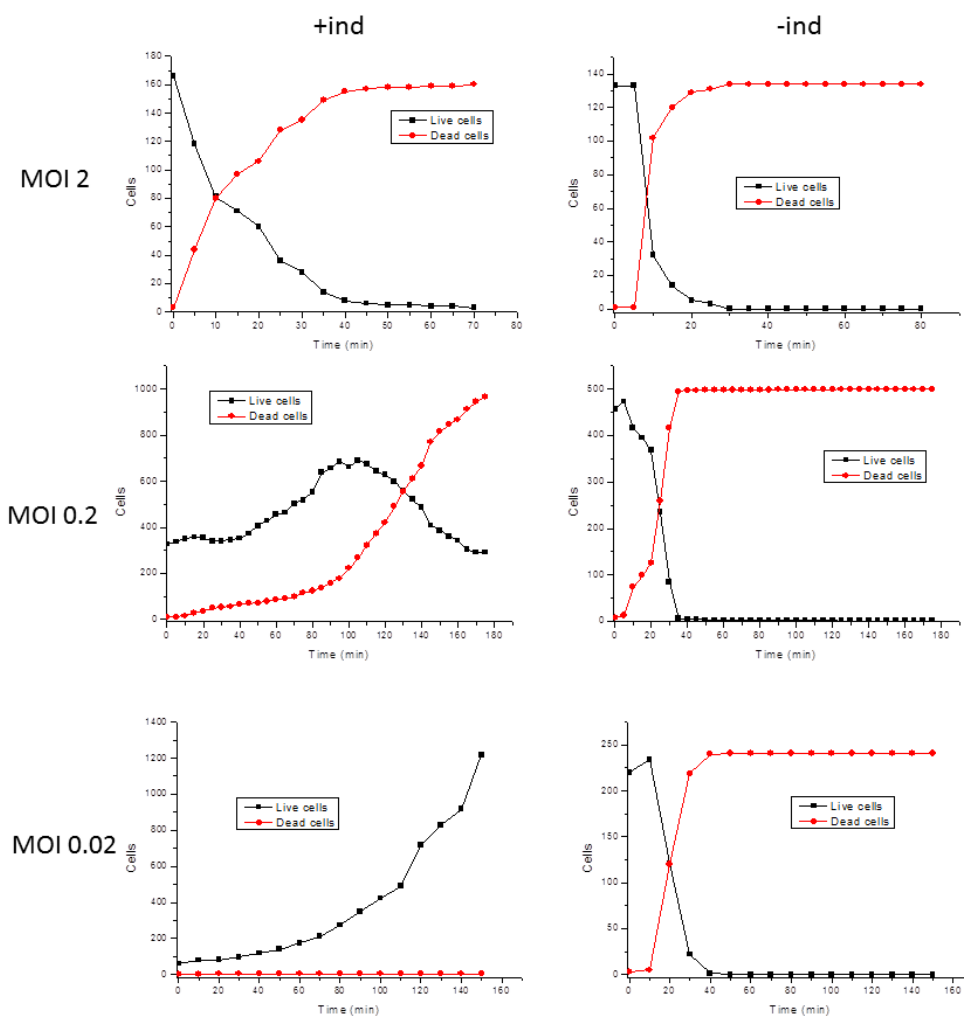
**Рисунок 7. А.** Экспрессия белков системы рестрикции-модификации с новой хозяйской в случае отсутствия С-белка. **Б.** Концентрации метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в экспоненциальной фазе роста культуры в случае отсутствия С-белка. **В.** Изменение концентраций



метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции после начала экспрессии С-белка

### **Исследование методом флуоресцентной микроскопии процесса инфекции бактериофагом Т7 клеток с CRISPR-Cas системой**

В процессе изучения динамики инфекции бактериофагом Т7 клеток *E. coli* с включенной и выключенной CRISPR-Cas системой было показано, что при малых множественностях инфекции ( $MOI=0.02$ ) бактериальные клетки с индуцированной системой CRISPR-Cas типа I-E ведут себя практически как неинфицированные. При  $MOI=0.2$  вирусная инфекция значительно замедляется по сравнению с контрольными клетками без индукции CRISPR-Cas системы. Однако при  $MOI=2$  вирусная инфекция развивается одинаково эффективно как в клетках с индуцированной, так и с не индуцированной CRISPR-Cas системой, что говорит о преодолении защиты при высоких множественностях инфекции (рисунок 8).



**Рисунок 8.** Динамика инфекции T7 вирусом клеток *E. coli* с индуцированной (слева) и не индуцированной (справа) системой CRISPR-Cas при разных множественностях инфекции

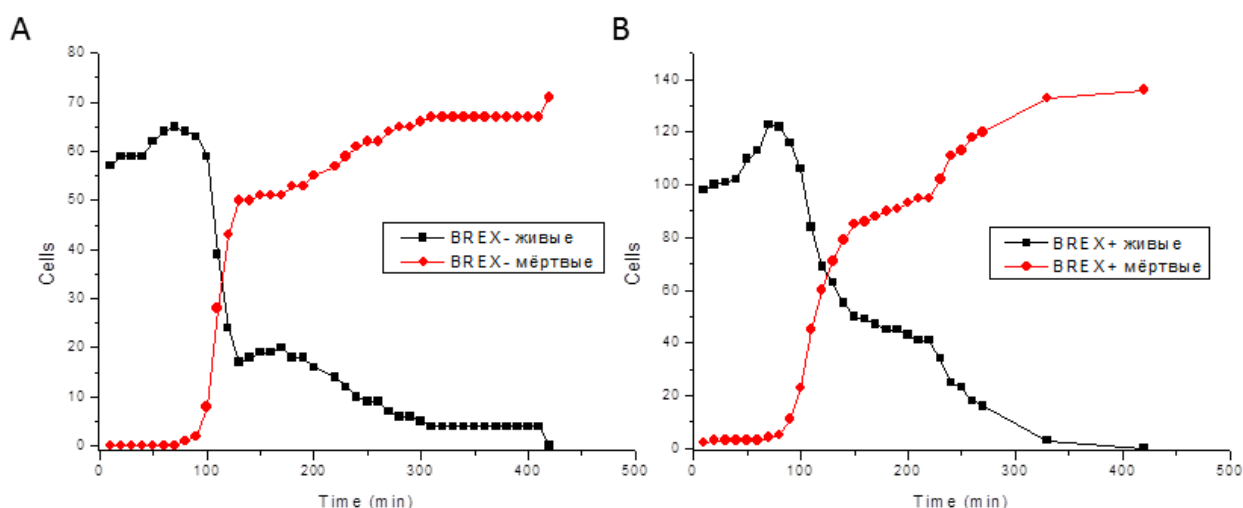
Для множественности инфекции MOI=0.2 имеет место сложная зависимость, включающая в себя случаи смерти и роста бактерий, кроме того наблюдается замедление в скорости деления бактерий, что, по-видимому, можно объяснить тратой некоторых ресурсов клетки на преодоление инфекции.

Также нами было показано, что исследуемая система CRISPR-Cas защищает клетки одинаково эффективно, вне зависимости от того, спейсер к

каким генам вируса T7 (ранним, средними или поздним) присутствует в CRISPR-кассете.

### Изучение системы BREX методом флуоресцентной микроскопии

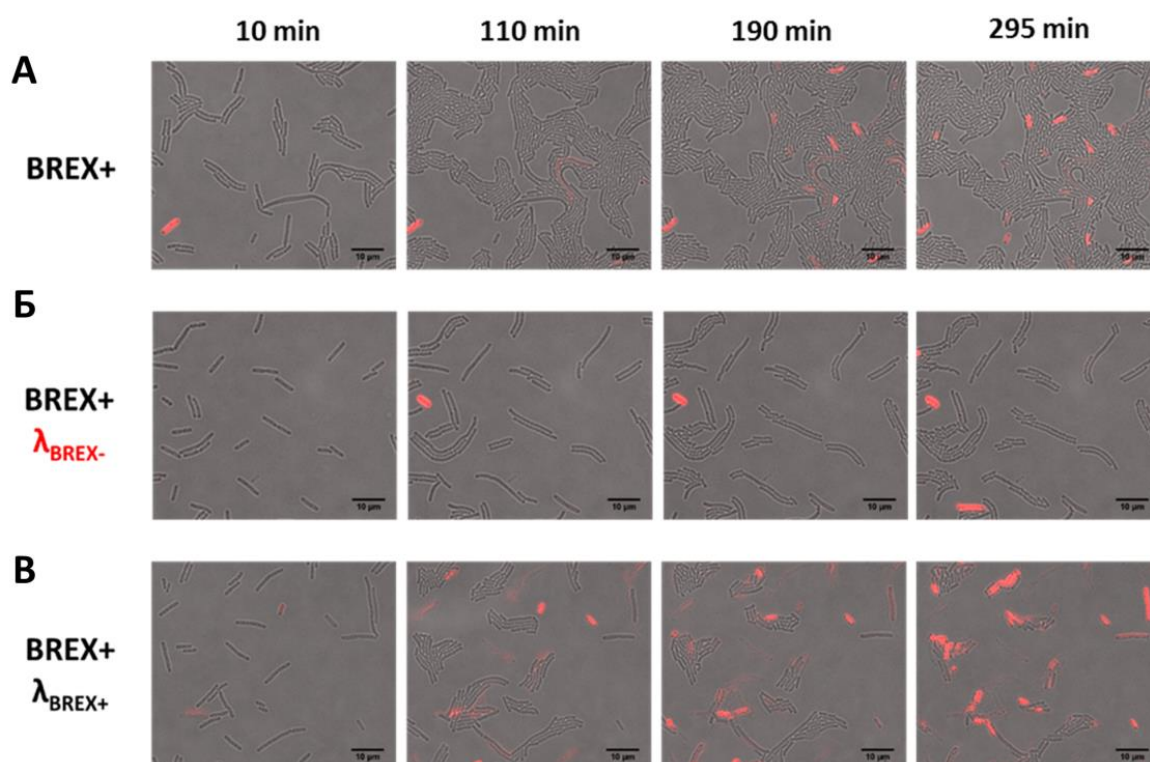
С помощью флуоресцентной микроскопии было показано, что BREX не влияет на адсорбцию вируса к клетке. Кроме того, было показано, что она не мешает индукции бактериофага  $\lambda$  из клеток с системой BREX. На рисунке 9 представлена динамика индукции бактериофага  $\lambda$ , находящегося в лизогенном состоянии, из клеток без/с системой BREX. Видно, что вирус индуцируется одинаково эффективно как из клеток без BREX системы, так и из клеток с ней.



**Рисунок 9.** Динамика индукции бактериофага  $\lambda$  из **A** клеток без BREX системы и **B** клеток с BREX системой

Также была получена динамика заражения бактериальных клеток с системой BREX бактериофагом  $\lambda$  (рисунок 10) вышедшем из клеток с/без системы BREX из которой видно, что в клетках, заражённых бактериофагом, вышедшим из клеток без системы BREX (рисунок 10Б), практически не наблюдается лизиса в сравнении с контролем (рисунок 10А). Если же клетки

заражались бактериофагом, вышедшим из BREX клеток, наблюдается заметный лизис культуры (рисунок 10В). Оказалось, что бактериофаг, индуцированный из клеток с системой BREX, приобретает модификацию по GGTAAG сайтам, которые также являются модифицированными в геноме клеток с BREX системой, а потомство такого бактериофага становится устойчивым к её действию.



**Рисунок 10.** Динамика заражения клеток с системой BREX. А. Клетки без вируса. Б. Клетки с BREX- вирусом. В. Клетки с BREX+ вирусом.

Красным показаны мёртвые клетки

### Заключение

В данной работе изучались различные аспекты действия трёх защитных систем бактерий от вирусов на уровне одиночных клеток методами флуоресцентной микроскопии. Нами была разработана методика по длительному наблюдению за ростом живых бактерий под микроскопом.

Использование данного метода позволило проследить за динамикой синтеза белков системы рестрикции-модификации (РМ) в одиночных клетках после её попадания в них, а также напрямую увидеть регуляторную роль С-белка и его влияние на экспрессию белков эндонуклеазы рестрикции и метилтрансферазы. Кроме того удалось охарактеризовать изменение концентраций белков системы РМ и их отношения в случаях, когда система РМ находится на высококопийной, среднекопийной и низкокопийной плазмидах.

Была охарактеризована динамика заражения одиночных клеток бактериофагом Т7 в условиях противодействия системой CRISPR-Cas типа I-E при разной множественности инфекции. Было показано, что наличие в системе CRISPR-Cas спейсеров к ранним, средним или поздним генам Т7 бактериофага не влияют на эффективность её защиты.

Также с помощью данного метода удалось изучить некоторые аспекты работы системы BREX из *Escherichia coli*. Было показано, что данная система не влияет на адсорбцию бактериофага  $\lambda$ , не влияет на индукцию вируса из клеток, если вирус встроился в клеточный геном до попадания в них системы BREX, а также может модифицировать вирус, делая его устойчивым к защите.

### **Список использованной литературы**

1. W.B. Whitman, D.C. Coleman, W.J. Wiebe. Prokaryotes: the unseen majority. // Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(12): p. 6578-83.
2. J.R. Clark, J.B. March. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. // Trends Biotechnol, 2006. 24(5): p. 212-8.
3. S. Chaturongakul, P. Ounjai. Phage-host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. // Front Microbiol, 2014. 5: p. 442.

4. L.R. Garcia, I.J. Molineux. Rate of translocation of bacteriophage T7 DNA across the membranes of *Escherichia coli*. // *J Bacteriol*, 1995. 177(14): p. 4066-76.
5. Y.T. Lanni. First-step-transfer deoxyribonucleic acid of bacteriophage T5. // *Bacteriol Rev*, 1968. 32(3): p. 227-42.
6. I.N. Wang, D.L. Smith, R. Young. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. // *Annu Rev Microbiol*, 2000. 54: p. 799-825.
7. F.W. Twort. An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. // *Lancet*, 1915. 2: p. 1241–1243.
8. A. Sulakvelidze, Z. Alavidze, J.G. Morris, Jr. Bacteriophage therapy. // *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. 45(3): p. 649-59.
9. S. van Houte, A. Buckling, E.R. Westra. Evolutionary Ecology of Prokaryotic Immune Mechanisms. // *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016. 80(3): p. 745-63.

**Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации)**

**Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК**

1. Morozova N, Sabantsev A, Bogdanova E, Fedorova Y, Maikova A, Vedyaykin A, et al. 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. doi: 10.1093/nar/gkv1490. PubMed PMID: 26687717; PubMed Central PMCID: PMC4737168.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4737168/>)

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. doi:10.1093/nar/gkx042

3. B. Wilcox, I. Osterman, M. Serebryakova, D. Lukyanov, E. Komarova, B. Gollan, N. Morozova, Y.I. Wolf, K.S. Makarova, S. Helaine, P. Sergiev, S. Dubiley, S. Borukhov, K. Severinov. *Escherichia coli* ItaT is a type II toxin that inhibits translation by acetylating isoleucyl-tRNA<sup>Ile</sup>. // *Nucleic Acids Res*, 2018. doi: 10.1093/nar/gky560, PMID: 29931259, (<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gky560>)

### **Публикации в других изданиях**

**нет**

**Аспирант** \_\_\_\_\_ **Морозова Наталия Евгеньевна**  
**(подпись)**