

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра
Великого»

На правах рукописи

Морозова Наталия Евгеньевна

**Молекулярные механизмы систем защиты *Escherichia coli* от
бактериофагов**

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н. Северинов Константин Викторович

Санкт-Петербург

2018 год

Оглавление

Глава 1. Введение	5
1.1 Актуальность проблемы.....	5
1.2 Цели и задачи	6
1.3 Научная новизна и практическая ценность работы	7
1.4 Финансовая поддержка	8
1.5 Положения, выносимые на защиту	8
1.6 Публикации и апробация работы	9
1.7 Структура и объём работы.....	9
Глава 2. Обзор литературы.....	9
2.1 Бактериофаги.....	9
2.2 Защитные системы бактерий	22
2.2.1 Модификация рецепторов.....	23
2.2.2 Блокирование суперинфекции.....	24
2.2.3 Абортивные системы защиты от вируса	24
2.2.4 Системы рестрикции-модификации.....	25
2.2.4.1 Системы рестрикции-модификации I-го типа	27
2.2.4.2 Системы рестрикции-модификации II-го типа.....	28
2.2.4.3 Регуляция систем рестрикции-модификации II-го типа.....	33
2.2.4.4 Система рестрикции-модификации II-го типа Esp1396I	34
2.2.4.5 Системы рестрикции-модификации III-го типа.....	35
2.2.4.6 Системы рестрикции-модификации IV-го типа	36
2.2.5 CRISPR-Cas системы	36
2.2.6 Системы BREX.....	43
2.3 Флуоресцентные красители	45
2.3.1 Явление флуоресценции.....	46
2.3.2 Синтетические органические красители	48
2.3.3 Флуоресцентные белки.....	50
Глава 3. Материалы и методы.....	54
3.1. Изучение динамики возникновения белков рестрикции-модификации Esp1396I в новой хозяйской клетке.....	54

3.1.1. Бактериальные штаммы и плазмиды	55
3.1.2. Проверка эффективности противовирусной защиты	56
3.1.3. Проверка стабильности белков слияния в клетках	56
3.1.4. Флуоресцентная микроскопия	57
3.1.5. Калибровка интенсивности флуоресценции по отношению к количеству белка в клетках	57
3.1.6. Наблюдение за трансформацией клеток <i>E. coli</i> флуоресцентно- меченной СРМ Esp1396I	59
3.1.7. Анализ изображений	60
3.2. Изучение влияния копийности плазмиды, несущей СРМ Esp1396I, на эффективность защиты от вируса	60
3.2.1. Бактериальные штаммы и плазмиды	61
3.2.2. Определение копийности плазмид, несущих флуоресцентно- меченную СРМ Esp1396I	61
3.2.3. Оценка эффективности противовирусной защиты СРМ, находящейся на плазмидах различной копийности.	62
3.2.4. Проверка метилирования бактериофага, преодолевшего защиту СРМ	62
3.2.6. Определение концентраций МТ и ЭР характерных для одиночных клеток, несущих СРМ на плазмидах различной копийности	62
3.3. Искусственное изменение отношения концентраций МТ/ЭР в клетках и его влияние на защиту от вируса	63
3.3.1. Бактериальные штаммы и плазмиды	63
3.3.2. Проверка полученных конструкций; индукция МТ иили ЭР в клетках <i>E. coli</i> DH5α	64
3.3.3. Индукция ферментов МТ или ЭР в дополнение к присутствующей в клетках СРМ	64
3.4. Роль С-белка в регуляции СРМ Esp1396I	65
3.4.1. Бактериальные штаммы и плазмиды	65
3.4.2. Проверка регуляторной роли С-белка в процессе появления СРМ Esp1396I в новой бактериальной клетке	65
3.4.3. Влияние концентрации С-белка на концентрации МТ и ЭР в клетках с СРМ Esp1396I	66

3.5. Наблюдение за процессом инфекции бактериофагом T7 клеток с CRISPR-Cas системой.....	67
3.6. Изучение некоторых механизмов работы BREX системы	68
3.6.1. Индукция профага λ из BREX- и BREX+ клеток	68
3.6.2. Наблюдение за инфекцией BREX- и BREX+ клеток бактериофагом λ вышедшим из BREX- или BREX+ клеток	69
Глава 4. Результаты и обсуждение	69
4.1. Динамика возникновения белков системы рестрикции-модификации Esp1396I в новой хозяйской клетке.....	69
4.2. Количественное моделирование динамики появления белков CPM Esp1396I в новой хозяйской клетке.....	75
4.3. Влияние копийности плазмиды, несущей CPM Esp1396I на эффективность её защиты от вируса.....	79
4.4 Влияние искусственного сдвига отношения МТ/ЭР в клетках на эффективность их защиты от вируса	83
4.5 Роль С-белка в регуляции системы рестрикции-модификации Esp1396I	86
4.6 Процесс инфекции бактериофагом T7 клеток с системой CRISPR-Cas	88
4.7 Изучение защитной системы BREX	92
Глава 5. Заключение	94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	96
БЛАГОДАРНОСТИ	97
Список литературы	98

Глава 1. Введение

1.1 Актуальность проблемы

В данный момент остро стоит проблема поиска новых антибактериальных агентов, одними из которых могут выступать вирусы бактерий – бактериофаги. С другой стороны, массовая гибель бактерий от вирусов является существенной проблемой в промышленности [1]. Многие бактерии используют разнообразные механизмы противовирусной защиты, не позволяющие бактериофагу уничтожить бактериальную популяцию. Одними из самых распространённых защитных систем являются системы рестрикции-модификации (РМ). Принцип их действия основан на активностях двух ферментов: метилтрансферазы (МТ), которая метилирует ДНК в определённых сайтах узнавания, и эндонуклеазы рестрикции (ЭР), способной внести двунитевой разрыв ДНК в тех же, но только неметилованных сайтах узнавания. В большинстве случаев геном бактерии, несущей систему РМ, защищён действием МТ, тогда как чужеродная ДНК (например, ДНК вируса) при попадании в бактериальную клетку не защищена и, следовательно, уничтожается ЭР. Однако, несмотря на высокий уровень защиты, в некоторых случаях ДНК бактериофага успевает метилироваться и тем самым даёт устойчивое к действию ЭР потомство. В этом случае говорят о преодолении системы РМ, при этом вся бактериальная популяция подвергается заражению бактериофагом. Молекулярные механизмы, которые позволяют фагам преодолевать защиту, обеспечиваемую системами РМ, не вполне понятны.

Другими активно изучаемыми в последнее время защитными системами бактерий являются CRISPR-Cas системы. Их действие обусловлено наличием в клетках кассеты, содержащей небольшие участки ДНК вируса, разделённые одинаковыми повторами (CRISPR), а также белков, связанных с этими повторами (англ. Cas — C RISPR-Associated), в том числе белков, разрушающих участки ДНК вируса, комплементарные записанным в кассете.

В начале 1980-х годов была открыта система бактериального иммунитета Pgl. Однако механизм её действия до сих пор остаётся плохо изученным. Было показано, что система состоит из четырёх генов с неизвестными функциями, которые позже были предсказаны биоинформатически.

Анализ большого количества бактериальных геномов выявил встречаемость генов, гомологичных генам системы Pgl 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 обеспечивает устойчивость к большому набору бактериофагов. Однако разновидностей систем BREX существует гораздо больше и их можно разделить на шесть групп по составу генов и порядку их расположения. Системы BREX являются чрезвычайно плохо изученными, неизвестно даже точное число и особенности различных типов этих систем.

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

1.2 Цели и задачи

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

Для достижения поставленной цели решались 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 плазмиды, несущей систему рестрикции-модификации Esp1396I, на концентрации метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в клетках, и на эффективность противовирусной защиты.

4. Осуществление контролируемого сдвига соотношений ферментов системы РМ 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.

1.3 Научная новизна и практическая ценность работы

Изучение защитных систем бактерий от вирусов ведётся уже длительное время и подарило миру эндонуклеазы рестрикции, повсеместно используемые для молекулярного клонирования. Ранее такие системы изучались классическими микробиологическими методами, которые рассматривали одновременно целые популяции клеток, таким образом, производилось усреднение по ансамблю. Развитие флуоресцентной микроскопии и использование флуоресцентных белков позволило в данной работе впервые изучать защитные системы на уровне

одиночных бактериальных клетках. Вследствие применения данных методов нами было показано, что даже в генетически однородной популяции клеток действительно существуют значительные вариации в экспрессии генов системы РМ [2].

Методами математического моделирования было показано [3], что либо вероятность метилирования бактериофага и последующего преодоления защиты системы РМ может быть связан 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 тот вопрос до сих пор остаётся плохо изученным.

Точное понимание механизмов резистентности бактерий к вирусам, а также понимание 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.

1.4 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».

1.5 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.

1.6 Публикации и апробация работы

Результаты работы докладывались на 10 международных и всероссийских конференциях. По результатам исследований опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах [4, 2, 5].

1.7 Структура и объём работы

Работа построена по стандартной структуре и включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы работы, результаты, полученные в результате выполнения работы, выводы, а также список использованной литературы (174 источник). Объём работы составляет 110 страниц. Работа содержит 1 таблицу, 7 формул, 36 рисунков.

Глава 2. Обзор литературы

2.1 Бактериофаги

Самыми многочисленными объектами на Земле являются вирусы бактерий – бактериофаги (фаги), вносящие огромный вклад в экологический баланс микромира, а также играющие ключевую роль в эволюции бактерий за счёт осуществления горизонтального переноса генетического материала [6-8]. Впервые бактериофаги упоминаются 1896 году в работе М.Е. Ханкина по изучению антибактериальной активности воды из двух индийских рек [9]. В полной мере открытие бактериофагов

приписывают Ф. Творту, наблюдавшему в 1915 году лизис *Staphylococcus spp.* [10], и Ф. Д'Эреллю, который в 1917 году ввёл термин “бактериофаг” [11].

Долгое время ведутся дискуссии о том, являются ли бактериофаги живыми организмами [12]. Бактериофаги состоят из молекулы ДНК или РНК, окружённой белковой оболочкой [13]. Такая белковая оболочка называется капсидом и, как правило, представляет собой многогранник. Капсид бактериофага в свою очередь прикреплён к хвосту, а на его конце находятся фибриллы (Рисунок 1), с помощью которых вирус присоединяется к бактериальным рецепторам. Форма белковой оболочки вируса может значительно отличаться в зависимости от его типа, кроме того, существуют вирусы, у которых нет хвоста (*Corticovirus* и др.) или капсида (*Inovirus* и др.) [14].

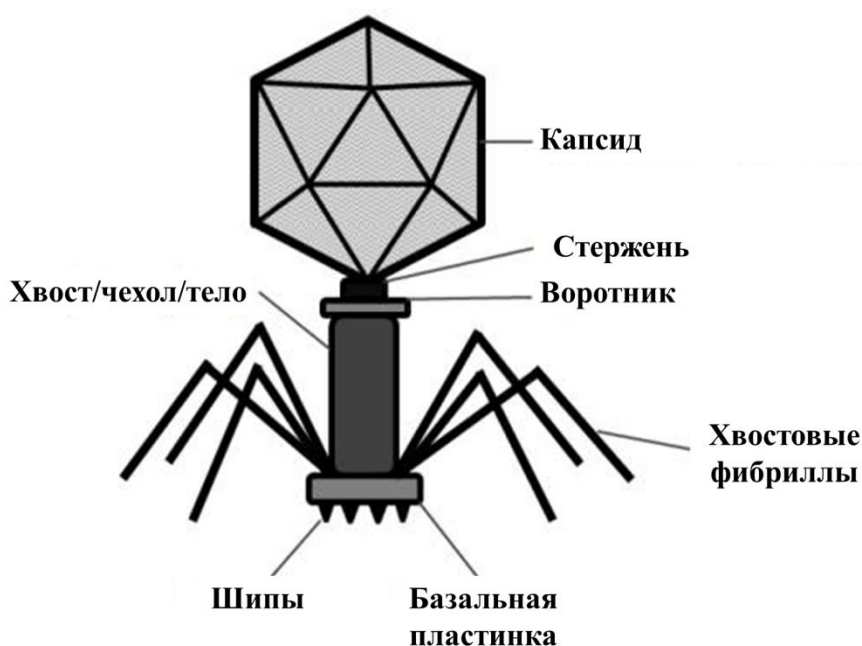


Рисунок 1. Строение бактериофага [15]

Заражение бактерий вирусом может протекать в основном двумя различными способами. Способ заражения зависит от вида бактериофага, который может быть вирулентным или умеренным. После попадания в клетку вирулентного бактериофага мгновенно начинается репликация фагового генома, производство его потомства и синтез кодируемых фагом белков, таких как холин и эндолизин, с

помощью которых осуществляется лизис клетки и выход вирусного потомства в окружающую среду (Рисунок 2Б) [16].

Умеренные бактериофаги вместо быстрого лизиса клетки способны встраивать свою ДНК по специфическим сайтам в геном бактерии, тем самым размножая свой геном вместе с каждым делением клетки (Рисунок 2А) [17]. Такое состояние клетки называется лизогенией, а фаговый геном, встроенный в геном бактерии, называется профагом. Состояние лизогении может длиться неопределённое количество времени и может прерываться в случае, когда клетки подвергнутся стрессу или попадут в неблагоприятную среду [18]. Механизмы прерывания лизогенного состояния могут отличаться для разных вирусов, а после выхода из лизогении запускается литический путь развития.

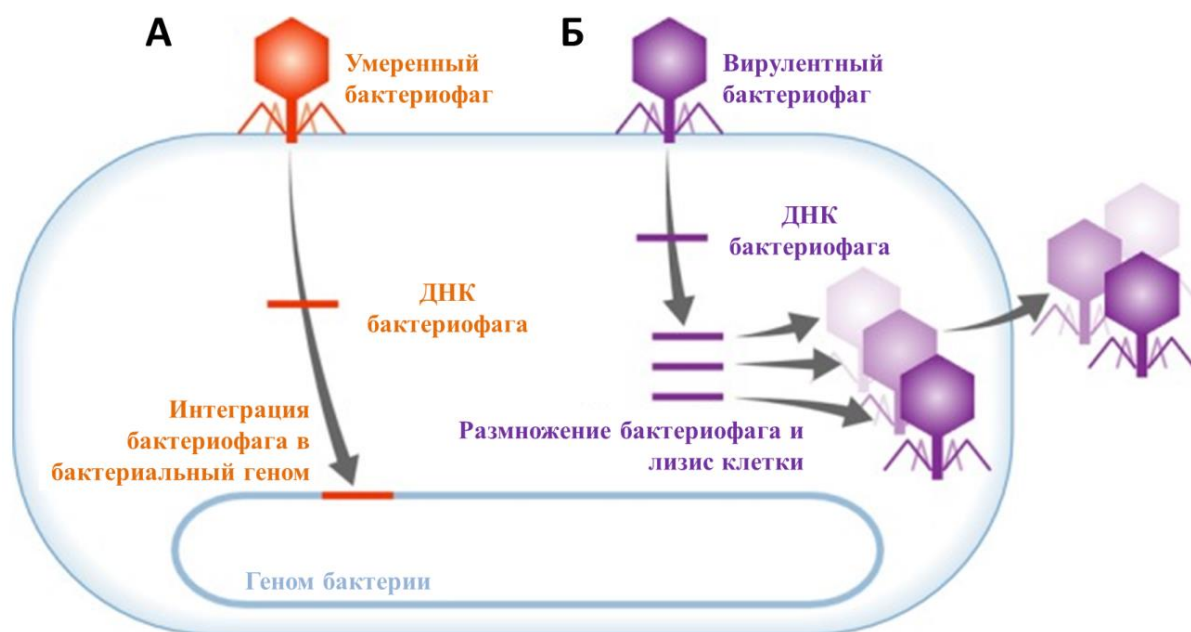


Рисунок 2. Две стратегии развития бактериофага. А. Лизогения. Б. Литический путь [19]

Однако лизогенное состояние может быть очень стабильным, кроме того, профаг может влиять на фенотип клеток вследствие экспрессии дополнительных генов. Также бактериофаги могут находиться в клетке в плохо изученном

псевдолизогенном состоянии. В последнем случае молекула ДНК вируса, не интегрированная в клеточный геном, присутствует в бактерии на протяжении нескольких клеточных делений, после чего может произойти лизис [20]. Также бактериофаги могут вызывать хроническую инфекцию бактерий (M13, *Acholeplasma* L2 и др.). В этом случае клетка не умирает, а продолжает продуцировать вирусы, которые в течение долгого времени отпочковываются от неё [17].

Бактериофаги широко распространены в окружающей среде. Методами просвечивающей электронной микроскопии (Рисунок 2.1.3.А) и флуоресцентного окрашивания (Рисунок 3Б) можно определить виды и количество вирусов в образце. Например, было показано, что в морской воде на каждую бактерию приходится приблизительно десять вирусов [21, 22].

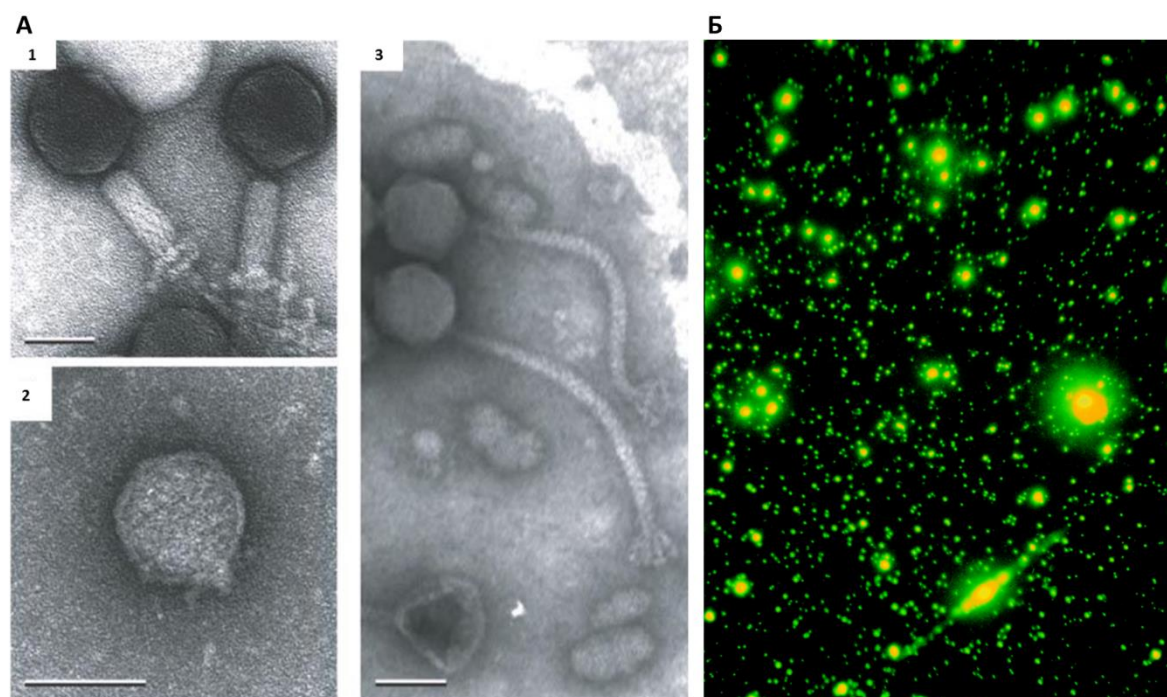


Рисунок 3. А. Электронные микрофотографии различных видов бактериофагов, обнаруженных в морской воде (1. *Myoviridae*; 2. *Podoviridae*; 3. *Siphoviridae*);[22]. Шкала – 50 нм. **Б.** Флуоресцентное изображение ДНК бактерий и вирусов из морской воды, взятой на глубине 5 метров вблизи острова Санта-Каталина (Калифорния). Окраска красителем SYBR Green [21]

Концентрация бактериофагов в более сложных средах, таких как почва и живые организмы, может отличаться от полученных для морской и пресной воды, как в меньшую, так и в большую стороны [23]. Общая же популяция бактериофагов на Земле составляет приблизительно 10^{31} вирусных частиц [24].

Бактериофаги отличаются большим разнообразием. По данным международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) на июль 2017 года насчитывается два порядка бактериофагов, самым многочисленным из которых является *Caudovirales* (бактериофаги с двухцепочечной ДНК и хвостом), насчитывающий 4 семейства *Ackermannviridae*, *Myoviridae* (бактериофаги с хвостом, способным к сокращению), *Podoviridae* (бактериофаги с коротким хвостом), *Siphoviridae* (бактериофаги с длинным, не сокращающимся хвостом), имеющие 2, 6, 3 и 11 подсемейств соответственно [25].

Размер генома бактериальных вирусов варьируется в широких пределах. Например, наименьший геном имеет бактериофаг Q β , заражающий *Escherichia coli*. Геном этого бактериофага представляет собой одноцепочечную молекулу РНК длиной 4217 пар оснований и кодирующую всего четыре гена: РНК-зависимую РНК-полимеразу для репликации собственного генома, два белка капсида и многофункциональный белок, отвечающий за адсорбцию к пилиям бактерии, лизис клеток и защиту молекулы РНК, находящейся в капсиде, от действия РНКаз [26]. Самым маленьким ДНК-содержащим вирусом является фХ174 с одноцепочечным кольцевым геномом размером 5386 пар оснований [27]. Геном этого вируса чрезвычайно мал, поэтому некоторые из его 11 генов перекрываются. ДНК вируса фХ174 является первым секвенированным геномом [28], а также первым вирусом, собранным в пробирке [29]. В среднем же фаговый геном намного больше и составляет 50-100 тысяч пар оснований [30]. Однако существуют также гигантские бактериофаги, такие как фKz, ОВР, AR9 и другие, имеющие размер генома порядка 250-280 тысяч пар оснований [31-33].

Первым этапом вирусной инфекции является адсорбция бактериофагов на поверхность бактерии. Адсорбция может иметь обратимый и необратимый характер. Этот этап включает в себя такие процессы, как диффузия, биохимические взаимодействия с поверхностью и конформационные изменения в рецепторных белках, вызванные взаимодействием с фагом [34].

Рецепторы, с помощью которых вирус узнаёт хозяйскую клетку, различны для разных бактериофагов и могут быть липидами, сахарами, белками и другими структурами на поверхности клетки (Рисунок 4) [35]. Такое разнообразие рецепторов вызвано большим количеством защитных мер, предпринимаемых со стороны клеток для предотвращения заражения или со стороны вирусов для эффективного его осуществления [36]. Кроме того, в адсорбции иногда участвует сразу два рецептора. Например бактериофаг T5 может обратимо адсорбироваться на последовательность полиманнозы в О-антигене и необратимо адсорбироваться на мембранный белок FhuA [37].

Некоторые бактериофаги адсорбируются на бактериальные жгутики. В таком случае возникает сильное специфическое белок-белковое взаимодействие между хвостовыми фибриллами вируса и белками, находящимися на жгутике. Например, FliC, FljB, FliK являются характерными рецепторами для бактериофагов, инфицирующих *Salmonella* [38]. Кроме того, эффективность заражения некоторых бактериофагов, адсорбирующихся на жгутики, зависит от подвижности и направления вращения жгутика [39]. Помимо жгутиков, некоторые бактериофаги используют для адсорбции пили [40].

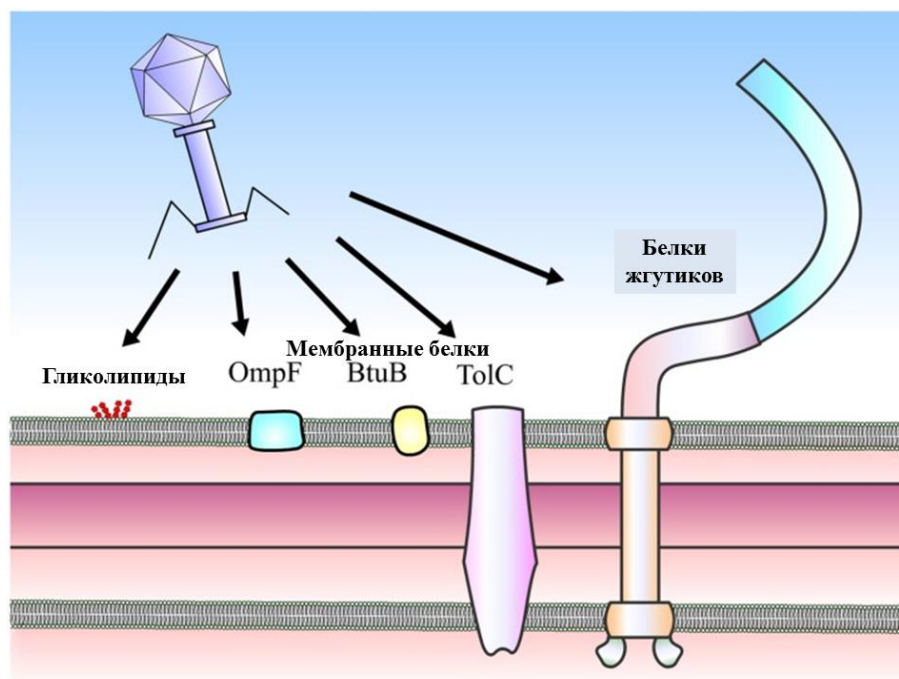


Рисунок 4. Разнообразие рецепторов бактериофагов, инфицирующих виды *Salmonella* [35]

Для грамположительных бактерий в большей степени характерны такие фаговые рецепторы, как пептидогликан и остатки тейхоевой кислоты. Для грамотрицательных бактерий нельзя выделить превалирующий вирусный рецептор, так как в качестве них одинаково часто встречаются остатки сахаров и белки, а также два этих субстрата одновременно. Более подробно с видами рецепторов, характерных для грамположительных и грамотрицательных бактерий можно ознакомиться ниже (Рисунок 5). Кроме того, в некоторых случаях бактериофаги могут деградировать остатки сахаров в О-антигене [41].

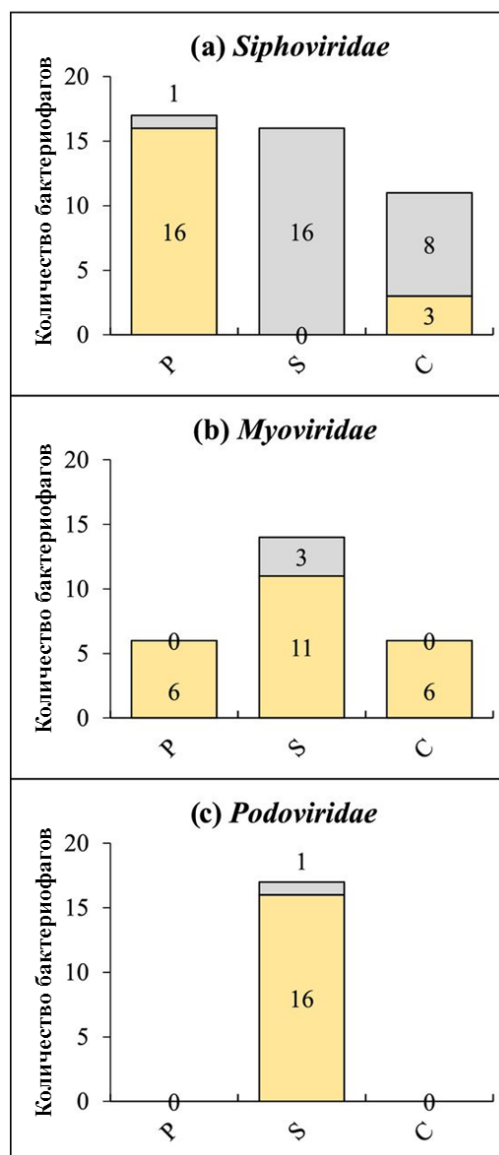


Рисунок 5. Рецепторы, использующиеся для адсорбции на грамположительные (обозначено серым) и грамотрицательные (обозначено жёлтым) бактерии вирусами трёх семейств: *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*. P – белковые рецепторы, S – остатки сахаров, C- комбинированные [41]

После адсорбции бактериофага происходит инъекция его генетического материала в клетку. Большинство вирусов в процессе инъекции впрыскивают в клетку только молекулы ДНК или РНК, а остальные белки вириона остаются снаружи. Однако все известные бактериофаги с двуцепочечной РНК проникают в клетку вместе с капсидом, содержащим также РНК-зависимую РНК-полимеразу, необходимую для репликации фагового генома [42]. В среднем ДНК вируса имеет

длину приблизительно 10 мкм, а скорость инъекции в клетку может составлять 3-4 тысячи пар оснований в секунду [43].

Механизм инъекции ДНК в клетку тесно связан с упаковкой генетического материала в капсид. После первых экспериментов по изучению бактериофага T2 было высказано предположение, что вирус впрыскивает свою ДНК в клетку за счёт плотной упаковки, необходимой для вмещения её в капсид вируса, что в свою очередь приводит к возникновению сильных взаимодействий между соседними участками двунитевой спирали и повышенного давления внутри капсида [44]. Однако данное предположение не является абсолютно верным, так как не все вирусы имеют геном, состоящий из двуцепочечной ДНК, за счёт которой и образуется избыточное давление, а также не все вирусы имеют достаточную длину хвоста, чтобы полностью проткнуть мембрану клетки и впрыснуть ДНК в цитоплазму [45].

Механизм инъекции ДНК, характерный для бактериофага T5, отличается от описанного выше и имеет две стадии с паузой около 4 минут между ними [46]. На первой стадии инфекции в клетку впрыскивается примерно 8% генома вируса T5, далее с помощью синтезированных с впрыснутой ДНК белков A1 и A2 происходит перенос в клетку оставшейся части фагового генома.

Бактериофаг T7, напротив, впрыскивает свою ДНК в клетку с постоянной скоростью, которая зависит от температуры; весь этот процесс занимает 9—12 минут (при температуре 30 °C). Предполагается, что изначально впрыскивается только 2,5% генома вируса T7. На данном участке находятся три ранних промотора A1, A2 и A3, которые узнаются РНК-полимеразой *E. coli*, после чего начинается транскрипция и оставшаяся ДНК “втягивается” из капсида в клетку. Транскрипция терминируется примерно на 19% генома вируса. В результате этого процесса, из ранних транскриптов синтезируется РНК-полимераза фага T7, которая узнаёт вирусные промоторы, тем самым продолжая транскрипцию и “втягивание” ДНК фага внутрь клетки [47].

После инъекции вирусной ДНК происходит перестроение клеточного метаболизма, и бактерия активно начинает нарабатывать новые фаговые частицы, либо происходит встраивание ДНК вируса в клеточный геном (лизогения). Например, геном бактериофага λ , который после попадания в клетку образует кольцевую молекулу ДНК, состоит из трёх регионов, отвечающих за разные вирусные функции. Первый набор генов отвечает за упаковку ДНК вируса в капсид, второй ответственен за лизогенный цикл, а третий набор генов отвечает за жизненный цикл вируса и его репликацию [48]. Выбор лизогенного или литического цикла, как правило, зависит от состояния клетки, от того, достаточно ли ей питательных веществ и находится ли она в SOS-ответе, от температуры окружающей среды. Для фага λ известно, что литическое состояние не может переходить в лизогенное, а лизогенное переходит в литическое, например, при облучении клеток ультрафиолетом и включении SOS-ответа. Это происходит за счёт разрушения белков, необходимых для поддержания лизогенного состояния [49].

Таким образом, после выбора литического пути развития или переходе от лизогении к литическому пути развития в клетке-хозяине активно начинают нарабатываться новые вирусные частицы. Для различных бактериофагов данный процесс происходит с некоторыми отличиями и включает в себя большое разнообразие взаимодействий белков с нуклеиновыми кислотами и другими белками. Даже в рамках одного семейства могут быть значительные отличия в сборке новых фаговых частиц, обусловленные размерами и формой капсида, строением и длиной хвоста, положением генов в геноме вируса, а также количеством фаговых белков [50]. Однако процесс сборки новых вирусных частиц имеет много сходств. Например, для большинства вирусов имеет место синтез капсида, после чего в него упаковывается вирусная ДНК [51]. Для правильной сборки капсида необходимы следующие белки: белки капсида, каркасные белки и белок-соединитель.

Большинство вирусных капсидов имеет схожее строение и форму икосаэдра [52, 53]. Чтобы собрать вирусную оболочку такой формы необходимо как минимум 60

молекул белка капсида [54]. Зачастую капсид бактериофага формируется из большого количества копий одного вида белка, однако некоторые вирусы имеют два вида белков капсида (Т4, Т7) [55].

Каркасные белки [56] представлены в большинстве бактериофагов отдельными белками, а в некоторых, например Т5, доменами, входящими в состав белка капсида [57]. Разные бактериофаги используют разное количество каркасных белков, например вирусу Т7 для правильной сборки капсида необходимо всего 0,11 каркасных белков на один капсидный [58]. В процессе упаковки ДНК в капсид каркасные белки разрушаются или покидают его [59]. Отсутствие же или нарушение функций этих белков приводит к неправильной сборке капсида. Известно, что в отсутствии каркасных белков у некоторых бактериофагов (Т4, λ) капсиды образуют длинные цилиндрические структуры [60].

Белок-соединитель, как правило, находится на одной из вершин капсида и отвечает за вход ДНК в капсид и выход из него, а также за прикрепление капсида к хвосту вируса [61].

После сборки капсида с помощью специального упаковочного комплекса, происходит упаковка в него фаговой ДНК [62], а затем происходит прикрепление к капсиду белков хвоста. Сборка хвоста также является достаточно сложным процессом, для которого необходимы: инициаторный комплекс, располагающийся на удалённом от капсида конце хвоста, белки хвоста, вспомогательные белки, а также белок-терминатор, определяющий длину будущего хвоста [63, 64].

Зрелому потомству вируса необходимо преодолеть мембранный барьер и покинуть хозяйскую клетку, чтобы получить возможность заражать новые бактерии. Для этого существует большой набор механизмов лизиса клетки, которые используют бактериофаги для выхода из клеток в окружающую среду [65]. Барьерами для фагового потомства служат мембрана и клеточная стенка в случае грамположительных бактерий, а в грамотрицательных — две мембраны (внутренняя и наружная) и клеточная стенка.

На данный момент лучше всего изучен механизм лизиса бактериофагом λ бактерий *E. coli*, который считается модельным для большинства двухцепочечных бактериофагов и заключается в накоплении вирусного эндолизина в заражённой клетке и образовании с помощью мембранного белка холина дырок в клеточной мембране. После нарушения целостности мембраны эндолизин получает возможность деградировать клеточную стенку, что в итоге приводит к лизису клетки (Рисунок 6) [65]. Процесс лизиса клетки должен быть строго зарегулирован, во избежание деградации клетки до окончательной сборки фаговых частиц [66].

Описанный выше механизм лизиса клеток с теми или иными вариациями характерен для большинства бактериофагов, за исключением простых литических фагов, содержащих одноцепочечную кольцевую ДНК, и фагов с одноцепочечной РНК. В этих вирусах за лизис клетки отвечает один единственный ген, действующий как некоторые антибиотики и ингибирующий синтез клеточной стенки [66].

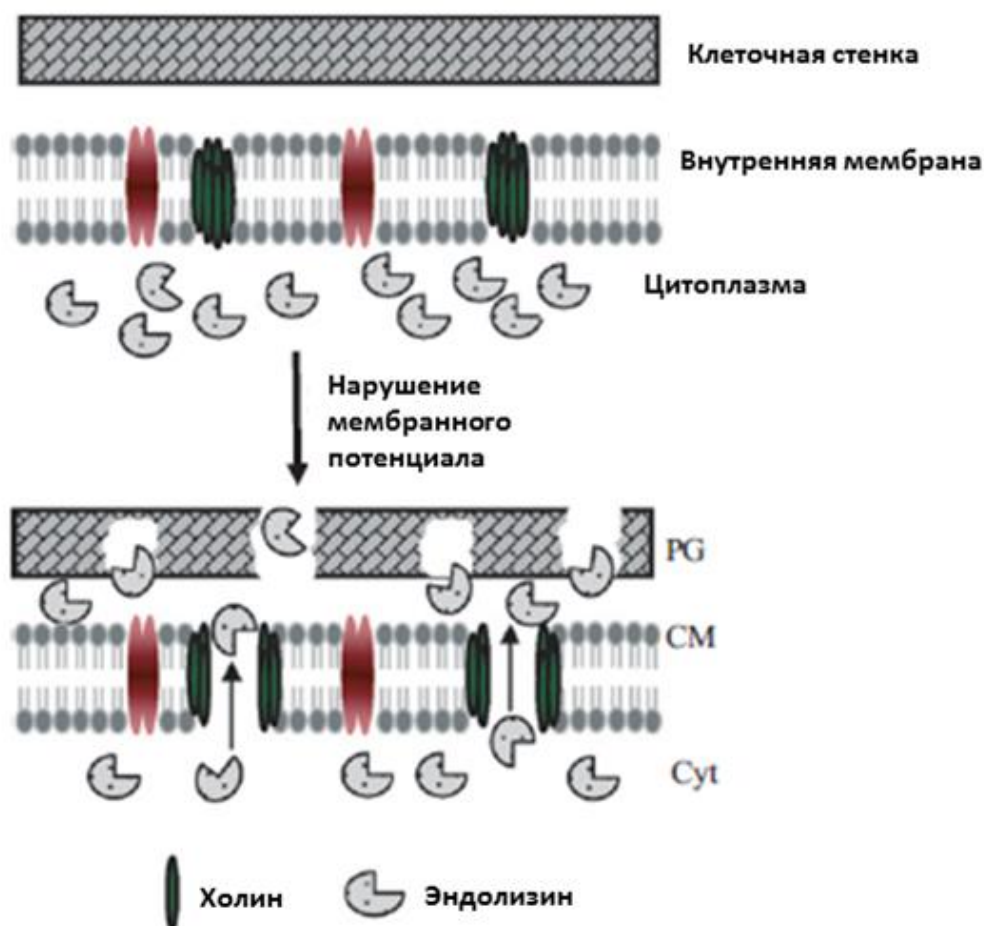


Рисунок 6. Лизис клетки с помощью холина и эндолизина [65]

Практически сразу же после открытия бактериофагов стали предприниматься попытки по использованию их в качестве терапевтических агентов для лечения бактериальных инфекций [15]. С распространением антибиотиков интерес к фаговой терапии ослабел, и работы в этой области продолжаются только в СССР, странах Восточной Европы и Франции. Однако начиная с 1980-х годов стали появляться мультирезистентные патогенные штаммы бактерий, и бактериофаги снова стали рассматриваться как перспективные агенты для борьбы с бактериальными инфекциями [67].

По сравнению с антибиотикотерапией лечение бактериальных инфекций бактериофагами имеет ряд преимуществ: достаточно легко и недорого осуществлять поиск и выделение новых бактериофагов, устойчивость бактерий к вирусам развивается гораздо медленнее, чем к антибиотикам, к тому же определённые

бактериофаги заражают только определённые виды бактерий, что снижает риск нарушения человеческого микробиома, кроме того, бактериофаги являются безопасными для клеток человека [68].

Однако фаговая терапия также сталкивается с рядом трудностей, таких как сложность борьбы с патогенными бактериями, живущими внутри эукариотических клеток; возможность распознавания и уничтожения бактериофагов иммунной системой человека; горизонтальный перенос фагами генов, позволяющих бактериям получить гены устойчивости к антибиотикам; токсические эффекты от обширного лизиса бактерий [69, 70, 67]. Кроме того, существует большое количество защитных систем бактерий от вирусов, таких как CRISPR-Cas, системы рестрикции-модификации и другие, что также может затруднять успешное проведение фаговой терапии, поэтому изучение их защитных механизмов является чрезвычайно важной задачей [71].

2.2 Защитные системы бактерий

В условиях постоянного противостояния вирусам, бактерии выработали разнообразные механизмы борьбы с ними, которые могут действовать на совершенно различные стадии развития вируса, такие как связывание с рецепторами, инъекция ДНК и репликация (Рисунок 7) [72].

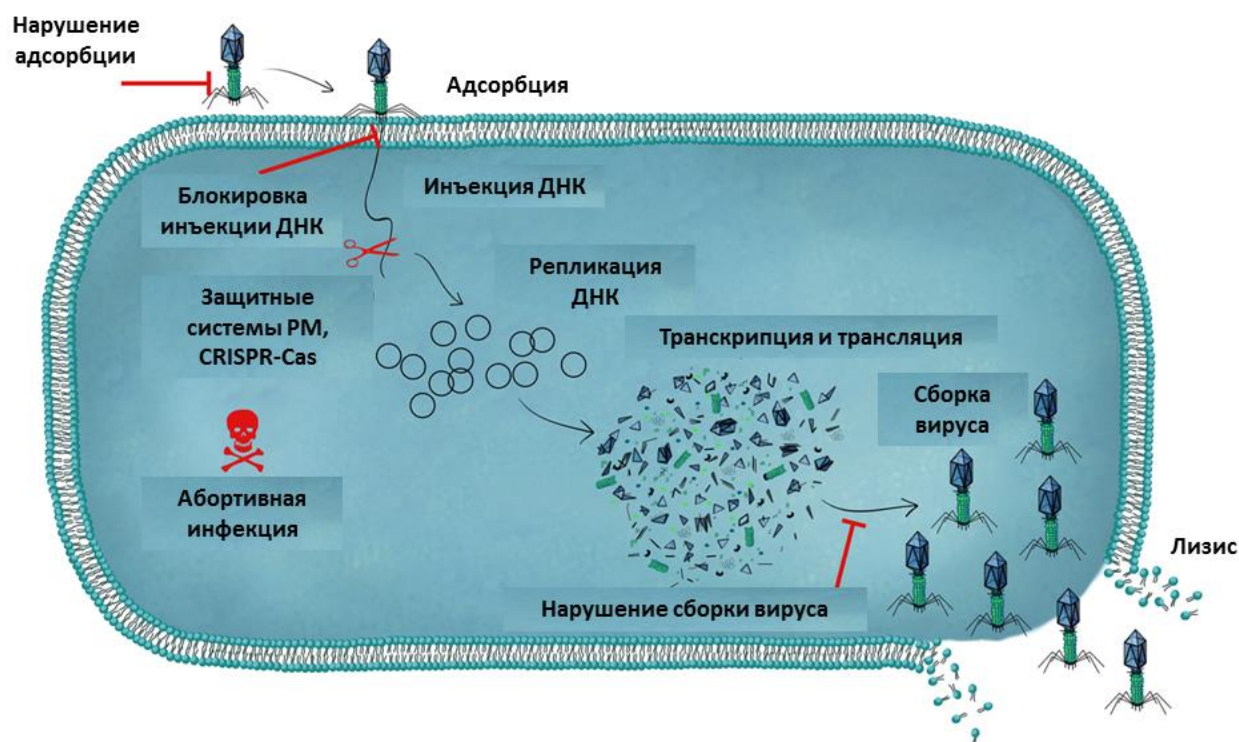


Рисунок 7. Мишени защитных систем бактерий от вирусов [73]

2.2.1 Модификация рецепторов

Для предотвращения успешной адсорбции фага на клетку бактерии могут терять, блокировать, мутировать или маскировать некоторые рецепторы [74]. Потеря рецепторов очень часто наблюдается в тех случаях, когда бактериофаги используют для адсорбции пили или жгутики [75].

Кроме того, за счёт отбора мутаций могут происходить различные модификации рецепторов, а также иногда бактерии могут временно ингибировать экспрессию некоторых фаговых рецепторов и изменять экспрессию белков в зависимости от условий окружающей среды, что позволяет снизить риск заражения вирусом [76]. Также бактерии могут использовать чувство кворума для регуляции экспрессии рецепторов [77]. Так, например, *E. coli* могут уменьшать количество мальтозных рецепторов LamB, используемых бактериофагом λ для адсорбции, в ответ на кворумные молекулярные сигналы.

2.2.2 Блокирование суперинфекции

Блокирование суперинфекции представляет собой механизм, кодируемый бактериофагами для предотвращения проникновения в клетку или репликации других вирусов.

Системы блокирования суперинфекции очень разнообразны, например фаговый ген *soj* блокирует инъекцию ДНК посредством инактивации белка FhuA (рецептор феррихрома) в *E. coli* [78], а ген *ltp* бактериофага TP-J34, заражающего *Streptococcus thermophilus*, кодирующий липопротеин ингибирующий инъекцию ДНК посредством взаимодействия с белком TMP необходимым для формирования канала, необходимого для попадания ДНК в клетку [79].

Большинство систем блокирования суперинфекции кодируются лизогенными вирусами, но иногда могут кодироваться и литическими бактериофагами. Например, вирус T4 *E. coli* кодирует такую систему, состоящую из двух независимо работающих белков. Один из них, изменяя конформацию сайта связывания вируса на клеточной мембране, блокирует перемещение вирусной ДНК в цитоплазму, а другой является мембранным белком, ингибирующим лизоцим бактериофага T4, необходимый для образования отверстий в клеточной стенке бактерии и позволяющий осуществить инъекцию фаговой ДНК в неё [80].

Кроме того, некоторые профаги обеспечивают защиту от суперинфекции посредством репрессии фаговых генов и блокировки литического цикла инфекции [81].

2.2.3 Абортивные системы защиты от вируса

Абортивные системы приводят к смерти заражённой бактериофагом клетки и используются ей для защиты всей популяции от вируса. В природе такие системы часто кодируются на плаزمиде и профагами. Механизмы работы абортивных систем разнообразны, могут проявляться на любой стадии развития вируса и позволяют полностью избавиться от вируса или уменьшить его выход [73]. В бактерии *Lactococcus lactis* найдено более 20 видов таких систем [82]. Например

система AbiP представляет собой два гена, экспрессирующиеся в одном опероне. Данная система оказывает влияние на репликацию и транскрипцию ДНК бактериофага, блокируя их. Таким образом эта защитная система задерживает размножение бактериофага и вызывает преждевременную клеточную смерть, уменьшая тем самым количество фагового потомства [82].

2.2.4 Системы рестрикции-модификации

Системы рестрикции-модификации (СРМ) являются широко распространёнными защитными системы бактерий от вирусной инфекции. Механизм их действия связан с двумя процессами: разрезанием немодифицированной вирусной ДНК с помощью эндонуклеазы рестрикции (ЭР) и модификацией собственного генома метилтрансферазой (МТ) для защиты его от деградации. МТ в клетке распознаёт и метилирует определённые сайты узнавания геномной ДНК, защищая её от разрезания ЭР, тогда как при попадании в клетку, вирусная ДНК, как правило, оказывается неметилованной и разрезается ЭР в тех же сайтах узнавания. Метилтрансфераза обычно обладает большей специфичностью к полуметилованной ДНК, которая образуется в результате деления бактерии, что также повышает защиту бактерии от вируса [83]. Однако в некоторых случаях ДНК вируса успевает прометиловаться быстрее, чем подвергнется деградации, в результате чего образуется фаговое потомство с модифицированной ДНК, которое приобретает устойчивость к действию данной СРМ и способно уничтожить всю популяцию “защищённых” бактерий. Бактериофаг остаётся устойчивым к действию данной защитной системы до тех пор, пока размножается в клетках, несущих ген метилтрансферазы, характерной для неё. Если же такой бактериофаг размножится на клетках без данной СРМ, то потомство такого вируса потеряет метилирование ДНК и снова станет чувствительным к действию ЭР.

Таким образом, метилтрансферазы в СРМ осуществляют добавление метильной группы на один нуклеотид каждой цепи ДНК, используя в качестве донора метильных групп S-аденозилметионин (SAM) (Рисунок 8А). Обычно происходит метилирование аденина или цитозина в положениях N6, C5 и N4 с образованием N6-

метиладенина, С5-метилцитозина и N4-метилцитозина (Рисунок 8А) [84]. Метилирование нуклеотидов в данных положениях приводит к появлению метильных групп в большой бороздке двуцепочечной ДНК, где они не мешают взаимодействиям между нуклеотидными парами, но являются легко доступными для белков, взаимодействующий с молекулой ДНК (Рисунок 8Б).

Эндонуклеазы рестрикции же представляют собой АТФ-зависимые гетероолигомерные белки, которые взаимодействуют с целевой последовательностью ДНК и осуществляют её гидролиз. Для ЭР I и III типов характерно образование транслокационных комплексов, вызывающих гидролиз фосфодиэфирных связей немодифицированной ДНК с последующим образованием двунитевого разрыва [84].

Системы рестрикции-модификации были открыты в 50-х годах XX века С. Лурией и М. Хуман [85], которые обнаружили, что в процессе размножения вируса в некоторых бактериальных клетках, он приобретает фенотипические изменения, приводящие к уменьшению выхода вирусного потомства, однако эти изменения не распространялись на другие штаммы. Вирусное же потомство, образовавшееся после редких успешных случаев заражения, получало устойчивость к защитным свойствам клеток, которая, однако, пропадала после прохождения бактериофага через другой штамм.

Номенклатура ферментов систем рестрикции-модификации создавалась в 1970-х годах. Название фермента любой СРМ состоит из трёх букв, обозначающих род и вид бактерии, из которой она была выделена, а также римской цифры, обозначающей порядковый номер СРМ в ней [86]. Например, эндонуклеаза рестрикции EcoRI была найдена в микроорганизме рода *Esherichia* (E), вида *coli* (co), штамм RY13 (R) и имела порядковый номер 1 (I).

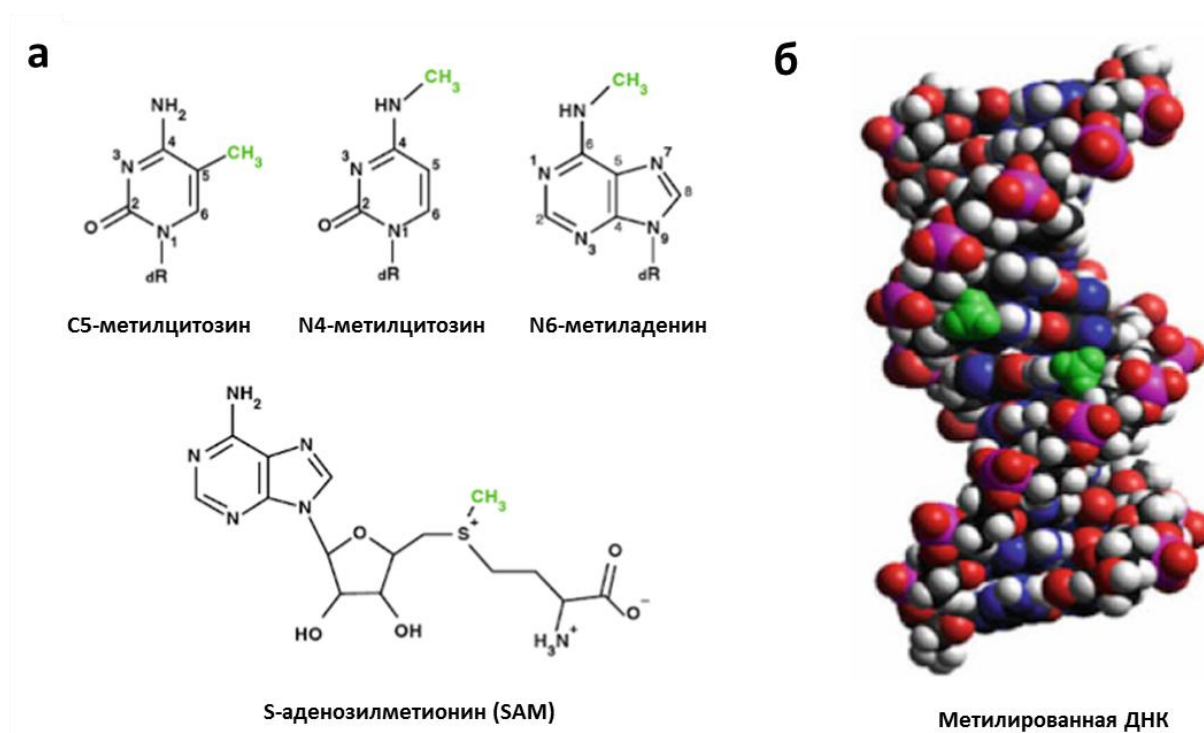


Рисунок 8. Молекулы, связанные с метилированием ДНК. **А.** Структуры метилированных оснований и кофактор SAM - универсальный донор метильных групп для всех реакций метилирования ДНК. **Б.** Модель метилированной ДНК. Метильные группы обозначены зелёным [87]

В зависимости от расположения генов, сайтов распознавания, от систем регуляции и необходимых кофакторов выделяют четыре различных типа систем рестрикции-модификации [88]. Большая часть всех изученных СРМ является системами II типа, ферменты которых узнают короткие палиндромные последовательности и разрезают ДНК в определённом месте сайта узнавания.

Также стоит отметить, что открытие ферментов СРМ вызвало революцию в биологии и позволило осуществлять процедуры клонирования.

2.2.4.1 Системы рестрикции-модификации I-го типа

Организация СРМ I-го типа отличается сравнительной сложностью. Её ферменты представляют собой мультисубъединичный белковый комплекс, который работает как единое целое и, как правило, содержит две субъединицы ЭР, две субъединицы МТ и одну субъединицу S (белок распознавания субстрата).

Ферменты в данных системах тесно связаны между собой. СРМ I-го типа обозначаются *hsd* (host specificity for DNA), её гены *hsdR*, *hsdM* и *hsdS*, а белки HsdR, HsdM и HsdS [89]. Гены *hsdM* и *hsdS* транскрибируются с одного промотора, в то время как *hsdR* имеет собственный промотор [90].

В качестве кофакторов ЭР СРМ I-го типа необходимы АТФ, Mg^{2+} и S-аденозилметионин, необходимый также МТ и участвующий в присоединении метильной группы к нуклеотиду [83]. Сайты узнавания ДНК в таких системах являются ассиметричными, состоящими из трёх и четырёх нуклеотидов (или четырёх и пяти нуклеотидов), разделённых на две части неспецифичной ДНК, длиной от шести до восьми нуклеотидов [91]. После связывания с сайтом узнавания, в зависимости от того, является ли он метилированным или нет, комплекс ферментов СРМ I-го типа может работать как метилтрансфераза и как эндонуклеаза рестрикции. Все известные на данный момент ферменты I-го типа метилируют аденин на противоположных цепях сайта узнавания. Если же сайт узнавания оказывается неметилированным, фермент протягивает через себя ДНК в обоих направлениях до столкновения с другим таким же комплексом, после чего происходит двунитевой раскус, располагающийся, как правило, в произвольном месте на удалении в тысячи пар оснований от сайта рестрикции [84, 90].

СРМ I-го типа делятся также на несколько семейств: IA, IB, IC, ID, которые имеют значительные изменения в ферментах системы, обзор которых, впрочем, выходит за рамки данной работы [90].

2.2.4.2 Системы рестрикции-модификации II-го типа

СРМ II-го типа являются самыми простыми. ЭР и МТ в таких системах являются отдельными белками. В большинстве случаев ЭР представляет собой гомодимер, а МТ мономер. В качестве кофактора ЭР требуется только Mg^{2+} , а в случае МТ — S-аденозилметионин [92].

Взаимодействие ЭР II-го типа с ДНК имеет сложный характер и состоит из нескольких этапов (Рисунок 9). Так как геном бактерии имеет большой размер,

изначально ЭР связывается с молекулой ДНК неспецифически и произвольно диффундирует по ней. После связывания с сайтом узнавания, происходят конформационные изменения, приводящие к активации каталитических центров. Далее происходит раскус фосфодиэфирных связей на обеих цепях ДНК и высвобождение продукта реакции, посредством диссоциации комплекса фермент-продукт или перехода фермента на другие неспецифические сайты на той же молекуле ДНК [93].

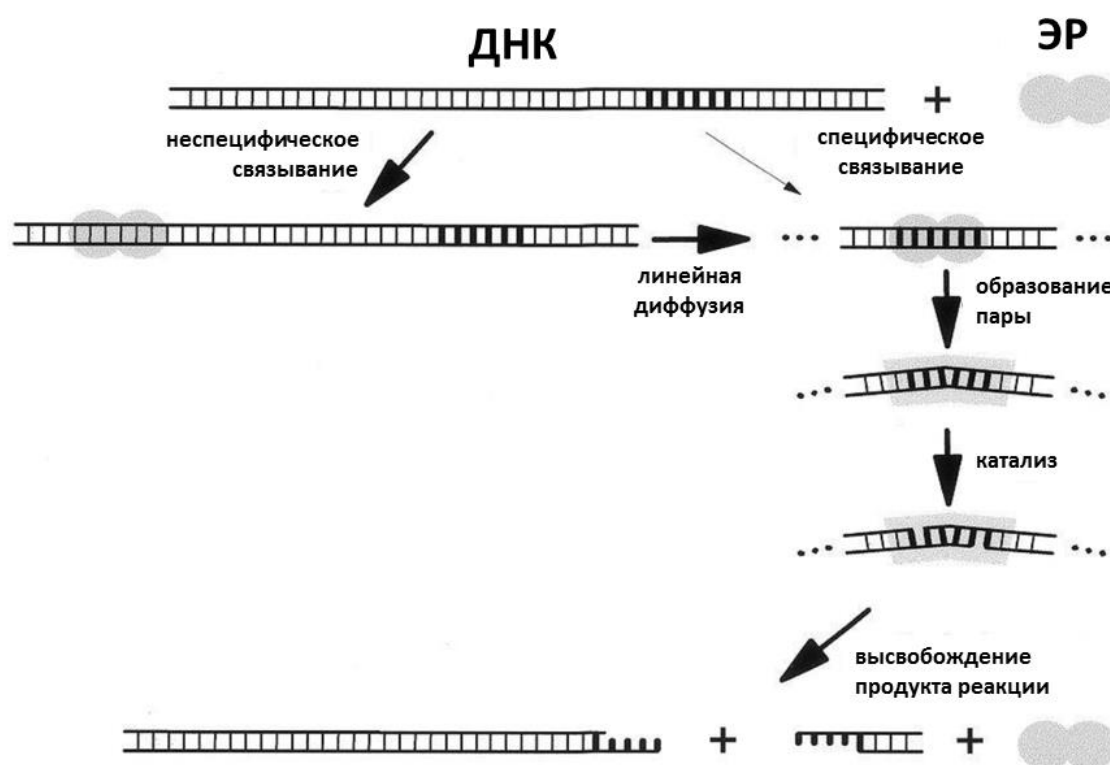


Рисунок 9. Схематичное изображение этапов взаимодействия ЭР II-го типа с ДНК [93]

Метилирование происходит посредством переноса метильных групп МТ от донора S-аденозилметионина непосредственно на двухцепочечную молекулу ДНК. МТ II-го типа могут формировать все из трёх возможных вариантов модификации (N6-метиладенин, C5-метилцитозин и N4-метилцитозин) [93].

Последовательности узнавания в СРМ II-го типа являются симметричными и палиндромными и, как правило, имеют длину четыре - восемь пар нуклеотидов, иногда разделённых числом N произвольных пар оснований [94]. Расщепление ДНК

ЭР происходит в определённых местах, как правило, внутри сайтов узнавания, в результате чего образуются тупые или липкие концы ДНК.

В системах такого типа гены могут иметь различный характер экспрессии. Иногда первым экспрессируется ген МТ, иногда ЭР, а иногда оба гена одновременно. Кроме того, гены могут иметь различную ориентацию и быть как противонаправлены, так и сонаправлены. Также, в рассматриваемых системах осуществляется регуляция экспрессии МТ и ЭР, и механизмы этой регуляции могут быть различными.

Так как из-за ряда преимуществ ЭР II-го типа представляют большой интерес для технологии получения рекомбинантной ДНК, было изучено и описано более 4000 различных СРМ II-го типа [95]. В результате этого все СРМ II-го типа также разделены на несколько подтипов, обладающих своими отличительными особенностями. Нужно отметить, что один и тот же фермент может принадлежать сразу к нескольким подтипам одновременно [89].

Тип СРМ IIR объединяет все ЭР, узнающие симметричные (палиндромные) последовательности и вносящие двунитевой разрыв в определённых симметричных положениях внутри последовательности сайта узнавания или в непосредственной близости от него. Ярким примером такой ЭР является EcoRI, имеющая следующий сайт рестрикции (стрелками обозначены места раскуса ДНК):

5' G↓A A T T C

3' C T T A A↑G

Тип IIA включает в себя все системы II-го типа, имеющие ассиметричный сайт узнавания, а раскус может возникать как внутри его последовательности, так и вне её. Как правило, СРМ такого типа имеют один ген ЭР и два гена МТ, которые используются для модификации ассиметричных последовательностей узнавания на каждой из двух цепей. Однако встречаются системы с двумя генами ЭР (Bpu10I),

или два гена МТ могут быть слиты (FokI) [89]. В качестве примера ЭР такой системы можно выделить HphI, имеющей следующий сайт узнавания:

5' GGTGANNNNNNN↓

3' CCACTNNNNNNN↑

Тип СРМ IIB объединяет ферменты, вносящие разрыв по обеим сторонам сайта узнавания. В качестве примера такой ЭР можно взять BsaXI со следующим сайтом рестрикции:

5' ↓NNNNNNNNNACNNNNNCTCCNNNNNNNNNN↓

3' ↑NNNNNNNNNNNTGNNNNNGAGGNNNNNNNN↑

СРМ IIC типа объединяют все ферменты, состоящие из одного полипептида, имеющего модифицирующий и рестрицирующий домены. В этот подтип входят все ферменты систем IIB, IIG и некоторые IIH.

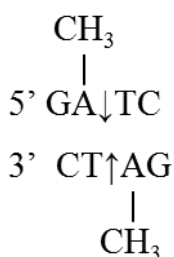
Системы IIE представляют собой ферменты, взаимодействующие с двумя копиями сайта узнавания. При этом одна последовательность является разрезаемой, а другая выступает в роли аллостерического эффектора. В качестве примера таких систем можно выделить EcoRII, NaeI, FokII и другие [89].

Тип СРМ IIF объединяет ферменты (BspMI, Cfr10I, NgoMIV, SfiI, SgrAI), взаимодействующие с двумя копиями сайта узнавания и разрезающие их.

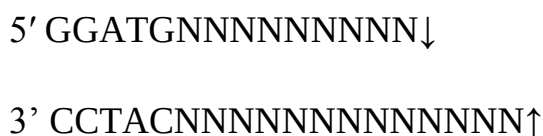
Ферменты типа IIG представляют собой домены МТ и ЭР, слитые в один полипептид, который может ингибироваться или стимулироваться S-аденозилметионином, однако механизм их действия схож с ферментами систем II-го типа. Последовательности узнавания таких систем могут быть как симметричными, так и ассиметричными. В качестве примера можно выделить следующие системы: Bce83I, BseMII, BseRI, BsgI, BspLU11III, Eco57I, GsuI, MmeI, Tth111II.

Ферменты СРМ IIN генетически похожи на СРМ I-го типа, однако их биохимическое поведение больше походит под описание СРМ II-го типа.

Ферменты СРМ типа IIM распознают только метилированные сайты узнавания и разрезают в определённых местах последовательности. Ярким примером таких ферментов является ЭР DpnI, имеющая следующий сайт рестрикции:



Тип ферментов IIS объединяет ферменты СРМ типа IIA, разрезающие как минимум одну цепь дуплексной ДНК вне сайта узнавания. Данный подтип СРМ II-го типа был введён самым первым [96], а характерным примером является FokI, разрезающим ДНК на заданном расстоянии от сайта узнавания:



Тип IIE описывает такие ферменты, как BbvCI, Bpu10I и BslI, состоящие из гетеродимерных субъединиц.

Кроме описанных выше подтипов, известны два вида ЭР, вносящих только одноцепочечный разрыв. Первый функционально не отличается от ЭР, однако раскусывает только одну цепь ДНК и обозначается дополнительной буквой N перед названием фермента. Например N.BstSEI имеет сайт рестрикции GAGTCNNNN $\downarrow$. Также бывают ЭР состоящие из двух субъединиц, каждая из которых вносит разрыв только в верхней или только в нижней цепи ДНК. Мутантные никорирующие ЭР получают путём инактивации одной из субъединиц.

Другой вид ЭР, вносящих одноцепочечный разрыв, были найдены только в сочетании с метилтрансферазой, модифицирующий положение C5 цитозина. Такие

ферменты вносят разрыв в места замен G/T, вызванные деаминированием C5-метилцитозина в сайте узнавания MT. Например, белок Vsr, работающий в паре с MT Dcm (M.EcoKDcm), распознаёт G/T замены, вызванные деаминированием метилированного остатка цитозина в сайте узнавания M.EcoKDcm с последовательностью CCWGG [97]. Такие никирующие ферменты обозначаются буквой V, стоящей перед названием MT, с которой они ассоциированы (например V.EcoKDcm).

2.2.4.3 Регуляция систем рестрикции-модификации II-го типа

Некоторые СРМ II-го типа имеют дополнительный регуляторный ген, позволяющий контролировать экспрессию MT и ЭР. Из-за присутствия в клетках двух отдельных белков MT и ЭР, главной целью регуляции данной системы является предотвращение рестрикции хозяйского генома эндонуклеазой рестрикции. Особенно важно, чтобы при появлении СРМ в «наивной» хозяйской клетке её немодифицированный геном полностью прометиловался до появления ЭР. В противном случае клетка погибнет из-за деградации её генома под действием ЭР. Если же СРМ уже находится в клетке, то регуляция необходима для компенсации периодов стационарной фазы роста бактерий, когда белки практически не синтезируются [98]. Например, СРМ AhdI состоит из двух транскрипционных единиц MT и S, а также ЭР и регуляторного С-белка. Было показано [99], что MT и S имеют сильный промотор, транскрипция с которого ослабляется метилированием сайта AhdI в области этого промотора. Промотор оперона СЭР является слабым, транскрипция с него регулируется С-белком, посредством его связывания с двумя участками промоторной области. Связывание с дистальным сайтом, обладающим высокой аффинностью, приводит к активации транскрипции С и ЭР, в то время как связывание с более слабым проксимальным сайтом приводит к ингибированию транскрипции этих генов. Нужно отметить, что в данной системе регуляция транскрипции осуществляется не только С-белком, но и с помощью метилтрансферазы.

Существуют механизмы контроля экспрессии генов CPM, использующие для своих целей только метилирование. Например, в системе CfrBI гены МТ и ЭР противоположно направлены и имеют перекрывающиеся промоторные области. В положении -35 промоторной области МТ располагается сайт узнавания CfrBI. Было показано [100], что метилирование цитозина в положении N4 в сайте узнавания CfrBI регулирует транскрипцию генов CPM. Модификация данного сайта ингибирует транскрипцию с более сильного промотора МТ, предотвращая образование промоторного комплекса посредством связывания с сигма70-субъединицей РНК полимеразы в положении -35 промоторной области. Данное ингибирование ведёт к увеличению активности более слабого промотора ЭР [101].

Кроме того, некоторые механизмы регуляции экспрессии генов основаны на связывании метилтрансферазы с регуляторными последовательностями ДНК. Например, в CPM SsoII МТ ингибирует свою экспрессию, при этом повышая экспрессию ЭР [102]. МТ, состоящая из 72 аминокислот, формирует мотив спираль-поворот-спираль, способный специфично связываться с ДНК, формируя стабильный комплекс со 140 парами оснований в промоторном регионе CPM SsoII.

2.2.4.4 Система рестрикции-модификации II-го типа Esp1396I

Часть данной работы посвящена изучению CPM II-го типа Esp1396I. Данная система состоит из генов МТ и ЭР, транскрибирующихся во встречных направлениях, а также регуляторного С-белка, также являющегося частью оперона СЭР [103]. CPM была найдена на плазмиде pEsp1396 размером 5,6 тысяч пар оснований в штамме RFL1396 бактерии *Enterobacter sp.* и имеет сайт узнавания, представляющий собой палиндромную последовательность 5'-CCA(N)₅TGG-3' [104]. Промотор С-белка и ЭР (СЭР) является слабым, а МТ сильным. С-белок имеет два сайта связывания в промоторной области СЭР. Связывание с дистальным сайтом активирует, а связывание с проксимальным ингибирует транскрипцию генов С-белка и ЭР. В промоторной области МТ также есть сайт связывания димера С-белка. В случае если данный сайт находится в связанном состоянии, происходит репрессия транскрипции МТ. При этом аффинность сайта связывания в

промоторной области МТ самая высокая, а самая низкая аффинность обнаруживается у проксимального сайта в промоторной области СЭР. Организация CPM ES_p1396I представлена на Рисунок 10.

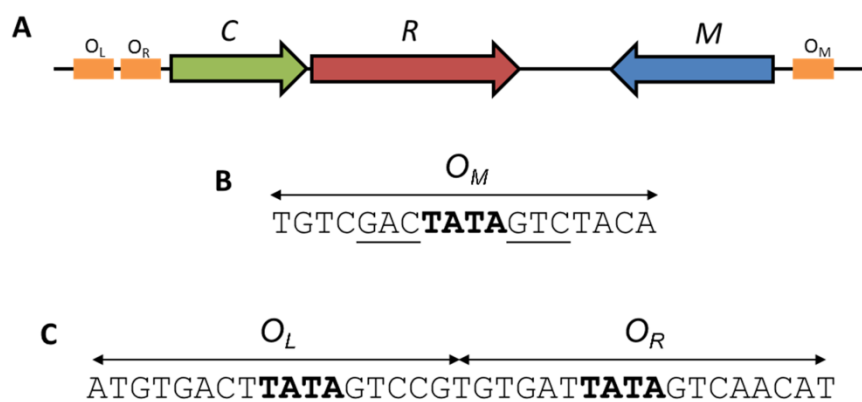


Рисунок 10. А. Организация CPM II-го типа Esp1396I. O_L и O_R обозначают соответственно дистальный и проксимальный сайты связывания С-белка в промоторной области генов С и ЭР. O_M обозначает сайт связывания С-белка в промоторной области гена МТ. Последовательности данных сайтов также представлены на рисунках В и С [105]

Таким образом, в новой хозяйской клетке, получившей CPM ES_p1396I, сначала ингибируется экспрессия МТ, после чего индуцируется экспрессия С-белка и ЭР. При достижении высокой концентрации С-белка в клетке экспрессия С-белка и ЭР также ингибируется.

2.2.4.5 Системы рестрикции-модификации III-го типа

CPM III-го типа состоят из двух генов — *res* и *mod*, кодирующих субъединицы белка, распознающего сайт узнавания ДНК и работающего как ЭР или МТ. Для рестрикции необходимы обе субъединицы белка, а также Mg^{2+} и АТФ [89]. Для разрезания ДНК, белковый комплекс взаимодействует с двумя копиями непалиндромного сайта узнавания, имеющими противоположную ориентацию. Раскусывание ДНК происходит на заданном удалении от одного из двух сайтов узнавания. Субъединица МТ может метилировать ДНК независимо от ЭР. Результатом работы МТ является полуметилированная ДНК с модификацией

аденина в положении N6. Нужно отметить, что для разрезания ДНК необходимо наличие двух немодифицированных сайтов узнавания, находящихся в противоположных ориентациях, в то время как в клетке все немодифицированные сайты имеют одинаковую ориентацию. Таким образом, полуметилированная геномная ДНК хозяйской бактерии не подвергается деградации ЭР. Яркими примерами СРМ III типа являются EcoP1I и EcoP15I [106].

2.2.4.6 Системы рестрикции-модификации IV-го типа

СРМ IV-го типа являются плохо изученными и состоят из одного или двух белков, раскусывающих метилированную или полуметилированную ДНК. Известные сайты рестрикции таких систем имеют сайт узнавания, разделённый 40-3000 парами оснований, а разрезание происходит на удалении нескольких пар оснований от него [89]. Кроме того, интересно, что единственной хорошо изученной системой, в которой в качестве кофактора для ЭР используется ГТФ, является СРМ IV-го типа McrBC [107, 108].

2.2.5 CRISPR-Cas системы

Защитные системы бактерий и архей CRISPR-Cas, впервые найденные в конце 1980-х годов [109], могут распознавать, связывать и уничтожать чужеродную ДНК вирусов и плазмид. Из названия данных систем, которое расшифровывается как «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами» (CRISPR) и «CRISPR – ассоциированные белки» (Cas) (англ. “clustered regularly interspaced short palindromic repeats–CRISPR-associated proteins”), понятна их структура, состоящая из небольших участков ДНК, разделённых повторами (CRISPR-кассет), а также Cas-генов.

Геномы почти всех архей и половины бактерий содержат системы адаптивного иммунитета CRISPR-Cas [110].

В 2005 году было показано, что небольшие участки ДНК из CRISPR-кассет (спейсеры), которые разделены повторами, являются идентичными последовательностям некоторых вирусов и плазмид [111-113]. Также эксперименты

показали, что в процессе заражения фагом, в CRISPR-кассету могут встраиваться новые участки вирусной ДНК, после чего у клетки возникает устойчивость к данному бактериофагу и в этом процессе также участвуют Cas белки [114]. Можно выделить три основных этапа работы CRISPR-Cas систем (Рисунок 11): 1. Вставка новых спейсеров (адаптация); 2. Транскрипция CRISPR-кассеты, её разрезание и образование криспер-РНК (crРНК); 3. Направленное с помощью crРНК расщепление чужеродной ДНК Cas-нуклеазами (интерференция).

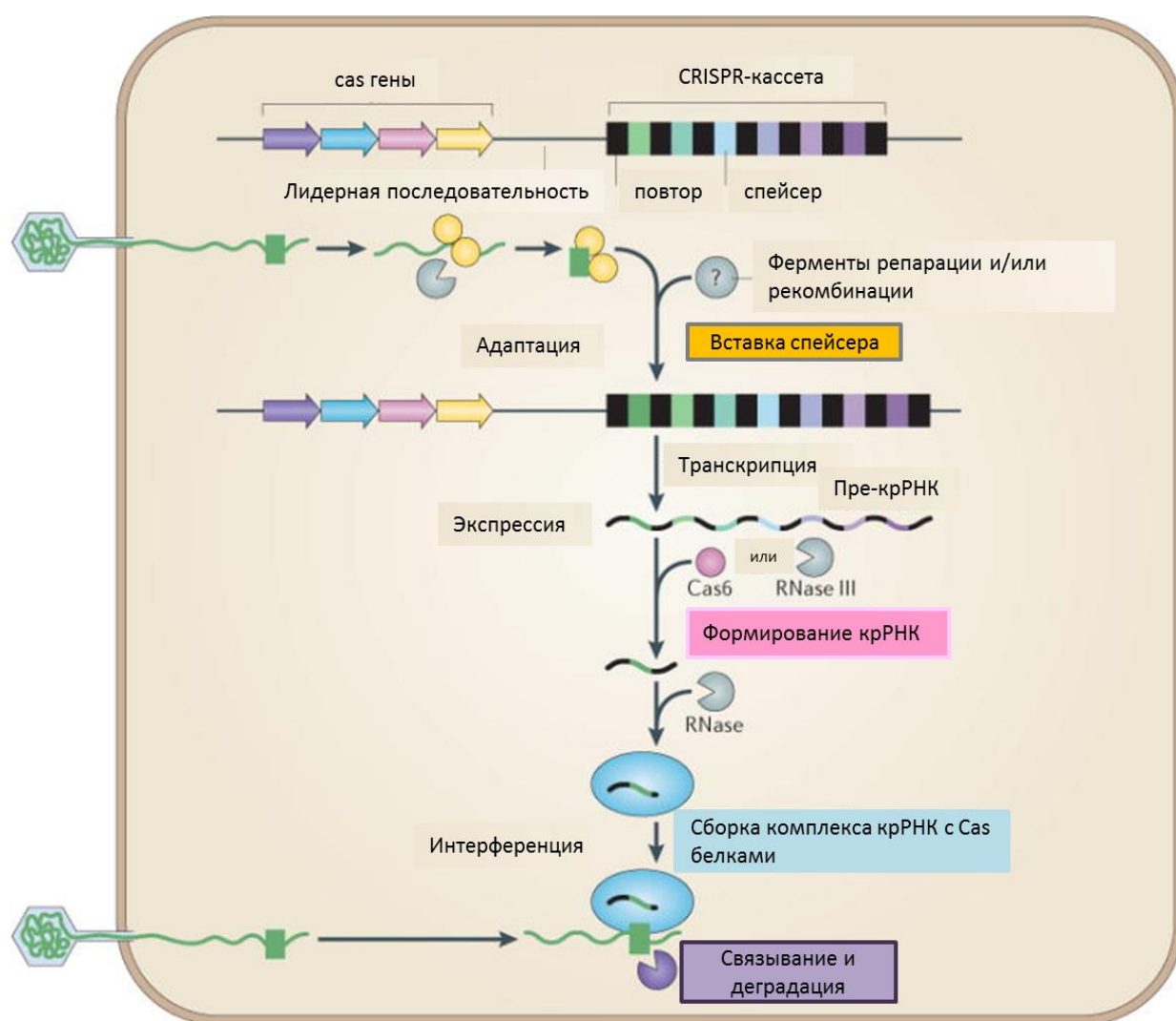


Рисунок 11. Принципиальная схема работы системы адаптивного иммунитета бактерий CRISPR-Cas. Гены Cas разных цветов имеют различные функции. Жёлтые отвечают за встраивание спейсеров, розовые — за формирование crРНК, голубые — за сборку комплекса crРНК-Cas белки, а фиолетовые — за связывание чужеродной ДНК и её деградацию [115]

Системы CRISPR-Cas обладают большим разнообразием; в последовательностях CRISPR-кассеты, cas-генов и cas-оперонов могут наблюдаться значительные различия [116, 117, 115]. Основываясь на этих различиях, все системы CRISPR-Cas были разделены на два основных класса, которые, в свою очередь, делятся на несколько типов и подтипов. Класс 1 кодирует эффекторный комплекс, состоящий из нескольких субъединиц, тогда как для класса 2 характерен эффекторный комплекс, представленный одним белком [118].

На данный момент выделяют VI подтипов CRISPR-Cas систем, для каждого из которых характерны свой набор белков (Рисунок 12), структура эффекторного комплекса, механизм адаптации, строение геномного локуса, механизм интерференции, особенности формирования crPНК [118].



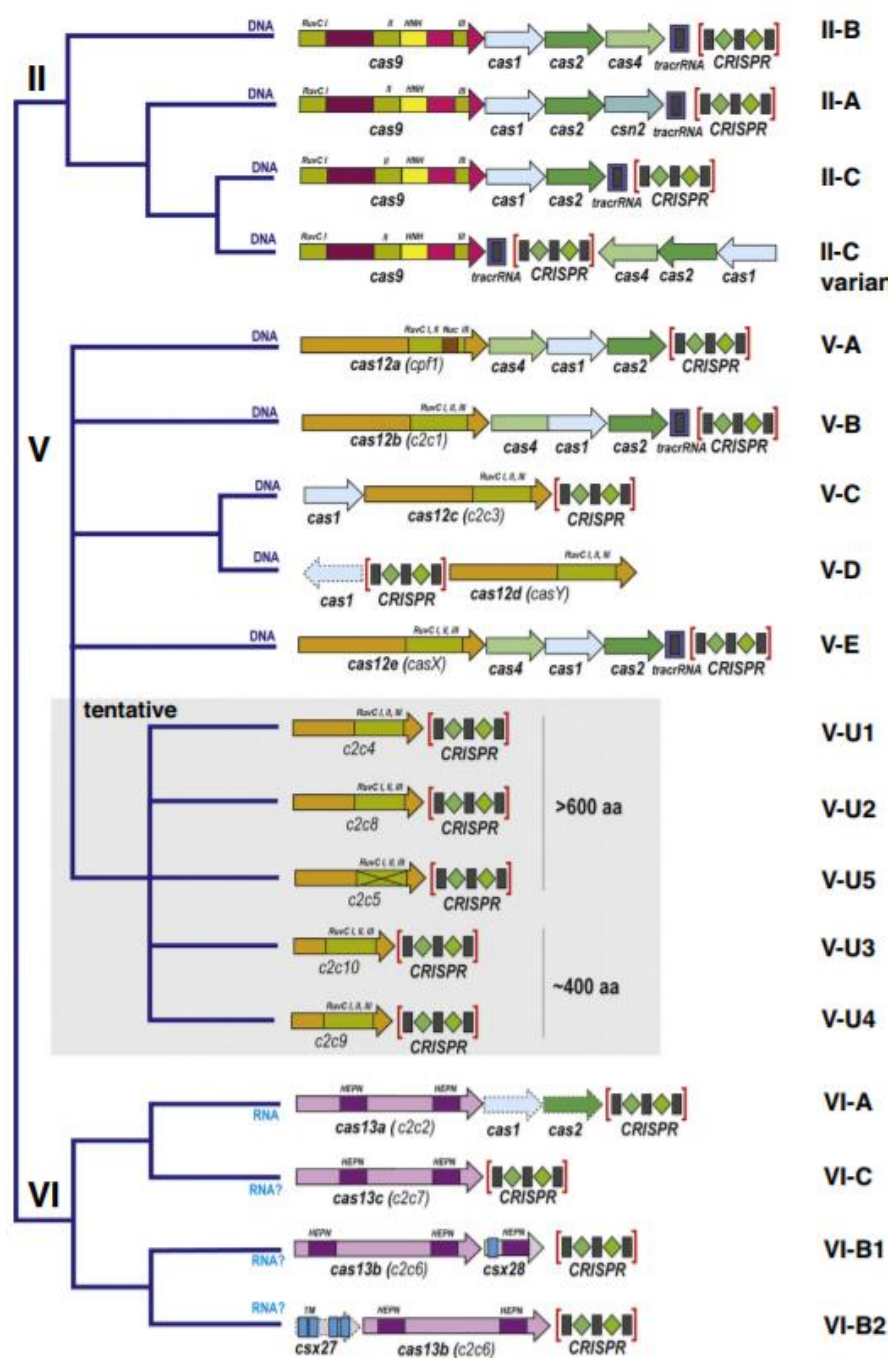


Рисунок 12. Типы и подтипы CRISPR-Cas систем, а также входящие в их состав белки. Верхний рисунок- CRISPR-Cas системы класса 1, нижний рисунок- CRISPR-Cas класса 2 [118]

II-й тип CRISPR-Cas систем является самым простым. Для него характерно наличие кроме Cas1 и Cas2 большого белка Cas9, который отвечает за образование crRNA и разрезание ДНК-мишени [119].

Далее рассмотрим подробнее все этапы работы CRISPR-Cas систем.

2.2.5.1 Вставка новых спейсеров в CRISPR-кассету (адаптация)

Вставка новых спейсеров происходит с 5' конца CRISPR локуса, находящегося перед лидерной последовательностью. Первым этапом данного процесса является распознавание чужеродной ДНК. В CRISPR-Cas системах I и II типов происходит вставка спейсеров, которые соседствуют со специфическими последовательностями РАМ (protospacer adjacent motif) длиной в несколько нуклеотидов. Последовательность РАМ отлична от последовательности повтора и помогает клетке отличать собственную нецелевую от чужой целевой ДНК, а также играет важную роль при вставке спейсеров (адаптации). В системах I-го типа последовательности РАМ располагаются на 3' конце протоспейсера, тогда как в системах II-го типа на 5' конце [119].

Для систем III-го типа характерна система “самоинактивации”, достигаемой путём связывания 5' конца сгРНК с последовательностью CRISPR локуса, что, по-видимому, приводит к невозможности интерференции по отношению к геному бактерии (самотаргетирования) [119, 120].

Белки Cas1 и Cas2 являются высококонсервативными и присутствуют во всех системах CRISPR-Cas. Эти белки отвечают за вставку новых спейсеров, и, таким образом, процесс адаптации является достаточно консервативным. Известно, что экспрессия этих двух белков приводит к вставке новых спейсеров в CRISPR-кассету, однако их функции не до конца ясны [121].

Кроме белков Cas1 и Cas2 в процессе адаптации также принимают участие другие компоненты. Например, было показано, что Cas1 из *E. coli* взаимодействует с белками репарации и рекомбинации бактерии RecBCD и RuvB [122]. Также для адаптации могут требоваться дополнительные белки Cas, такие как Csn2, Cas4, Csa1 и Cas3 [119, 115].

2.2.5.2 Формирование направляющих crРНК

В процессе транскрипции CRISPR-кассеты формируется длинная молекула РНК, называемая pre-crРНК. В процессе созревания crРНК, pre-crРНК расщепляется в области повторов с помощью РНКазы III или гомологов Cas6 (Рисунок 13) [115].

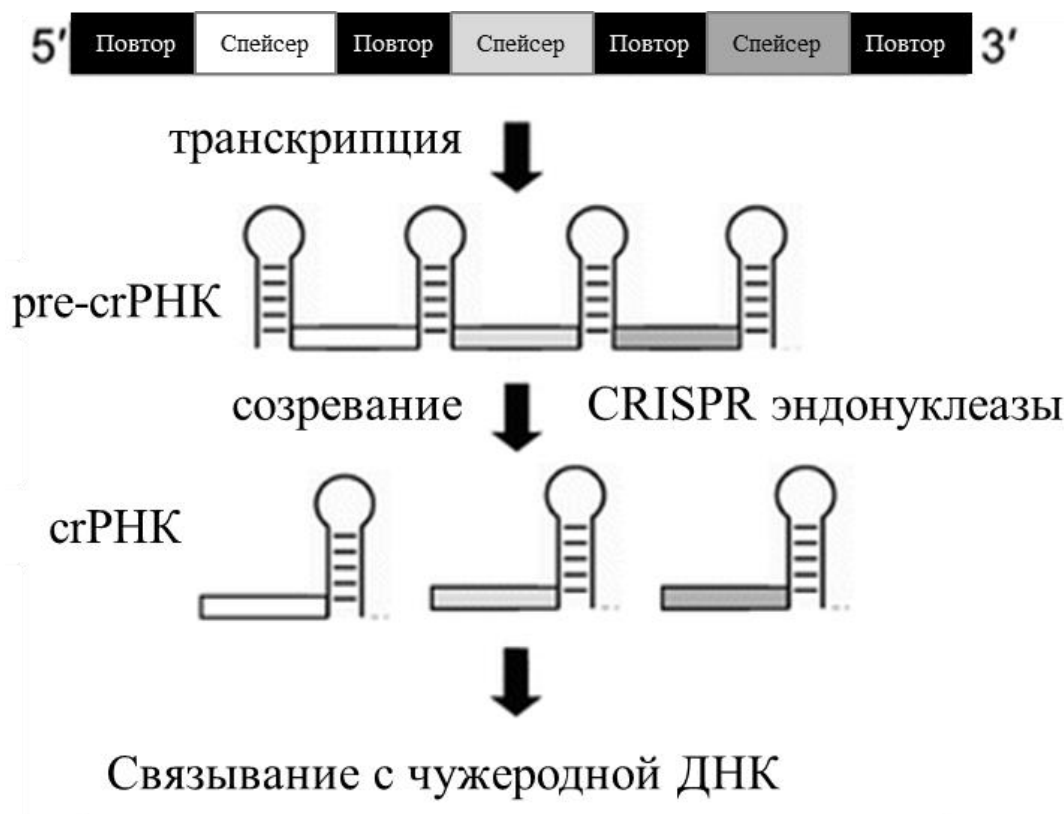


Рисунок 13. Процесс формирования crРНК [123]

Механизмы разрезания pre-crРНК в процессе образования crРНК отличаются для разных типов CRISPR-Cas систем. Например, в некоторых системах I и III типа используется белок Cas6, а crРНК сформирована из спейсера и шпильки, образованной повтором. В системах II-го типа механизм созревания crРНК совсем другой. Такие системы кроме CRISPR-кассеты и Cas-гонов кодируют tracrРНК (transactivating crРНК), состоящую из 25 пар оснований и комплементарную области повтора pre-crРНК. Две эти молекулы формируют двунитевую РНК, которая сначала разрезается РНКазой III клетки под руководством белка Cas9, который затем остаётся связанным с комплексом crРНК-tracrРНК. Далее 5' конец спейсера в crРНК отрезается другой нуклеазой и его финальная длина становится 20 нуклеотидов.

Зрелый комплекс crРНК-tracrРНК необходим для связывания с чужеродной ДНК (интерференции) [115].

После созревания crРНК происходит сборка комплекса Cas-белки +crРНК (crРНБ). Самым простым является комплекс crРНБ CRISPR-Cas систем II-го типа, состоящий из Cas9 белка и комплекса crРНК-tracrРНК [124], в то время, как для остальных систем характерно наличие большого количества Cas-белков [125, 126].

2.2.5.3 Интерференция

Связывание и деградация комплексом crРНБ ДНК мобильных генетических элементов состоит из нескольких этапов. Сначала происходит сканирование чужеродной ДНК, распознавание (своя или чужая ДНК), а также спаривание в области последовательности seed, располагающейся за последовательностью РАМ, и являющейся чрезвычайно важной для осуществления процесса интерференции. Для системы I-E из *E. coli* было показано, что изменение лишь одного нуклеотида в последовательности протоспейсера, располагающегося после РАМ в положениях 1-5 и 7-8, приводит к потере защитной функции CRISPR-Cas системы [127]. Протоспейсер с crРНК формируют двухцепочечную структуру, при этом каждый шестой нуклеотид такого дуплекса остаётся неспаренным [128].

Далее, в зависимости от типа систем, привлекаются нуклеазы или происходит активация нуклеазной активности комплекса.

2.2.6 Системы BREX

Ещё одной системой бактериального иммунитета является мало изученная система BREX (bacteriophage exclusion), работающая против широкого ассортимента как литических, так и умеренных бактериофагов. В начале 1980-х годов была открыта новая защитная система в *Streptomyces coelicolor* A3(2), действующая против бактериофага φC31, названная Pgl (phage growth limiting) [129]. Pgl состоит из четырёх генов: PglW, с предсказанной функцией протеинкиназы, PglX аденин-специфичная метилтрансфераза, PglZ является щелочной фосфотазой, а PglY предположительно имеет мотивы связывания и гидролиза АТФ/ГТФ [130]. Такая

система предполагает модификацию бактериофага в первом цикле инфекции, после чего в следующих циклах инфекции заражения не происходит (Рисунок 14). Молекулярный механизм работы данной системы до сих пор остаётся плохо изученным [131].

Рисунок 14. Схематичное изображение принципа работы системы Pgl [130]

Системы BREX отличаются от первоначально открытой Pgl системы, обеспечивая защиту от вируса уже в первом цикле заражения. Было показано, что система BREX из *Bacillus cereus*, открытая в 2014 году, действует на литические и

умеренные бактериофаги и не влияет на адсорбцию вируса, однако блокирует репликацию фаговой ДНК и лизогению. Также такая система имеет неабортный механизм действия [131].

Анализ бактериальных геномов показал, что разновидностей BREX систем существует гораздо больше, и их можно классифицировать в соответствии с последовательностью, числом и содержанием генов. Таким образом, на данный момент выделяют шесть основных подтипов систем BREX, состоящих из четырёх — восьми генов. Однако системы BREX являются чрезвычайно плохо изученными, и механизмы их работы и их отличия для разных подтипов систем остаются до конца неизвестными.

2.3 Флуоресцентные красители

Явление флуоресценции широко используется в биологических исследованиях на протяжении последних ста лет и позволяет визуализировать различные объекты, начиная от ДНК в агарозном геле, до флуоресцентных белков слияния, экспрессирующихся в живых клетках и дающих возможность следить за белками интереса в процессе жизнедеятельности изучаемого организма.

С помощью флуоресцентных красителей можно определять жизнеспособность клеток [133], количество окрашенного белка в клетке или её органелле, измерять уровень экспрессии каких-либо генов [134, 2]. Кроме того, с помощью флуорофоров можно определять количество ДНК, РНК или белка в образце. В классическом методе секвенирования по Сенгеру [28] для определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК ранее использовались радиоактивные метки, но в данный момент они также заменены флуоресцентными красителями.

Сегодня исследователям доступно большое количество методов флуоресцентного мечения для различных экспериментальных применений, и их число продолжает расти.

2.3.1 Явление флуоресценции

Впервые явление флуоресценции было описано в 1565 году Николасом Монардесом, который наблюдал его в настойке дерева *Lignum nephriticum* [135]. Дальнейшее описание флуоресцентных веществ продолжилось в XIX веке [136-138]. Флуоресцентные молекулы или флуорофоры представляют собой молекулы, в которых после поглощения фотона и перехода в возбуждённое состояние происходит излучательный переход из возбуждённого в основное состояние (Рисунок 15А). Время, необходимое для перехода из основного в возбуждённое состояние измеряется фемтосекундами [139].

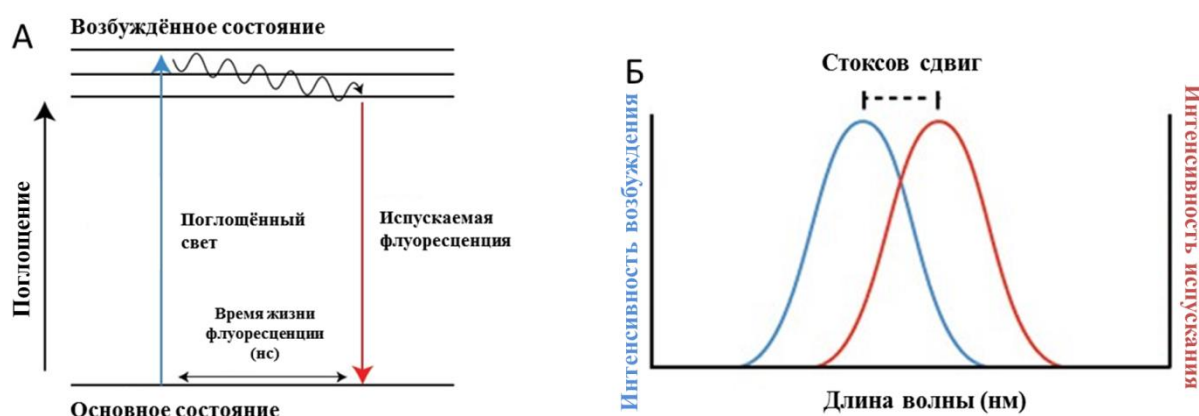


Рисунок 15. А. Явление флуоресценции, диаграмма Яблонского **Б.** Стоксов сдвиг между длиной волны возбуждения и испускания [140]

Так как часть энергии возбуждения рассеивается, излучаемый в процессе релаксации фотон всегда будет обладать меньшей энергией и, следовательно, большей длиной волны, чем возбуждающий (Рисунок 15Б). Это явление называется Стоксов сдвиг [141]. Таким образом, испускаемое флуорофором излучение можно отделить от возбуждающего с помощью набора светофильтров [139].

Для различных флуорофоров характерны свои спектры возбуждения и испускания и они, как правило, являются достаточно широкими. Возбуждение красителя любой длиной волны из спектра возбуждения приводит к испусканию, однако интенсивность сигнала будет отличаться. Интенсивность испускания

пропорциональна амплитуде спектра возбуждения на длине волны возбуждения (Рисунок 16).

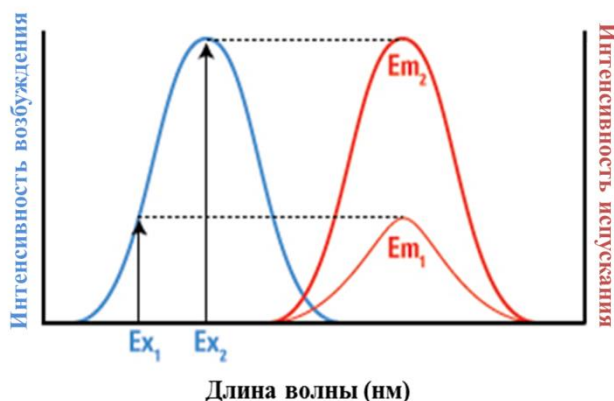


Рисунок 16. Зависимость интенсивности испускания флуорофора от длины волны возбуждения [140]

Яркость флуорофора пропорциональна коэффициенту молярной экстинкции и квантовому выходу и определяется произведением этих двух параметров. Коэффициентом молярной экстинкции ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$), представляет собой вероятность поглощения фотона красителем. Величина ϵ измеряется на длине волны, характерной для максимума поглощения. Чем выше значение ϵ , тем сильнее краситель поглощает. Органические флуорофоры обычно имеют значения ϵ в диапазоне от 25000 до 200000. Квантовый выход красителя ϕ представляет собой число испущенных фотонов, делённое на число поглощённых фотонов.

Все флуоресцентные красители могут быть разделены на две основные группы:

- Синтетические органические красители
- Флуоресцентные белки

Во флуоресцентной микроскопии визуализация различных клеточных органелл и молекул возможна в основном двумя способами: созданием генетических конструкций белка интереса с флуоресцентным белком или использованием синтетических красителей в сочетании с молекулами, связывающимися с определенными молекулами (например, антителами) для специфического

окрашивания каких-либо структур внутри клетки. В данный момент существует целый набор красителей, способных напрямую окрашивать некоторые клеточные структуры, такие как мембрана, ДНК, микротрубочки и некоторые другие.

2.3.2 Синтетические органические красители

Красители такого типа первыми стали использоваться применительно к биологии [142, 143]. Чтобы визуализировать белок интереса с помощью органических красителей, чаще всего используется метод иммуофлуоресцентного окрашивания, основанный на специфическом связывании изучаемого белка с флуоресцентно-меченными антителами к нему [144]. Данный метод широко распространён и является достаточно простым и быстрым, если необходимые антитела легко доступны. С его помощью можно изучать любые биологические образцы и он не оказывает влияния на функционирование белка интереса, как например, при использовании флуоресцентных белков слияния. Однако данный метод не применим для исследования живых клеток.

Окрашивание образца за счёт специфического связывания антиген-антитело можно осуществлять двумя способами: прямой и непрямой иммуофлуорисценцией [145].

Прямая иммуофлуоресценция является самым простым способом и основывается на связывании флуоресцентно-меченных антител напрямую с исследуемым белком.

Непрямая иммуофлуоресценция основана на связывании первичных, нефлуоресцентных антител с белком интереса, после этого к первичным антителам специфично связываются вторичные антитела, меченные флуоресцентным красителем. Такой метод используется гораздо чаще прямой иммуофлуоресценции, так как имеет свои преимущества: с каждым первичным антителом может связываться несколько вторичных, что увеличивает сигнал от объекта исследований, а, следовательно, и чувствительность метода. Также не требуется метить красителем

антитела к разным белкам, а можно использовать готовые коммерческие флуоресцентно-меченные вторичные антитела. Однако данная методика является гораздо более сложной и времязатратной.

На качество иммунофлуоресцентно-окрашенных изображений влияет целый набор факторов. Для хорошего соотношения сигнал/шум необходимо иметь качественные флуоресцентно-меченные антитела в хорошей концентрации, неспецифическое связывание антител может вызывать неправильную локализацию меченой структуры, а также может иметь место фотообесцвечивание образца.

Одним из распространённых органических красителей, который одним из первых был применён во флуоресцентной микроскопии и послужил основой для более современных красителей, является флуоресцеин изотиоцианат (FITC) с максимумом возбуждения 495 нм и максимумом испускания 517 нм. За счёт наличия изотиоцианатной группы ($-N=C=S$), которая может связываться с аминок-, тиоловой, имидазольной и некоторыми другими группами, флуоресцеином можно метить различные органические молекулы, включая антитела. Ещё одним красителем, который связывается с антителами по тому же принципу, что и флуоресцеин, является тетраметилродамин (TRITC) с максимумом возбуждения 550 нм и максимумом испускания 573 нм. Данные красители являются недорогими, но относительно слабыми и поэтому сейчас заменяются более яркими аналогами.

Другой группой органических красителей являются цианиновые красители. Они представляют собой молекулы, содержащие цепь из нечетного числа метиновых групп между двумя атомами азота с делокализованным зарядом и могут связываться с нуклеиновыми кислотами и белками посредством реакционных групп. К таким красителям относятся Cy2, Cy3, Cy5 и Cy7 и др.

Кроме представленных выше красителей, способных связываться с антителами и позволяющие тем самым производить иммунофлуоресценцию, существуют красители, связывающиеся исключительно с ДНК. Одним из таких наиболее распространённых красителей является DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол,

максимум возбуждения 358 нм, максимум испускания 461 нм), который связывается с А-Т богатыми участками ДНК [146]. После того, как этот флуорофор переходит из свободного в связанное с ДНК состояние, интенсивность его флуоресценции значительно увеличивается. Кроме того, при связывании DAPI с РНК, также возникает слабая флуоресценция с максимумом на длине волны 500 нм. Также DAPI обладает способностью проникать через клеточную мембрану и окрашивать ДНК в живых клетках.

Похожими по своим характеристикам на DAPI, но менее токсичными являются красители Hoechst 33258, Hoechst 33342 и Hoechst 34580, они также возбуждаются ультрафиолетовым излучением и способны проникать через клеточную мембрану [147, 148].

Можно выделить ещё один краситель ДНК: йодид пропидия (максимум возбуждения 538 нм, максимум испускания 617 нм). Данный краситель не способен проникать через неповреждённую мембрану клеток и таким образом может использоваться как индикатор мёртвых клеток в образце [149].

Ещё одним интересным красителем является Acridine Orange. Он может связываться с ДНК и РНК и имеет различные максимумы возбуждения и испускания в зависимости от того, с чем он связан. Для ДНК его максимум возбуждения равен 502 нм, а испускания 525 нм; для РНК 460 и 650 нм соответственно [150].

Кроме того, существуют красители, способные окрашивать отдельные клеточные элементы, такие как актин, митохондрии и др., а также индикаторы ионов кальция, натрия и калия в клетках [151].

2.3.3 Флуоресцентные белки

Открытие в начале 1960-х годов флуоресцентных белков значительно расширило область применения флуоресцентной микроскопии. С обнаружением и выделением зелёного флуоресцентного белка (GFP) (Рисунок 17) из медузы *Aequorea victoria* Осаму Симомурой [152], стало возможным применение методов молекулярного

клонирования для создания флуоресцентных белков слияния и дальнейшего их изучения методами флуоресцентной микроскопии, конфокальной микроскопии и микроскопии сверхвысокого разрешения. Позднее было создано огромное количество мутантов данного белка, испускающих свет в спектральном диапазоне от синего до жёлтого.

Зелёный флуоресцентный белок возбуждается светом в диапазоне от ультрафиолетового до синего и испускает зелёный свет. Ген данного белка был клонирован в 1992 году, а его кристаллическая структура была впервые определена в 1996 году [153].

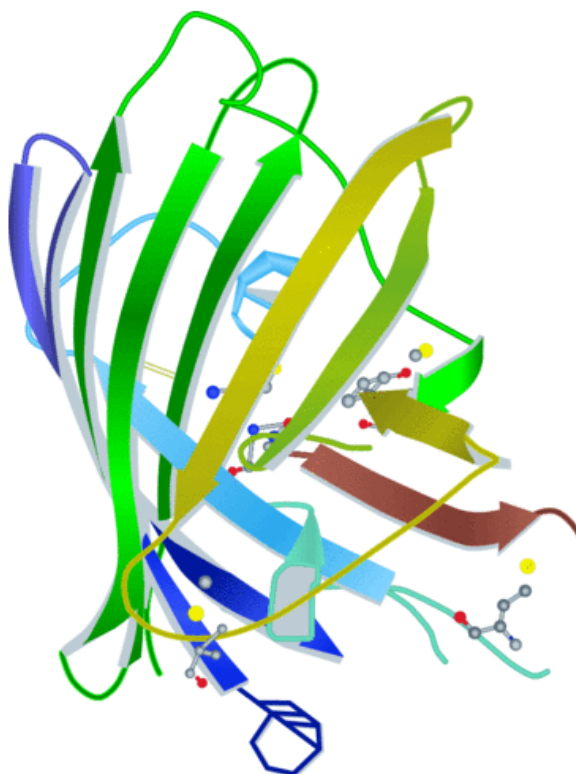


Рисунок 17. Молекула зелёного флуоресцентного белка (GFP) [154]

Он является сравнительно ярким и фотостабильным, однако также имеет и ряд недостатков, таких как чувствительность к рН и склонность к димеризации. Однако ряд мутаций позволил добиться уменьшения образования димеров. Флуоресцентный белок, претерпевший ряд генетических изменений, получил название усиленный

зелёный флуоресцентный белок или EGFP. Максимум возбуждения данного белка 488 нм вместо диапазона 395-475 нм для белка GFP дикого типа. Первым изменённым флуоресцентным белком был мутант Роджера Тисена, который отличался в пять раз большей яркостью, чем дикий тип GFP, и более коротким временем созревания [155]. Ещё одним мутантом зелёного флуоресцентного белка является белок Sapphire [156], отличающийся большим Стоксовым сдвигом (максимум возбуждения 399 нанометров, максимум испускания 511 нм).

Мутантами дикого типа зелёного флуоресцентного белка также являются синие флуоресцентные белки (EBFP) однако они отличаются меньшей яркостью. Их максимум возбуждения находится на длине волны 380 нм, а максимум испускания на длине волны 448 нм. Синими флуоресцентными белками с высоким квантовым выходом и хорошей фотостабильностью являются Azurite [157], SBFP2 и EBFP2 [158], а одним из самых не чувствительных к pH среды является белок Sirius [159].

Другой тип синих флуоресцентных белков, производных GFP - это голубые флуоресцентные белки (CFP). ECFP имеют бимодальные спектры возбуждения и испускания на длинах волн 433/445 нм и 475/503 нм соответственно, но их яркость составляет всего ~ 40% от яркости EGFP. Один из самых лучших по своим характеристикам вариантов ECFP с относительно высоким коэффициентом экстинкции и квантовым выходом является белок Cerulean [160].

Ещё одним мутантом GFP является жёлтый флуоресцентный белок (YFP) с максимумами возбуждения и испускания данного белка на 514 нм и 527 нм соответственно. Основной его особенностью является сильная чувствительность к pH; из-за этого его можно использовать в качестве pH-индикатора [161]. Однако один из мутантов YFP — Venus — обладает меньшей зависимостью от pH, а также коротким временем созревания [162].

Большинство флуоресцентных белков, рассмотренных выше, испускают свет в областях спектра от синей до жёлтой. Флуоресцентные же белки, испускающие в красной области спектра, были открыты русским учёным Лукьяновым С.А. в

коралловых полипах [163]. В красной области спектра автофлуоресценция намного меньше, кроме того, меньше оказывается и время созревания таких белков при 37 °С, а также возбуждение более длинноволновым светом наносит меньше вреда исследуемым живым клеткам, поэтому красные флуоресцентные белки имеют большое преимущество перед рассмотренными выше.

Одним из белков, открытых в коралловых полипах был DsRed (Рисунок 18) с максимумами поглощения и испускания 558 нм и 583 нм соответственно, который широко используется до сих пор [164]. Однако время его созревания больше, чем у GFP, кроме того, он с большой вероятностью образует олигомеры, что может приводить к неправильной интерпретации получаемых данных о функции и положении флуоресцентно-меченного белка.



Рисунок 18. Молекулярная структура белка DsRed [154]

Таким образом, данный флуоресцентный белок также был промодифицирован и получил множество разновидностей, таких как DsRed2, который менее склонен к образованию олигомеров и обладает более коротким временем созревания [165],

mRFP1[166], который имеет не тетрамерную, а мономерную структуру, а также мономерные белки серии mFruit [167, 168] с разными спектральными характеристиками, и названиями, определяющими длину волны их испускания (mHoneydew, mBanana, mOrange, mTangerine, mStrawberry и mCherry). Часто используемым белком из этой серии является, например, белок mCherry с максимумами возбуждения и испускания на длинах волн 587 нанометров и 610 нанометров соответственно и яркостью на 50% большей, чем у EGFP [168].

Таким образом, флуоресцентные красители самых разных классов широко используются применительно к биологии и их арсенал с каждым годом только увеличивается. С помощью таких красителей стало возможным выборочно и очень точно визуализировать отдельные клеточные структуры, окрашивать определённые белки, молекулы ДНК и РНК.

Глава 3. Материалы и методы

3.1. Изучение динамики возникновения белков рестрикции-модификации

Esp1396I в новой хозяйской клетке

В работе изучали модифицированную систему рестрикции-модификации Esp1396I, в которой метилтрансфераза (Esp1396I.M) слита с флуоресцентным белком Venus, а эндонуклеаза рестрикции (Esp1396I.R) с флуоресцентным белком mCherry (Рисунок 19). Нами было показано, что модифицированная система полностью функциональна и даёт такой же уровень защиты клеток от фага, как и не флуоресцентная СРМ Esp1396I. Кроме того белки слияния не подвергаются протеолизу, а интенсивность флуоресценции МТ::Venus и ЭР::mCherry является достаточной для анализа изменений их уровней в отдельных клетках методом флуоресцентной микроскопии.

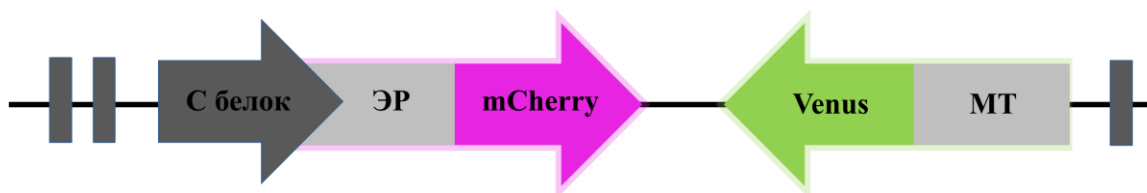


Рисунок 19. Схематическое изображение генов флуоресцентно-меченной CPM Esp1396I. Серыми прямоугольниками перед генами ЭР, С-белка и MT обозначены сайты связывания С-белка, отвечающего за регуляцию данной системы

3.1.1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Для экспрессии и последующего выделения белков использовался бактериальный штамм *E. coli* Rosetta (*E. coli* str. B F⁻ ompT gal dcm lon⁺ hsdSB(rB⁻mB⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]K-12(λS) pLysSRARE[T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL orip15A](CmR)). Для осуществления наблюдения процесса трансформации клеток *E. coli* флуоресцентно-меченной CPM Esp1396I использовались коммерческие высококомпетентные клетки *E. coli* (Евроген, эффективность трансформации 10¹⁰ на мкг плазмидной ДНК), штамм XL-1Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F[']proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]).

Бактерии культивировались в среде LB с добавлением антибиотика ампициллина.

Для экспрессии флуоресцентного белка в клетках (Venus или mCherry) ген данного белка клонировался в плазмиду pET21a под промотор бактериофага T7, индуцируемый лактозой. Для экспрессии флуоресцентного белка (Venus или mCherry), клетки росли в среде LB с добавлением 1 мМ ИПТГ.

В экспериментах использовалась флуоресцентно-меченная CPM Esp1396I_Fluo, клонированная в высококопийную плазмиду pUC19. CPM Esp1396I была получена из плазмиды pEsp1396, имеющей размер 5,6 тысяч пар оснований и найденной в бактериях *Enterobacter sp.*, штамм RFL1396 [104].

3.1.2. Проверка эффективности противовирусной защиты

Для проверки функциональности флуоресцентно-меченной CPM Esp1396I было проведено заражение клеток *E. coli* XL-1Blue без плазмид и с плазмидами pUC19, pUC19_Esp1396I, pUC19_Esp1396I_Fluo бактериофагом λ_{vir} . Клетки росли в течение ночи, после чего разбавлялись в 100 раз в свежей питательной среде LB с добавлением $MgSO_4$ и мальтозы и росли до $OD_{600} \approx 0,6$. Затем клетки высевались на чашки Петри с агаризованной средой LB в слой мягкого агара (0,4%). Далее производились десятикратные разведения бактериофага λ_{vir} , которые затем раскапывались на чашки Петри с бактериями. Чашки инкубировались ночь при $+37^\circ C$, после чего производился подсчет фаговых бляшек и расчет титра бактериофага для клеток с различными плазмидами.

3.1.3. Проверка стабильности белков слияния в клетках

Для оценки стабильности белков слияния MT::Venus и ЭР::mCherry в клетках, а также оценки концентраций очищенных белков слияния, необходимых для дальнейшей калибровки флуоресцентных изображений, применялась техника Вестерн-блоттинга.

Клетки *E. coli* XL1-Blue, несущие плазмиду pUC19_Esp1396I_Fluo выращивались до оптической плотности $OD_{600} \approx 0,6$, после чего осаждались центрифугированием, ресуспендировались в 500 мкл SDS-PAGE (Laemmli) буфера и кипятились 10 минут. Далее образцы центрифугировались и наносились (по 5 мкл) в 10% SDS полиакриламидный гель. После электрофореза белки переносились на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham). Мембрана инкубировалась с поликлональными кроличьими антителами, специфичными к белку mCherry (Abcam) или с моноклональными мышинными антителами, специфичными к белку Venus (Clontech). Далее образец инкубировался со вторичными антителами (Sigma) конъюгированными с пероксидазой хрена (антитела IgG козы к IgG кролика для mCherry, антитела IgG кролика к IgG мыши для Venus). Детектирование пероксидазной активности производилось с помощью SuperSignalTM West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Для определения относительных

концентраций флуоресцентных белков, мембраны были отсканированы с помощью системы ChemidocTM (Biorad) и с помощью Quantity One 1-D analysis software (Biorad) измерялись и сравнивались интенсивности одиночных полосок, соответствующих белкам. В качестве калибровки использовались различные разведения известных концентраций очищенных флуоресцентных белков Venus и mCherry.

3.1.4. Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентная микроскопия осуществлялась с помощью прямого микроскопа Zeiss AxioImager.Z1, оснащённого флуоресцентным блоком и разработанной нами инкубационной системой подающей поток подогретого воздуха в герметичный короб, закрывающий часть микроскопа, в которой находится образец. Для детектирования флуоресцентного сигнала Venus использовался набор фильтров Zeiss Filter set 10, а для детектирования флуоресцентного сигнала mCherry набор фильтров Semrock mCherry-40LP. Изображения детектировались с помощью ПЗС камеры с умножением электронов Photometrics CascadeII. Управление микроскопом производилось с помощью программы MicroManager [169], дополненного созданными нами скриптами для осуществления многоканальной и съёмки в течение длительного времени.

3.1.5. Калибровка интенсивности флуоресценции по отношению к количеству белка в клетках

Интенсивность флуоресценции одиночных бактерий, наблюдаемая при помощи флуоресцентного микроскопа, пропорциональна количеству молекул флуоресцентных белков в клетках, которое в свою очередь пропорционально количеству МТ и ЭР. Таким образом, сравнение флуоресцентных изображений бактерий позволяет сопоставить относительные количества ЭР и МТ 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, состоящая из нескольких этапов.

В качестве калибровочного образца использовались ночные культуры клеток *E. coli* Rosetta, несущие экспрессионные плазмиды pET21a_Venus или pET21a_mCherry и экспрессирующие по отдельности Venus и mCherry. Клетки росли в питательной среде LB с добавлением индуктора (1 mM IPTG), а также антибиотиков ампициллина (100 мкг/мл) и хлорамфеникола (25 мкг/мл).

Поглощение суспензии клеток, а также их титр под микроскопом измерялись следующим образом: клетки помещались в тонкую промываемую камеру, сформированную при помощи губной помады (от 5 до 15 мкм толщиной). За 10 минут клетки опускались на поверхность предметного стекла, часть клеток прилипала к покровному стеклу (порядка 10-20%). Далее оптическим способом измерялась толщина камеры (h) в каждой конкретной области (измерялось три раза положение по z , при котором в фокусе находились бактерии на верхнем и нижнем стекле, разность между этими величинами усреднялась и умножалась на коэффициент преломления среды в камере – PBS, $n = 1,334$). Затем производился подсчёт клеток на известной площади (S) на верхнем и нижнем стеклах (масштаб пикселя был откалиброван по 200 мкм шкале в камере Горяева) и их количество делилось на объем области, равной $S \cdot h$.

При помощи спектрофлуориметра регистрировалась флуоресценция белков Venus и mCherry в разбавленных суспензиях клеток, а также в клетках Rosetta без флуоресцентных белков. Для пересчёта интенсивности флуоресценции осуществлялась калибровка с очищенными белками известной концентрации в качестве стандартов. Концентрация белков была измерена спектрофотометрически ранее и в ходе эксперимента.

Под микроскопом регистрировались флуоресцентные изображения тех же клеток *E. coli* Rosetta, экспрессирующих белки Venus или mCherry, на основании которых вычислялась средняя интенсивность флуоресценции в расчете на одну клетку, которая затем делилась на измеренное при помощи спектрофлуориметра среднее количество молекул флуоресцентного белка на одну клетку. Отношение

этих двух величин показывает, какое количество условных единиц интенсивности приходится на одну молекулу белка. Далее эти величины используются для обработки изображений клеток с целью определения концентраций флуоресцентных белков Venus и mCherry в них.

3.1.6. Наблюдение за трансформацией клеток *E. coli* флуоресцентно-меченной CPM Esp1396I

Высококомпетентные клетки *E. coli* XL1-Blue (Евроген), использовавшиеся для обеспечения повышенной доли получивших плазмиду клеток, трансформировались плазмидой pUC19_Esp1396I_Fluo, несущей флуоресцентно-меченную CPM Esp1396I, по стандартному протоколу с незначительными изменениями. А именно после осуществления в течение 50 секунд теплового шока при 42°C, трансформационная смесь разбавлялась в 2 раза средой LB без антибиотика и инкубировалась при +37°C и помешивании с частотой 600 об./мин. в течение 30 минут. Далее 1 мкл суспензии с бактериальными клетками наносился в специализированную камеру (Рисунок 20) которая устанавливалась в микроскоп внутри инкубационного бокса, где поддерживалась температура +37 °C.

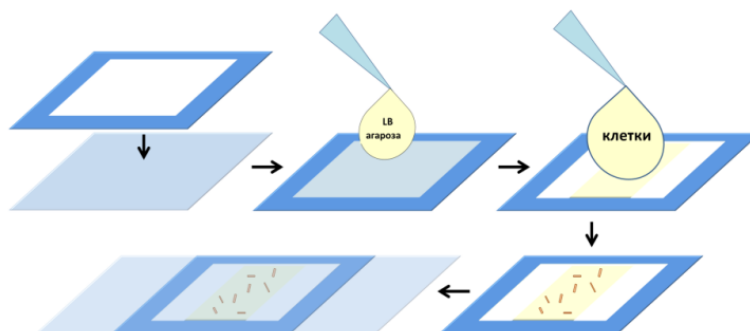


Рисунок 20. Процесс изготовления камеры для роста бактерий под микроскопом

Камера состояла из покровного стекла (24x24 мм, Menzel-Gläser), на которое наклеена рамка из двустороннего скотча (1,5 x 1,6 см, Gene Frame, Thermo Scientific). В образовавшееся углубление наносилось небольшое количество расплавленного 1,5% агарозного геля с добавлением 0,25% LB и ампициллина в концентрации 100 мкг/мл, затем конструкция придавливалась другим таким же

покровным стеклом. Антибиотик использовался для отбора трансформировавшихся клеток, а процентное содержание питательной среды LB в агарозе было подобрано таким образом, чтобы уменьшить скорость деления бактерий и дать им время выработать устойчивость к антибиотику. После застывания агарозы верхнее покровное стекло аккуратно отодвигалось, и с краёв полученной агарозной подложки вырезались две полосы для обеспечения нормальной аэрации бактерий. На полученную питательную подложку наносился 1 мкл трансформационной смеси, и после того как смесь впитывалась, камера герметично закрывалась другим более длинным покровным стеклом (24 x 60 мм, Menzel-Gläser).

Автофокусировка и автоматическая съёмка длительностью 12 часов производились с использованием разработанного нами скрипта для программы MicroManager [169]. Наблюдалось одновременно 30 полей зрения бактерий в проходящем свете и двух флуоресцентных каналах Venus и mCherry, при этом фотографирование этих полей производилось 1 раз в 15 минут в течение первых 2 часов, а затем 1 раз в 30 минут. За это время в успешно трансформировавшихся клетках появлялись белки Р-М системы, эти клетки делились и образовывали микроколонии.

3.1.7. Анализ изображений

Все полученные изображения обрабатывались в программе Fiji (ImageJ) [170]. Концентрации флуоресцентных белков Venus и mCherry определялись посредством измерения интенсивности флуоресценции одиночных клеток и её сравнения с данными калибровки.

3.2. Изучение влияния копийности плазмиды, несущей CPM Esp1396I, на эффективность защиты от вируса

Также были предприняты эксперименты для оценки влияния копийности плазмиды, несущей флуоресцентно-меченную CPM Esp1396I на концентрации белков CPM в клетках, а также на степень её защиты от вируса. Для этого CPM была

помещена на три плазмиды (pUC19, pBR322, pSC101), имеющие различную копийность.

3.2.1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Описанная выше СРМ переносилась также на плазмиды pBR322 и pSC101. Таким образом, в нашем распоряжении оказались три плазмиды, несущие флуоресцентно-меченную СРМ Esp1396I: высококопийная pUC19_Esp1396I_Fluo, среднекопийная pBR322_Esp1396I_Fluo и низкокопийная pSC101_Esp1396I_Fluo. Данные плазмиды были трансформированы в *E. coli* штамм DH5 α (*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) и использовались для всех дальнейших экспериментов.

3.2.2. Определение копийности плазмид, несущих флуоресцентно-меченную СРМ Esp1396I

Для того чтобы экспериментально определить копийность плазмид pUC19_Esp1396I_Fluo, pBR322_Esp1396I_Fluo и pSC101_Esp1396I_Fluo в наших экспериментах, использовался метод ПЦР в режиме реального времени. Детектировался флуоресцентный сигнал от ПЦР продукта, представляющего собой участок бактериального генома (ген ДНК-гиразы, встречается в геноме один раз), а также от ПЦР-продукта представляющего собой участок гена метилтрансферазы (также встречается на плазмиде только один раз). Таким образом, количество копий плазмиды в одной бактериальной клетке могло быть определено, как отношение ПЦР продуктов метилтрансферазы к ДНК-гирaze. Для построения стандартных кривых использовались серии разбавлений плазмиды pUC19_Esp1396I_Fluo и геномной ДНК клеток DH5 α известной концентрации.

Для получения 20 мкл ПЦР смеси использовалось 10 мкл 2х реакционной смеси (iTaQ™ Universal SYBR® Green Supermix), по 0,2 мкл прямого и обратного праймера и 9,6 мкл ДНК. Флуоресцентный сигнал от образцов детектировался в конце каждого этапа элонгации.

3.2.3. Оценка эффективности противовирусной защиты СРМ, находящейся на плаزمиде различной копийности.

Ночные культуры клеток *E. coli* DH5 α , несущие плазмиды pUC19_Esp1396I_Fluo, pBR322_Esp1396I_Fluo и pSC101_Esp1396I_Fluo, а также контрольные клетки без всяких плазмид росли в течение ночи, после чего разбавлялись в 100 раз в свежей питательной среде LB с добавлением MgSO₄ и мальтозы и снова росли до OD₆₀₀≈0,4-0,6. Затем клетки высевались на чашки Петри с агаризованной средой LB в слой мягкого агара (0,4%) с добавлением 100 мкг/мл ампицилина (кроме контрольных клеток), а также MgSO₄ и мальтозы. Далее производились десятикратные разведения бактериофага λ_{vir} , которые затем раскапывались на чашки Петри с бактериями. Чашки инкубировались ночь при +37°C, после чего производился подсчёт фаговых бляшек и расчёт титра бактериофага для клеток с плазмидами различной копийности, а также контрольных клеток.

3.2.4. Проверка метилирования бактериофага, преодолевшего защиту СРМ

Для проверки того, метилируется ли бактериофаг, прошедший через клетки с СРМ и преодолевший её защиту бактериофаг λ_{vir} был добавлен к свежим культурам клеток *E. coli* DH5 α (OD₆₀₀≈0,4-0,6), несущим плазмиды pUC19_Esp1396I_Fluo, pBR322_Esp1396I_Fluo и pSC101_Esp1396I_Fluo, а также контрольным клеткам без плазмид. Клетки росли при 37°C с интенсивным покачиванием до заметного лизиса культур. Далее культуры откручивались от дебриса и клеток, а супернатант, содержащий бактериофаг, отбирался. Далее повторялась процедура, аналогичная описанной в пункте 3.2.3.

3.2.6. Определение концентраций МТ и ЭР характерных для одиночных клеток, несущих СРМ на плазмиде различной копийности

Для определения концентраций МТ и ЭР клетках с СРМ, находящейся на плазмиде различной копийности бактериальные клетки *E. coli* DH5 α , несущие различные описанные выше плазмиды подвергались съёмке с помощью флуоресцентного микроскопа. Клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста

(OD₆₀₀≈0,4-0,6), фиксировались на агарозной подложке (1,5% агароза), находящейся между предметным и покровным стёклами, после чего производилась съёмка изображений в трёх каналах: во флуоресцентном канале Venus, во флуоресцентном канале mCherry, а также в режиме проходящего света.

Обработка изображений производилась аналогичным описанному в пункте 3.1.7. способом.

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

Также были предприняты эксперименты по изучению влияния искусственного смещения отношения концентраций белков СРМ Esp1396I в клетках на эффективность противовирусной защиты. Для этих целей один из флуоресцентно-меченных ферментов СРМ экспрессировался в клетках в дополнение к уже существующей в них защитной системе, находящейся на плазмиде pBR322_Esp1396I_Fluo.

3.3.1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Методами молекулярного клонирования были созданы генетические конструкции pACYCBad_R_fluo и pACYCBad_M_fluo, состоящие из плазмиды pACYC184, арабинозного промотора и белка слияния МТ::Venus или ЭР::mCherry соответственно. Данные плазмиды имеют устойчивость к хлорамфениколу и имеют ориджин совместимый с ориджином плазмид pUC19_Esp1396I_Fluo, pBR322_Esp1396I_Fluo и pSC101_Esp1396I_Fluo.

Полученные плазмиды были трансформированы в клетки *E. coli* DH5α совместно с плазмидой pBR322_Esp1396I_Fluo. Таким образом, были получены два типа клеток с СРМ, в которых можно контролируемо изменять концентрацию либо МТ либо ЭР.

3.3.2. Проверка полученных конструкций; индукция МТ или ЭР в клетках *E. coli* DH5α

После создания описанных в предыдущем пункте конструкций и их проверки с помощью секвенирования они трансформировались в химически-компетентные клетки *E. coli* DH5α по стандартной процедуре трансформации. Проинкубированные с плазмидой клетки втирались на чашку Петри с 20 мл 1,5% LB-агара, а также добавлением хлорамфеникола в концентрации 25мкг/мл для селекции и глюкозы в концентрации 0,4% для ингибирования экспрессии с арабинозного паромотора.

Из клонов с плазмидами pACYCBad_R_fluo и pACYCBad_M_fluo выращивались ночные культуры, которые затем разбавлялись свежей средой LB, растились до оптической плотности $OD_{600} \approx 0,3$, после чего клетки высевались в микроскопный слайд на агарозную подложку, содержащую также питательную среду LB и индуктор арабинозу в концентрации 1мМ. Далее образец помещался под инвертированный микроскоп Nikon Eclipse Ti-E, оснащённый самодельным инкубационным боксом, в котором поддерживалась температура 37°C. Съёмка изображений в двух каналах (в режиме проходящего света и во флуоресцентном канале Venus или mCherry в зависимости от того, экспрессия какого белка осуществляется) производилась каждые десять минут.

3.3.3. Индукция ферментов МТ или ЭР в дополнение к присутствующей в клетках СРМ

Химически-компетентные клетки *E. coli* DH5α трансформировались по стандартной процедуре двумя плазмидами pACYCBad_R_fluo и pBR322_Esp1396I_Fluo или pACYCBad_M_fluo и pBR322_Esp1396I_Fluo. Отбиралось по одному клону каждого типа клеток, после чего они растились ночь при 37°C с добавлением ампициллина (100мкг/мл) и хлорамфеникола (25мкг/мл), а также 0,4% глюкозы. Далее клетки разбавлялись в 100 раз в свежей среде LB с добавлением необходимых антибиотиков, после чего растились до оптической плотности $OD_{600} \approx 0,2-0,3$. Затем к культурам добавлялся индуктор (арабиноза) в различных концентрациях (1мкМ, 10мкМ, 100мкМ, 1мМ, 10мМ), после чего они

растились до оптической плотности $OD_{600} \approx 0,4-0,6$. Кроме того также выращивались контрольные клетки без системы CPM.

Далее клетки заражались вирусом для проверки эффективности CPM аналогичным описанному в пункте 3.1.2. способом.

3.4. Роль С-белка в регуляции CPM Esp1396I

Ещё одной важной задачей было изучение и визуализация роли С-белка в регуляции данной системы и его влияния на концентрации ЭР и МТ в клетках, а также на динамику их появления в новой хозяйской клетке.

3.4.1. Бактериальные штаммы и плазмиды

В данной части работы в качестве хозяйского штамма для всех экспериментов использовался описанный выше штамм *E. coli* DH5 α .

Для изучения и визуализации роли С-белка в CPM была создана генетическая конструкция, несущая CPM Esp1396I без регуляторного С-белка (pUC-MV). Для этого сначала из CPM были удалены гены МТ и ЭР чтобы избежать бесконтрольной экспрессии ферментов CPM, что может привести к деградации бактериального генома. Однако сдвига рамки считывания не происходило и таким образом, оставшиеся в конструкции флуоресцентные белки Venus и mCherry находились в одной рамке считывания с промоторами ЭР и МТ и имитировали их экспрессию, а С-белок также осуществлял регуляцию данной системы (конструкция pUC_CMV). Затем из данной конструкции также вырезался С-белок.

Кроме того была создана конструкция, несущая ген С-белка под контролем индуцируемого арабинозного промотора (pC) для его регулируемой экспрессии в клетках.

3.4.2. Проверка регуляторной роли С-белка в процессе появления CPM Esp1396I в новой бактериальной клетке

Высококомпетентные клетки *E. coli* DH5 α , приготовленные по протоколу «The Inoue method for preparation of competent *E. coli* “ultra-competent” cells»,

использовались для обеспечения повышенной доли получивших плазмиду клеток, трансформировались плазмидой pUC_CMV или pUC-MV, описанными выше по стандартному протоколу с незначительными изменениями описанными ранее. А именно после осуществления в течение 50 секунд теплового шока при 42°C, трансформационная смесь разбавлялась в 2 раза средой LB без антибиотика и инкубировалась при +37°C и помешивании с частотой 600 об./мин. в течение 30 минут. Далее 1 мкл суспензии бактериальных клеток наносился в микроскопную камеру, которая устанавливалась под микроскоп внутрь инкубационного бокса, где поддерживалась температура +37 °C.

Далее производилась съёмка изображений способом, аналогичным описанному в пункте 3.1.6.

3.4.3. Влияние концентрации С-белка на концентрации МТ и ЭР в клетках с CPM Esp1396I

Для того чтобы оценить влияние различного количества С-белка на концентрации МТ и ЭР, клетки *E. coli* DH5α трансформировались двумя плазмидами pUC-MV и pC по стандартной трансформационной процедуре. После этого трансформационная смесь высаживалась на чашку Петри с 20 мл 1,5% LB-агара, содержащего антибиотика ампициллин (100мкг/мл) и хлорамфеникол (25мкг/мл), а также 0,4% глюкозы для ингибирования экспрессии С-белка. Из полученных клеток выращивалась ночная культура, которая затем разбавлялась в 100 раз, растилась до оптической плотности $OD_{600} \approx 0,2$ и после чего индуцировалась различными концентрациями арабинозы (0,1 мкМ, 10мкМ, 0,13мМ, 13 мМ, 100мМ).

Далее клетки продолжали расти при +37°C и отбирались каждый час для наблюдения за интенсивностью их флуоресценции с помощью флуоресцентной микроскопии. Отобранные клетки помещались в микроскопный слайд на слой 1,5% агарозы, после чего фотографировались в трёх каналах (зелёный флуоресцентный канал (Venus), красный флуоресцентный канал (Cherry), а также в режиме проходящего света).

3.5. Наблюдение за процессом инфекции бактериофагом T7 клеток с CRISPR-Cas системой

Ещё одной активно изучающейся нами защитной системой бактерий является CRISPR-Cas система. В рамках данной работы изучалась динамика инфекции бактериофагом T7 клеток *E. coli* с включенной и выключенной I-E CRISPR-Cas системой, направленной на ранние, средние или поздние гены вируса. Процесс инфекции клеток бактериофагом был визуализирован с помощью длительной микроскопии живых клеток.

Бактериальные клетки с активной и неактивной CRISPR-Cas системой смешивались с бактериофагом T7 и помещались в микроскопный слайд на подложку из 1,5% агарозы с добавлением питательной среды LB. Для того чтобы осуществить одновременное наблюдение за разными типами бактерий, в агарозной подложке вырезалось две или более полосы (в зависимости от количества одновременно наблюдаемых образцов), а излишек агарозы между полосками удалялся для обеспечения хорошей аэрации и разделения образцов. Кроме того, для визуализации актов бактериальной смерти к образцу добавлялся красный флуоресцентный краситель йодид пропидия (Molecular Probes) в конечной концентрации 20 мкМ. Данный краситель способен проникать исключительно через повреждённую клеточную мембрану и таким образом флуоресценция возникает только в случае смерти бактерии.

Далее образец также помещался под прямой микроскоп Zeiss AxioImager.Z1, оснащённый инкубационным боксом, в котором поддерживалась температура +37°C. Одновременно наблюдалось от 4 до 10 полей зрения, которые фотографировались с интервалом в 5-10 минут в течение 1-4 часов в красном флуоресцентном канале (флуоресценция йодида пропидия) и в режиме проходящего света. Съёмка и обработка изображений производилась описанными выше способами.

3.6. Изучение некоторых механизмов работы BREX системы

В данной работе методами флуоресцентной микроскопии изучалась система BREX из *E. coli*. Были проделаны эксперименты по изучению процесса заражения, а также по изучению процесса индукции профага λ из клеток с BREX системой и без неё (BREX+ и BREX-).

3.6.1. Индукция профага λ из BREX- и BREX+ клеток

Бактериальные клетки *E. coli* BW25113 (F-, DE(araD-araB)567, lacZ4787(del)::rrnB-3, LAM-, rph-1, DE(rhaD-rhaB)568, hsdR514), заражались бактериофагом λ D-EYFP cI857, имеющим ген устойчивости к канамицину и способным встраиваться в геном бактерии, становясь профагом. Клетки-лизогены отбирались путём высадки инфицированных BW25113 на чашку Петри с 1,5% агарозой-LB и канамицином в концентрации 50 мкг/мл и инкубации при +30°C. Далее клетки с профагом трансформировались плазмидой с BREX системой или пустым контрольным вектором pBTB-2.

Полученные в результате BREX+ и BREX- лизогены растились до оптической плотности $OD_{600} \approx 0,4-0,6$, после чего помещались на 42°C на 20 минут для индукции профага из клеток. Затем к клеткам добавлялся красный флуоресцентный краситель йодид пропидия (Molecular Probes) в конечной концентрации 20 мкМ для более наглядной визуализации лизиса клеток. Непосредственно после этого бактерии наносились на подложку из агаризованной питательной среды LB в микроскопном слайде, аналогичном описанному выше, и помещались под микроскоп Zeiss AxioImager.Z1, оснащённый инкубатором, поддерживающим температуру +30°C. Флуоресцентные изображения в красном канале (флуоресценция йодида пропидия), в зелёном канале (флуоресценция бактериофага λ D-EYFP cI857) и в режиме проходящего света фиксировались один раз в 10 минут. Полученные изображения обрабатывались посредством подсчёта живых и мёртвых клеток на поле в каждый момент времени, а также оценки интенсивности флуоресценции клеток в зелёном флуоресцентном канале, характеризующем интенсивность размножения фага в клетках.

3.6.2. Наблюдение за инфекцией BREX- и BREX+ клеток бактериофагом λ вышедшим из BREX- или BREX+ клеток

Бактериофаг λ D-EYFP cI857 вышедший из клеток BREX- и BREX+ использовался также для наблюдения за инфекцией BREX- и BREX+ клеток.

Свежие культуры BREX- /BREX+ клеток с оптической плотностью $OD_{600} \approx 0,4-0,6$ смешивались с бактериофагом λ D-EYFP cI857 вышедшим из BREX+ или BREX- клеток, после чего к суспензии добавлялся краситель йодид пропидия. Далее 1 мкл каждого образца помещался на агарозную подложку в микроскопную камеру, специально подготовленную для одновременного наблюдения четырёх различных образцов (*E. coli* BREX+ λ_{BREX} ; *E. coli* BREX- λ_{BREX} ; *E. coli* BREX+ λ_{pBTV} ; *E. coli* BREX- λ_{pBTV}). Далее камера помещалась под микроскоп где находилась при температуре +37°C. Несколько полей зрения каждого из четырёх образцов фотографировались один раз в 5-10 минут.

Глава 4. Результаты и обсуждение

4.1. Динамика возникновения белков системы рестрикции-модификации Esp1396I в новой хозяйской клетке

Проверки эффективности защиты флуоресцентно-меченной СРМ Esp1396I R-M показала, что данная система полностью сохраняет свою активность и защищает клетки от вируса также эффективно, как и система дикого типа (Рисунок 21А). При этом эффективность инфекции клеток с СРМ, находящейся на плазмиде pUC19 оказывается на 4 порядка ниже, чем характерная для клеток без плазмид или с пустым вектором pUC19.

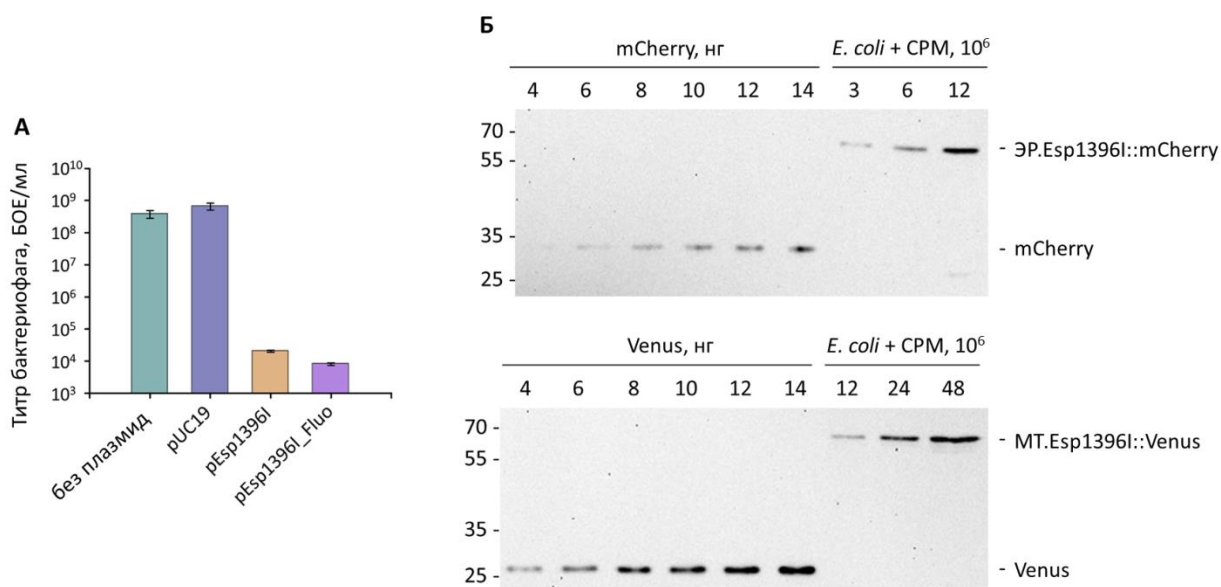


Рисунок 21. А. Титр бактериофага λ на клетках без плазмид, с пустой плазмидой pUC19, с CPM Esp1396I дикого типа, находящейся на плазмиде pUC19 и с флуоресцентно-меченной CPM Esp1396I также находящейся на плазмиде pUC19. **Б.** Вестерн-блот клеточных лизатов, содержащих плазмиду pUC19_Esp1396I_Fluo (*E. coli* + CPM). В качестве контроля представлены различные разведения очищенных флуоресцентных белков Venus и mCherry с известной концентрацией

Кроме того, анализ Вестерн-блотов, полученных для лизатов клеток, несущих плазмиду pUC19_Esp1396I_Fluo показал, что миграция mCherry и Venus соответствует размеру ≈ 60 кДа (Рисунок 21Б). Этот размер соответствует слиянию флуоресцентного белка с МТ или ЭР. В то же время видно, что полоса в районе миграции очищенных флуоресцентных белков отсутствует, что говорит об отсутствии деградации белков слияния. Также интенсивность полос, соответствующая разбавлениям очищенных флуоресцентных белков и известное количество наносимого фагового лизата позволили предположить примерное количество МТ::Venus и ЭР::mCherry в клетках и оно составило ≈ 6000 и $\approx 30\,000$ молекул на клетку культуры, находящейся в фазе экспоненциального роста соответственно.

Также с помощью калибровки, проведённой для определения интенсивности флуоресценции одиночных молекул флуоресцентных белков, удалось определить абсолютные количества Venus и mCherry в одиночных клетках, несущих плазмиду pUC19_Esp1396I_Fluo. Данные значения также отражают концентрации МТ и ЭР в клетках. Таким образом, среднее количество МТ::Venus на одну клетку составило 12700 ± 400 молекул, а ЭР::mCherry составило 25600 ± 700 , что хорошо согласуется со значениями, полученными нами с помощью Вестерн-блоттинга (Рисунок 22).

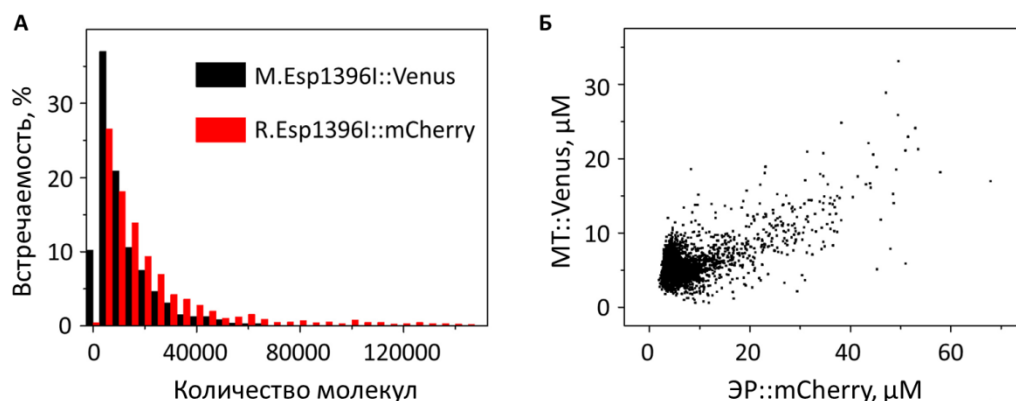


Рисунок 22. А. Распределение клеток по количествам молекул МТ и ЭР в них. **Б.** Корреляция между МТ и ЭР в клетках

Контрольные эксперименты по наблюдению за клетками с СРМ, обработанными рифампицином или хлорамфениколом (бактериостатики) показали, что фотообесцвечивание Venus и mCherry было незначительным в течение времени эксперимента (Рисунок 23).

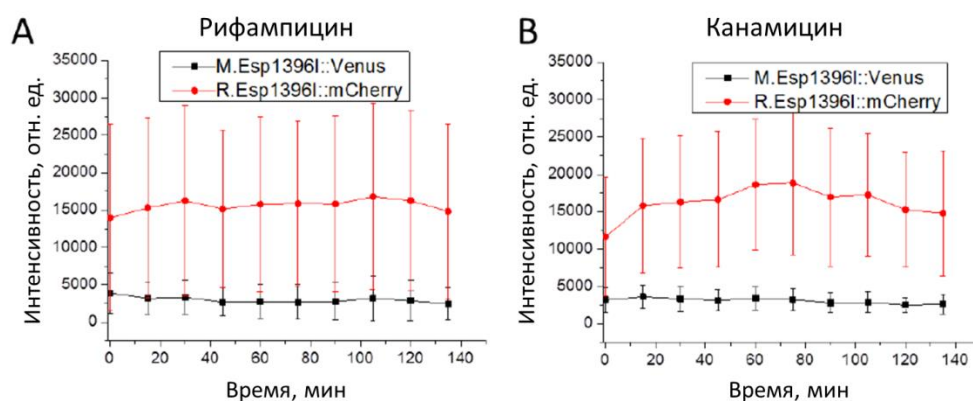


Рисунок 23. Проверка скорости фотообесцвечивания белков слияния МТ::Venus (чёрный) и ЭР::mCherry (красный). **А.** При обработке клеток рифампицином. **Б.** При обработке клеток канамицином

После трансформации в клетки *E. coli* XL-1 Blue плазмиды рUC19_Esp1396I_Fluo появление СРМ в новой хозяйской клетке наблюдалось под микроскопом на уровне одиночных клеток. Несмотря на то, что только небольшая часть клеток получала плазмиду (менее 0,01%), в одном эксперименте удавалось наблюдать за несколькими десятками актов трансформации одиночных клеток, а также за их судьбой на протяжении нескольких часов.

В процессе формирования микроколонии, флуоресценция Venus (белок слияния МТ::Venus) появлялась первой и могла быть детектирована, когда трансформированная микроколония состояла из 1-2 клеток (Рисунок 24А.). Когда флуоресценция Venus становилась детектируемой, количество молекул МТ::Venus в одной клетке составляло приблизительно 400 штук. Таким образом, до определённого времени (когда в микроколонии было приблизительно 16-32 клетки), детектировалась исключительно флуоресценция Venus. Флуоресценция mCherry (белок слияния ЭР::mCherry) же начинала появляться с задержкой в 30-60 минут относительно появления флуоресценции Venus (Рисунок 24Б.). Когда флуоресценция mCherry становилась детектируемой, в одиночных клетках также находилось приблизительно 400 молекул белка слияния ЭР::mCherry. В течение времени эксперимента измерялась флуоресценция индивидуальных клеток, после

чего строилась её зависимость от времени (Рисунок 24В). Кривая зависимости средней концентрации МТ::Venus на клетку от времени имеет явно выраженный пик с максимумом на 150-250 минутах после трансформации, после чего имеет место резкое уменьшение концентрации к значению, характерному для стабильно трансформированных клеток. Накопление ЭР::mCherry имеет абсолютно другой, более медленный и монотонный характер. Пик флуоресценции МТ::Venus достигается как раз перед тем, как флуоресценция ЭР::mCherry становится детектируемой.

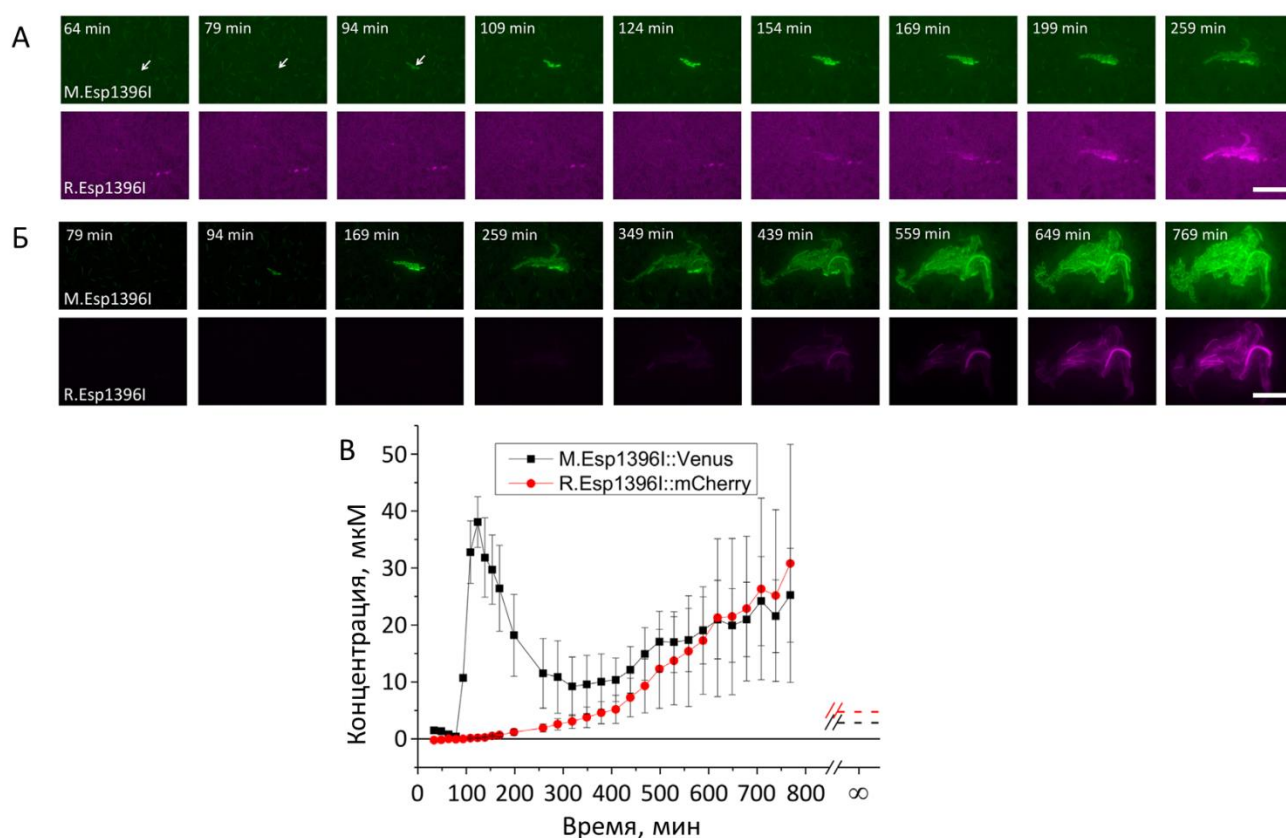


Рисунок 24. Динамика появления и накопления МТ и ЭР в отдельных трансформировавшихся клетках *E.coli*; **А, Б.** серии изображений, иллюстрирующие динамику появления МТ (зелёным) и ЭР (фиолетовым); **В.** Зависимости средней концентрации МТ и ЭР в клетках от времени. Пунктирной линией на графике указаны концентрации ЭР и МТ в стабильно трансформированных клетках. Шкала 20 мкм

Также в процессе трансформации не все клетки, формирующие микроколонию, могли нормально расти и делиться. Количество таких клеток составляет менее 1% от всей популяции. Среди них были обнаружены три типа атипичных бактерий. Первый тип представлял собой удлинённые клетки, имеющие аномально высокую концентрацию ЭР::mCherry, по-видимому, могут вызывать повреждение ДНК клетки (Рисунок 25А). Другой вид атипичных клеток выделяется аномально высокой концентрацией МТ::Venus. Такие клетки также не делятся, но остаются при этом короткими (Рисунок 25Б). Ранее было показано, что избыток метилтрансферазы по непонятным причинам также является токсичным для клетки [171]. Третий вид атипичных клеток содержал, как правило, высокие концентрации обоих ферментов. Они также удлиняются и со временем подвергаются клеточному лизису (Рисунок 25В). Предполагается, что такие клетки могут возникать из-за нарушения в регуляции экспрессии генов CPM Esp1396I или стохастические вариации в копийности плазмиды, несущей данную систему [172].

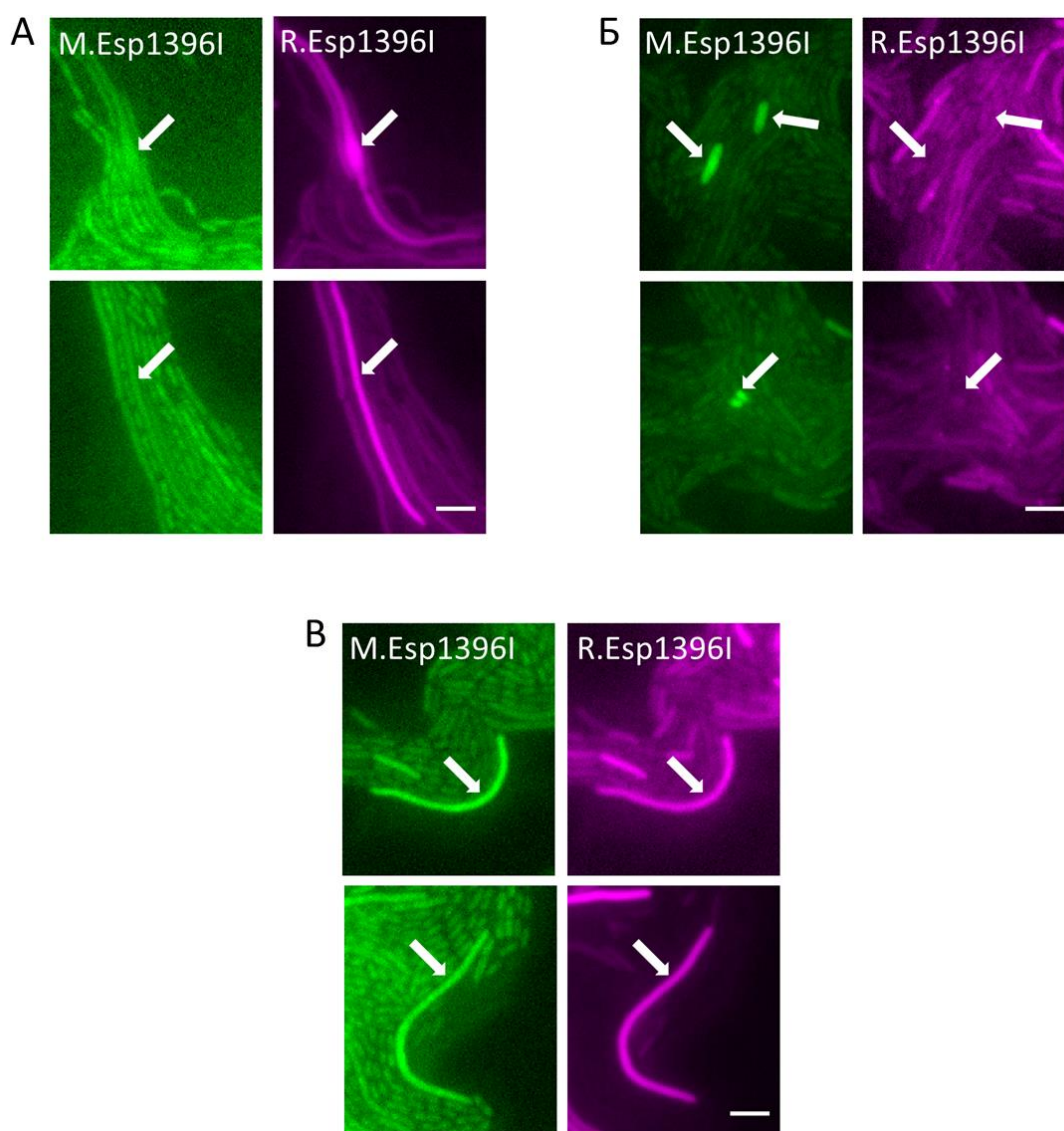


Рисунок 25. Атипичные клетки, встречающиеся в микроколониях клеток, трансформированных плазмидой pUC19_Esp1396I_Fluo. **А.** Клетки с аномально высокой концентрацией эндонуклеазы рестрикции. **Б.** Клетки с аномально высокой концентрацией метилтрансферазы. **В.** Клетки с аномально высокой концентрацией обоих ферментов. Шкала 20 мкм

4.2. Количественное моделирование динамики появления белков СРМ

Esp1396I в новой хозяйской клетке

Динамика экспрессии МТ и ЭР в новой хозяйской клетке в первый момент после её трансформации плазмидой pUC19_Esp1396I_Fluo значительно отличается друг от друга. Для данного процесса было выполнено моделирование, учитывающее все

имеющиеся знания о регуляции транскрипции системы рестрикции-модификации Esp1396I С-белком и динамике экспрессии белков в эксперименте.

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. Экспериментальные данные о регуляции транскрипции в рассматриваемой Р-М системе дают следующую информацию [103]: промоторы оперона С-белок-ЭР и гена МТ имеют по одному сайту связывания РНК-полимеразы (РНКП). При этом промотор С-ЭР 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 МТ имеет всего один сайт связывания, с которым может связываться димер С-белка, тем самым это приводит к репрессии транскрипции МТ.

Кроме того, в модели учитывается полученная экспериментально скорость деления клеток, которая отражает процесс накопление и “разбавление” транскриптов и белков.

Деление бактериальных клеток также является одним из важных факторов, которые влияют на количество транскриптов и белков в клетке, а также на степень их разбавления. Видно (Рисунок 26А), что кривая роста бактерий в процессе формирования микроколонии из трансформировавшейся клетки имеет два интервала. Скорость деления клеток постоянна в первые ≈ 160 минут эксперимента и через ≈ 200 минут после его начала, а между двумя этими интервалами происходит резкий переход. Таким образом в первом интервале клетки делятся приблизительно один раз в 40 минут, тогда как во втором это время увеличивается до ≈ 320 минут. Причина этого переходя не до конца понятна и, по-видимому, может быть связана с истощением питательной среды LB в агарозной подложке [173].

Термодинамическая модель регуляции транскрипции С-ЭР и МТ основывается на классической модели Шеа-Акерса [174]. А именно, транскрипционная активность промотора пропорциональна отношению вероятностей активных конфигураций, при которых РНКП связывается с промотором. Таким образом, транскрипционную активность промотора оперона С-ЭР можно представить в следующем виде:

$$\phi_r(C) = \alpha \frac{a + b[C]^2}{1 + a + b[C]^2 + c[C]^4} \quad (1)$$

Где α – коэффициент пропорциональности; a – вероятность связывания РНКП с промотором; $b[C]^2$ – вероятность образования комплекса: С-белок, связанный с дистальным сайтом и РНКП с промотором; $[C]^4$ – вероятность связывания С-белка с дистальным и проксимальным сайтами одновременно; константы a , b и c характеризуют энергии взаимодействия и концентрации РНКП.

Выражение для транскрипционной активности промотора МТ можно записать в следующем виде:

$$\phi_m(C) = \beta \frac{f}{1 + f + g[C]^2} \quad (2)$$

Где β – коэффициент пропорциональности; f – вероятность связывания РНКП с промотором; $[C]^2$ – вероятность репрессии транскрипции за счёт связывания димера С-белка со своим сайтом.

Экспрессия транскриптов С-ЭР (r) и изменение количества С и ЭР белков описывается следующими уравнениями:

$$\frac{r}{t} = \phi_r(C) - \lambda_r r \quad (3)$$

$$\frac{C}{t} = k_C r - \lambda_C C \quad (4)$$

$$\frac{R}{t} = k_R r - \lambda_R R \quad (5)$$

Где k_C и k_R – скорости трансляции белков С и ЭР, а λ_r , λ_C и λ_R – скорости распада транскриптов СЭР и белков С и ЭР.

То же для метилтрансферазы:

$$\frac{m}{t} = \phi_m(C) - \lambda_m m \quad (6)$$

$$\frac{C}{t} = k_M m - \lambda_M M \quad (7)$$

Где k_M – скорость трансляции, а λ_m и λ_M – скорости деградации транскриптов и белков соответственно.

Из решения уравнений 3-5 была построена модель для ЭР, имеющая хорошее качественное и количественное согласование с экспериментальными данными (Рисунок 26В). Это соответствие выполнимо, только в том случае, когда транскрипты и сам флуоресцентный белок ЭР::mCherry стабильны и их спад в клетке происходит только, а результате разбавления в процессе деления.

Решение уравнений 6-7, позволило определить динамику МТ (Рисунок 26Б). Моделирование процесса появления и накопления МТ хорошо согласуется с экспериментальными данными только в первые ≈ 160 минут. 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 несоответствие. Видно, что для модели характерно увеличение количества метилтрансферазы в интервале между 160 и 300 мин, что является следствием увеличения эффективности транскрипция и стабильность белка из-за увеличения время деления клеток и, следовательно, уменьшения разбавления. Уменьшение же МТ::Venus после ≈ 300 минут скорее всего обусловлено увеличением количества С-белка, подавляющего экспрессию метилтрансферазы.

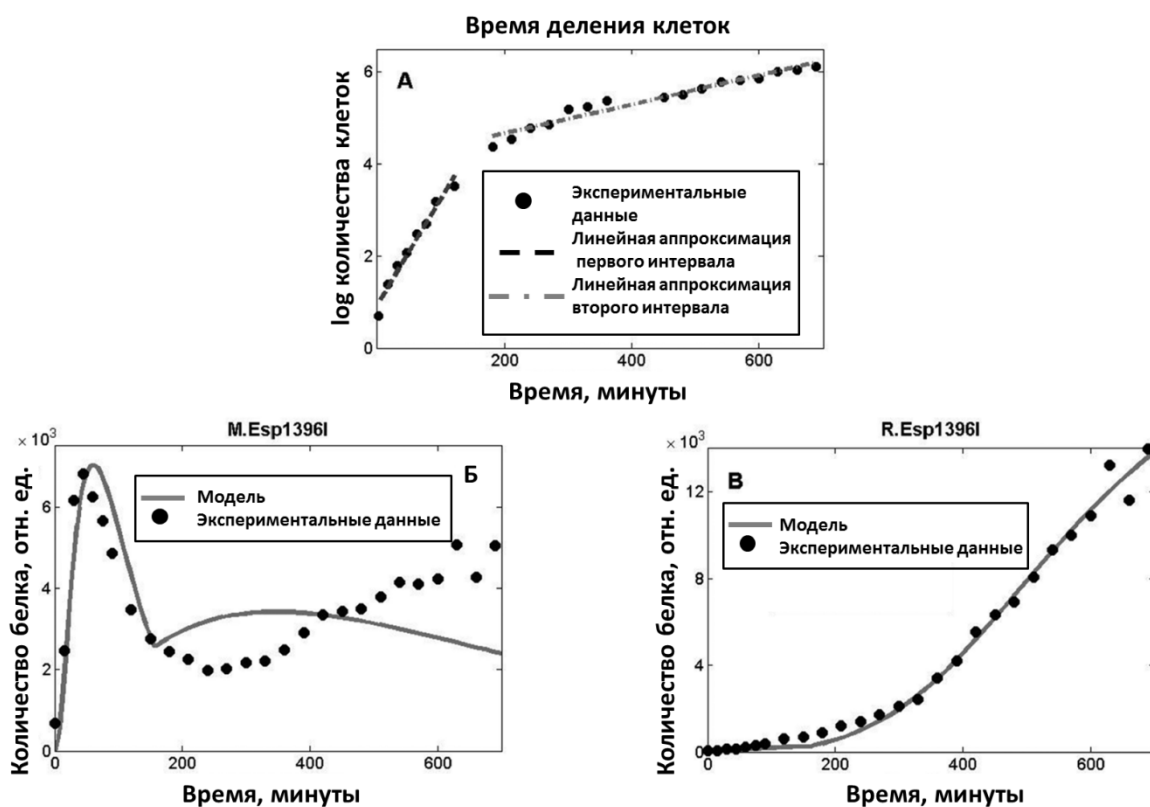


Рисунок 26. А. Кривая роста бактерий в микроколонии в процессе эксперимента. Б. Динамическое моделирование накопления белков Р-М системы Esp1396I в одиночных трансформировавшихся клетках. Сравнение экспериментальных данных с моделированием динамики экспрессии МТ. В. Сравнение экспериментальных данных с моделированием динамики экспрессии ЭР

4.3. Влияние копийности плазмиды, несущей CPM Esp1396I на эффективность её защиты от вируса

Для экспериментального определения копийности плазмид, несущих флуоресцентно-меченную систему РМ Esp1396I был использован метод ПЦР в режиме реального времени. Определение копийности плазмид осуществлялось по флуоресцентным сигналам, полученным от ПЦР-фрагментов исследуемых плазмид, а также от фрагментов бактериального генома. Было получено, что в условиях нашего эксперимента плазмиды 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.

Далее была проведена оценка эффективности противовирусной защиты, характерной для системы РМ, находящейся на плазмидах различной копийности. Было показано, что для системы РМ на плазмиде pUC19_Esp1396I_Fluo заражение бактериофагом λ осуществляется на 4-5 порядков хуже, чем для контрольных клеток без защитной системы. Для плазмид pBR322_Esp1396I_Fluo и pSC101_Esp1396I_Fluo характерно ухудшение защиты на 2 и 3-3,5 порядка по сравнению с плазмидой pUC19_Esp1396I_Fluo соответственно. В Таблица 1 представлен типичный титр бактериофага на клетках, содержащих разные плазмиды, несущие флуоресцентно-меченную систему рестрикции-модификации Esp1396I.

Таблица 1. Титр бактериофага на клетках с различными плазмидами

Плазида	Титр бактериофага, БОЕ/мл
pUC19	$7,3 \times 10^9$
pUC19_Esp1396I_Fluo	$4,8 \times 10^5$
pBR322	$8,1 \times 10^9$
pBR322_Esp1396I_Fluo	$1,7 \times 10^7$
pSC101	$7,9 \times 10^9$
pSC101_Esp1396I_Fluo	$4,1 \times 10^9$

Также для разных плазмид, несущих СРМ была проведена проверка метилирования бактериофага, преодолевшего защиту системы. Было показано, что независимо от того, какой уровень защиты от вируса обеспечивает плазида, несущая систему рестрикции-модификации, фаговое потомство, преодолевшее действие данной системы оказывается модифицированным и одинаково хорошо заражает защищённые клетки.

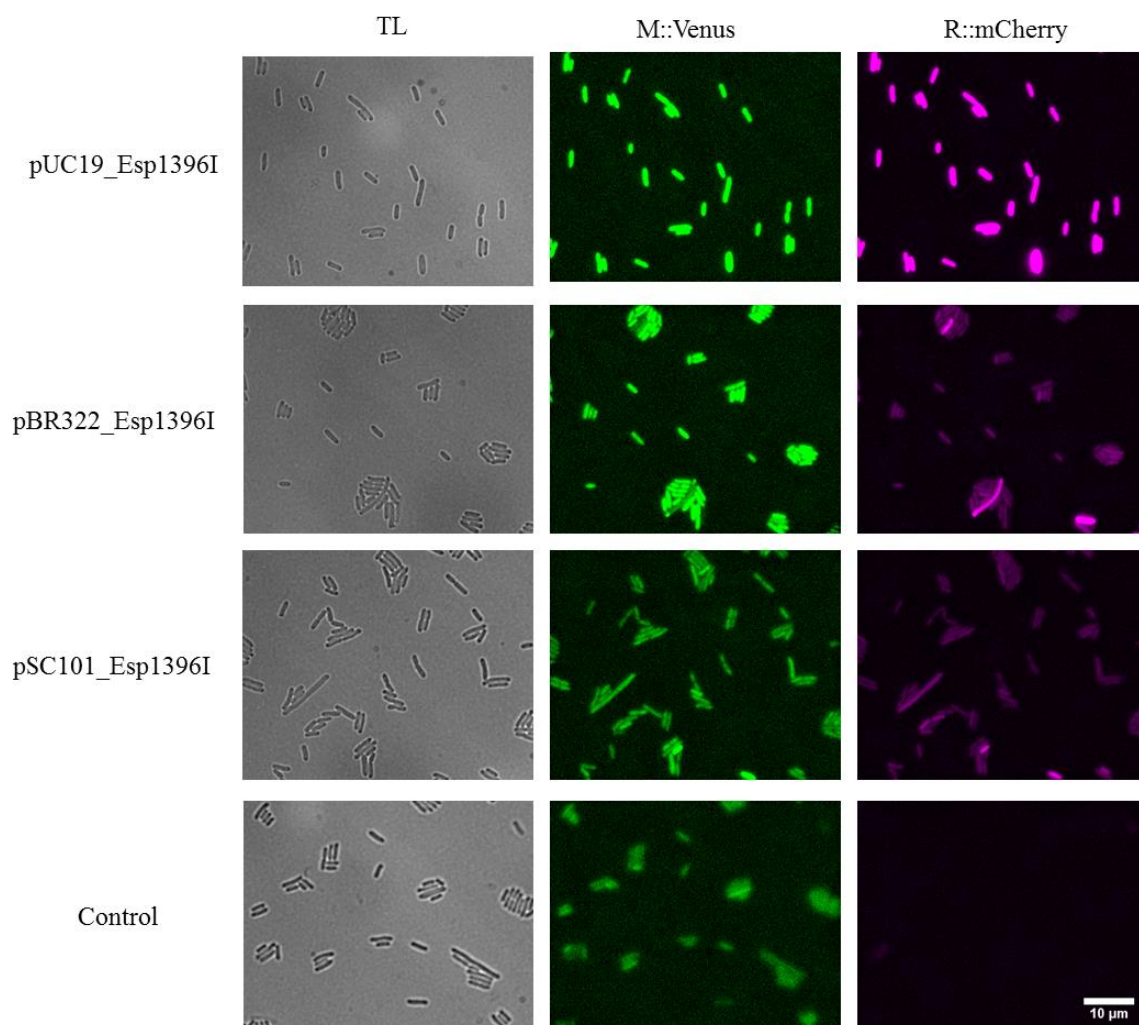


Рисунок 27. Изображения клеток *E. coli*, несущих систему рестрикции-модификации Esp1396I_Fluo на плаزمидях высокой (pUC19), средней (pBR322), низкой (pSC101) копийности, а также контрольные клетки (Control) без флуоресцентных белков (в канале Venus наблюдается автофлуоресценция). TL – изображение в проходящем свете, M::Venus (зелёным) – канал флуоресценции белка Venus, R::mCherry (фиолетовым) – канал флуоресценции белка mCherry. Изображения имеют одинаковый контраст

Далее нами были получены флуоресцентные изображения клеток, несущих флуоресцентно-меченную систему рестрикции-модификации на плазмидях различной копийности (высокой, средней и низкой). Изображения представлены на Рисунок 27. Анализ изображений и измерение количества белков МТ::Venus и ЭР::mCherry в одиночных бактериальных клетках показал, что их количества, а

также отношение МТ/ЭР значительно отличаются для плазмид различной копияности. Из Рисунок 28А, Б видно, что наибольшие концентрации МТ::Venus и ЭР::mCherry наблюдаются в клетках с плазмидой высокой копияности (pUC19_Esp1396I_Fluo), тогда как наименьшие оказываются в клетках с плазмидой низкой копияности (pSC101_Esp1396I_Fluo). Кроме того, из рисунка 28В видно, что отношение количества МТ/ЭР в клетках существенно отличается для различных плазмид и растёт с уменьшением их копияности. Также видно (Рисунок 28Г), что с уменьшением копияности плазмиды и ростом отношения МТ/ЭР значительно ухудшается эффективность защиты системы рестрикции-модификации от вируса.

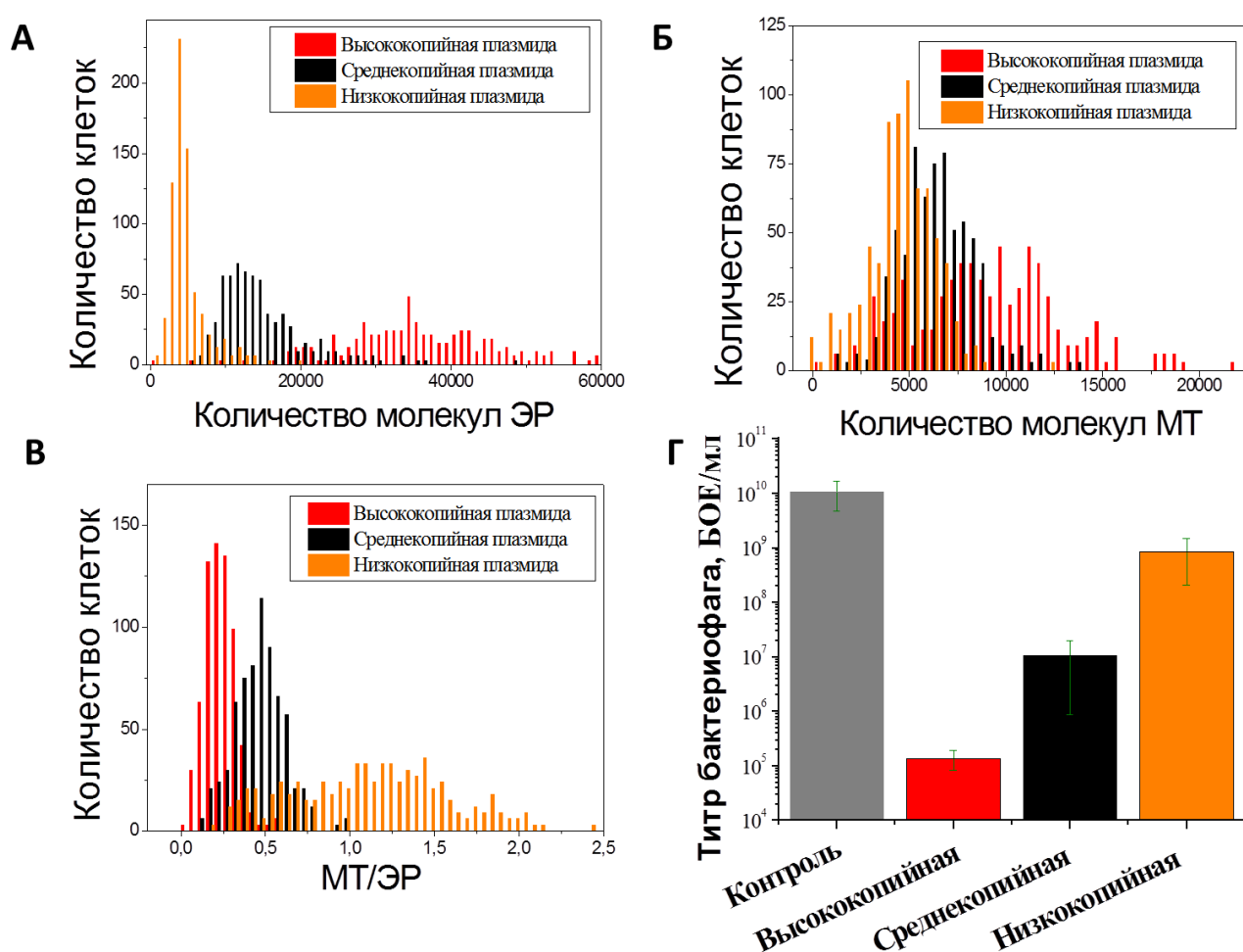


Рисунок 28. А, Б. Распределение клеток с высококопийной, среднекопийной и низкокопийной плазмидами (pUC19_Esp1396I_Fluo, pBR322_Esp1396I_Fluo и pSC101_Esp1396I_Fluo соответственно) по количествам ЭР и МТ. В. Отношение количества МТ к количеству ЭР рестрикции в одиночных клетках с высококопийной, среднекопийной и низкокопийной плазмидами Г. Титр λ

бактериофага на клетках без системы рестрикции-модификации, а также на клетках с высококопийной, среднекопийной и низкокопийной плазмидами

4.4 Влияние искусственного сдвига отношения МТ/ЭР в клетках на эффективность их защиты от вируса

В предыдущем пункте был показан сдвиг в большую сторону отношения МТ/ЭР в клетках со слабой противовирусной защитой (pSC101_Esp1396I_Fluo), однако остаётся непонятным, что играет ключевую роль в изменении уровня защиты: отношение концентраций белков системы рестрикции-модификации или просто их уменьшение.

Для оценки влияния сдвига отношения МТ/ЭР в клетках на защиту от вируса были созданы генетические конструкции pACYCBad_R_fluo и pACYCBad_M_fluo, позволяющие нарабатывать один из белков СРМ в клетках (Рисунок 29).

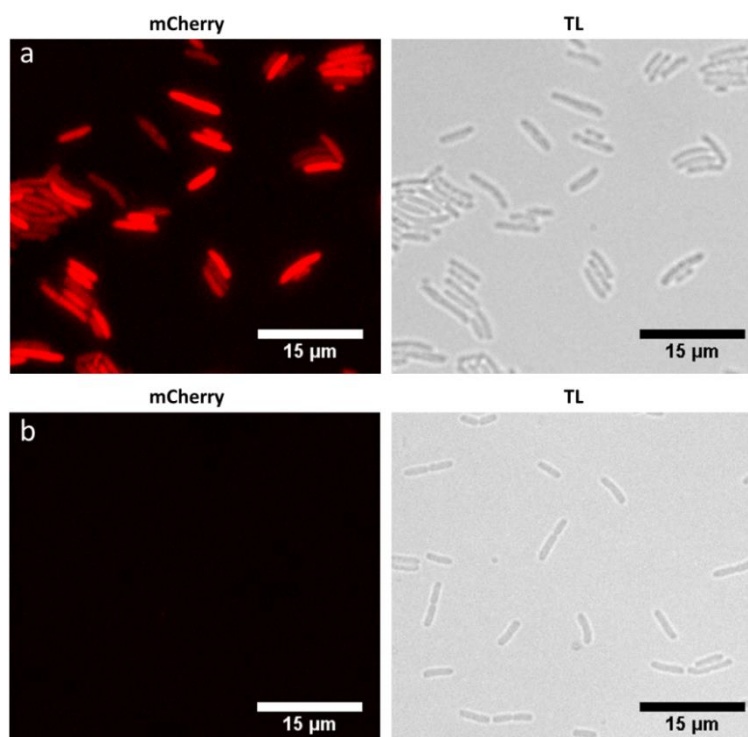


Рисунок 29. Проверка экспрессии флуоресцентно-меченной эндонуклеазы рестрикции в клетках *E. coli*. **А.** Флуоресцентное изображение (mCherry), а также изображение в режиме проходящего света (TL) клеток с плазмидой

pACYCBad_R_fluo и добавлением индуктора. **В.** Флуоресцентное изображение (mCherry), а также изображение в режиме проходящего света (TL) клеток с плазмидой pACYCBad_R_fluo без добавления индуктора

Видно, что в присутствии индуктора (арабинозы) в клетках экспрессируется ЭР::mCherry. Также через некоторое время после индукции экспрессии ЭР::mCherry клетки начинают умирать из-за отсутствия в них метилтрансферазы, выполняющей функцию антитоксина.

Далее одна из полученных плазмид pACYCBad_R_fluo или pACYCBad_M_fluo трансформировалась в клетки *E. coli* совместно со среднекопийной плазмидой pBR322_Esp1396I_Fluo. Клетки, выращенные с добавлением различных концентраций индуктора (арабинозы) для осуществления дополнительной экспрессии одного из белков СРМ, а, следовательно, сдвига отношения МТ/ЭР в одну или другую сторону заражались λ бактериофагом. В целом, было показано (Рисунок 30), 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 приводит к ухудшению защиты системы на 1-1,5 порядка.

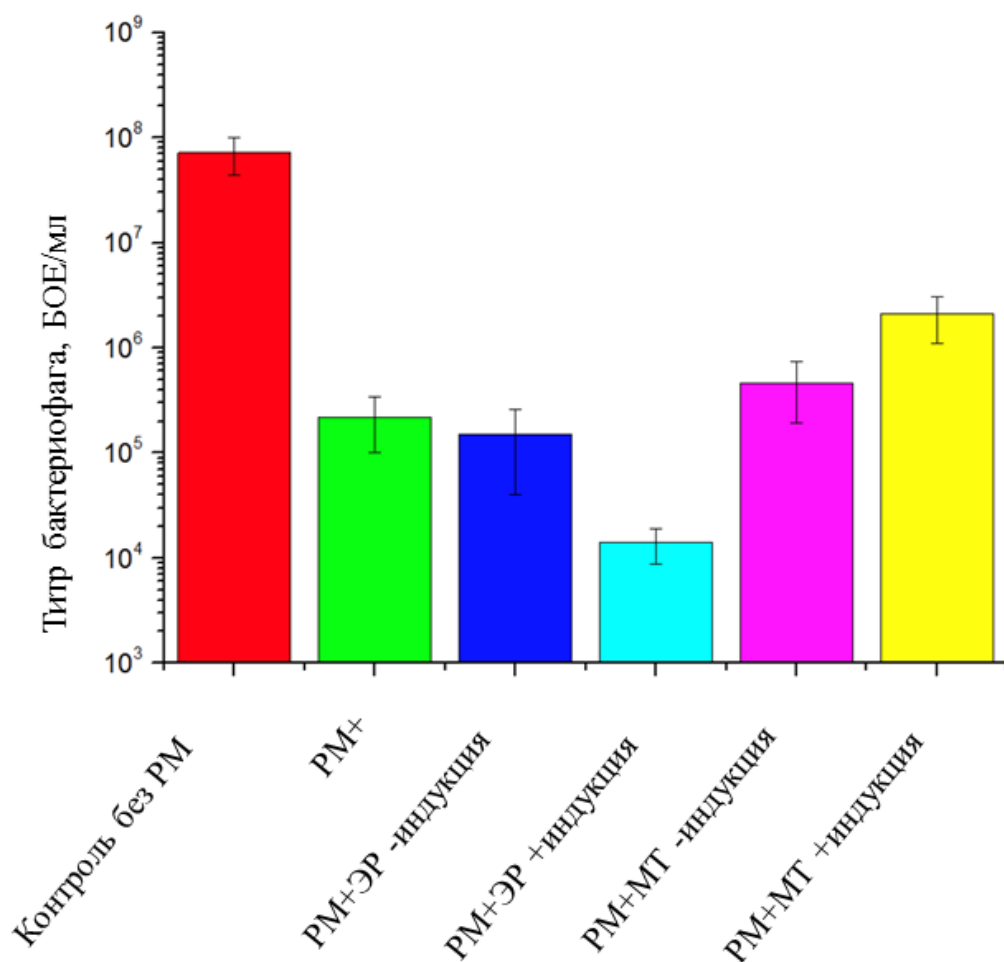


Рисунок 30. Титр λ бактериофага на контрольных клетках без CPM (красный столбец), титр λ бактериофага на клетках с плазмидой pBR322_Esp1396I_Fluo (зелёный столбец), титр λ бактериофага на клетках с плазмидой pBR322_Esp1396I_Fluo и дополнительной ЭР без индукции экспессии дополнительной ЭР (синий столбец), титр λ бактериофага на клетках с плазмидой pBR322_Esp1396I_Fluo и дополнительной ЭР с индукцией экспессии дополнительной ЭР (голубой столбец), титр λ бактериофага на клетках с плазмидой pBR322_Esp1396I_Fluo и дополнительной МТ без индукции экспессии дополнительной МТ (фиолетовый столбец), титр λ бактериофага на клетках с плазмидой pBR322_Esp1396I_Fluo и дополнительной МТ с индукцией экспессии дополнительной МТ (жёлтый столбец)

4.5 Роль С-белка в регуляции системы рестрикции-модификации Esp1396I

Было проведено наблюдение за трансформацией клеток плазмидами pUC_CMV (из флуоресцентно-меченной СРМ Esp1396I удалены МТ и ЭР таким образом, что рамки считывания не нарушены и их экспрессию имитируют флуоресцентные белки) или pUC-MV (удалены МТ и ЭР, а также регуляторный С-белок).

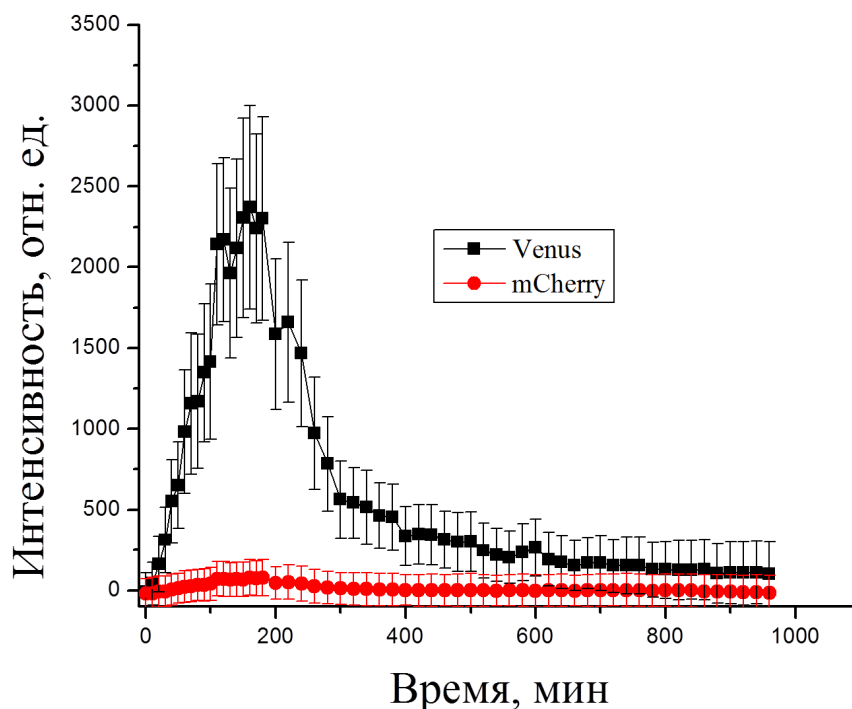


Рисунок 31. Динамика появления флуоресцентных белков Venus и mCherry после попадания СРМ без регуляторного белка С в новую клетку-хозяина. В силу особенностей генетической конструкции, флуоресцентные белки имитируют появление метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции соответственно

Для случая трансформации клеток плазмидой pUC_CMV было показано, что характер динамики появления флуоресцентных белков совпадает с представленным на рисунке 24В. В то же время динамика появления флуоресцентных белков после трансформации клеток плазмидой pUC-MV значительно отличалась (Рисунок 31). Видно, что характер кривой, описывающей интенсивность флуоресценции белка Venus такой же, как и для СРМ, находящаяся на плазмиде pUC19_Esp1396I_Fluo, однако динамика синтеза mCherry имеет другой характер. Видно, что красный флуоресцентный белок, имитирующий синтез эндонуклеазы рестрикции

практически не нарабатывается в клетках. Это обусловлено отсутствием регуляторного белка, в норме активирующего слабый промотор эндонуклеазы рестрикции. Таким образом, было наглядно продемонстрировано влияние С-белка на регуляцию CPM Esp1396I и процесс появления белков после трансформации новой хозяйской клетки плазмидой, несущей CPM.

Также была произведена оценка влияния различных количеств С-белка в клетке на концентрации МТ и ЭР в ней. Для этого в клетках *E. coli* DH5α с двумя плазмидами pUC-MV и pC, описанными выше, с помощью арабинозы производилась индукция С-белка различными концентрациями индуктора (арабинозы). Было показано, что с ростом количества С-белка в клетках также значительно изменяются относительные количества МТ и ЭР (Рисунок 32).

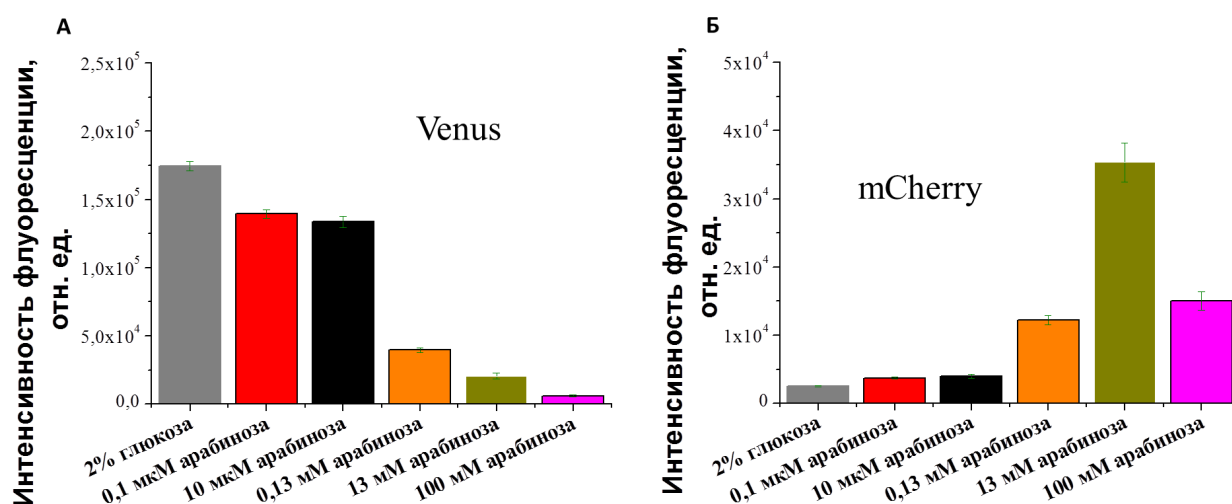


Рисунок 32. Интенсивность флуоресценции клеток с CPM Esp1396I в зависимости от количества С-белка в них. Ген регуляторного белка С экспрессируется с плазмиды pC, а его количество в клетках регулируется добавлением различных концентраций индуктора. **А.** Интенсивность флуоресценции белка Venus, имитирующего экспрессию метилтрансферазы в клетках. **Б.** Интенсивность флуоресценции белка mCherry, имитирующего экспрессию эндонуклеазы рестрикции в клетках

Видно, 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 значительное изменение в интенсивностях флуоресценции. В этом случае 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 (MT), 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 MT, а два других в промоторной области ЭР), что приводит к ингибированию экспрессии обоих генов CPM.

4.6 Процесс инфекции бактериофагом T7 клеток с системой CRISPR-Cas

В ходе работы была визуализирована динамика инфекции бактериофагом T7 клеток *E. coli* с активированной и не активированной системой CRISPR-Cas I-E (Рисунок 33). При этом наблюдалось заражение клеток с системой CRISPR-Cas, активной против ранних, средних и поздних генов бактериофага. Для всех типов CRISPR кассет со спейсерами к ранним, средним и поздним генам вируса наблюдалась схожая динамика развития вирусной инфекции. В качестве примера в данной работе представлены результаты, полученные на клетках с системой CRISPR-Cas, активной против ранних генов бактериофага.

При множественностях инфекции MOI=0,02 бактерии с активированной системой CRISPR-Cas типа I-E ведут себя также как неинфицированные, однако если множественность увеличивается до MOI=0,2, вирусная инфекция развивается, но значительно медленнее, чем в контрольных клетках без индукции защитной

системы CRISPR-Cas. Видно, что в данном случае имеет место сложная зависимость, состоящая из случаев бактериального роста и бактериальной смерти. Кроме того в данном случае наблюдается замедление в скорости деления бактерий, что, по-видимому, можно объяснить тратой некоторых ресурсов клетки на преодоление вирусной инфекции. При высокой множественности $MOI=2$ вирусная инфекция развивается одинаково эффективно как в клетках с активированной, так и с не активированной системой CRISPR-Cas, что наглядно иллюстрирует процесс преодоления защиты при высоких множественностях инфекции. На рисунке 34 представлены зависимости количества живых и мёртвых клеток на поле зрения от времени инфекции.

Было показано, что весь бактериофаг, вышедший из клеток с активированной системой CRISPR-Cas, имеет различные мутации, позволяющие ему преодолеть защитное действие системы.

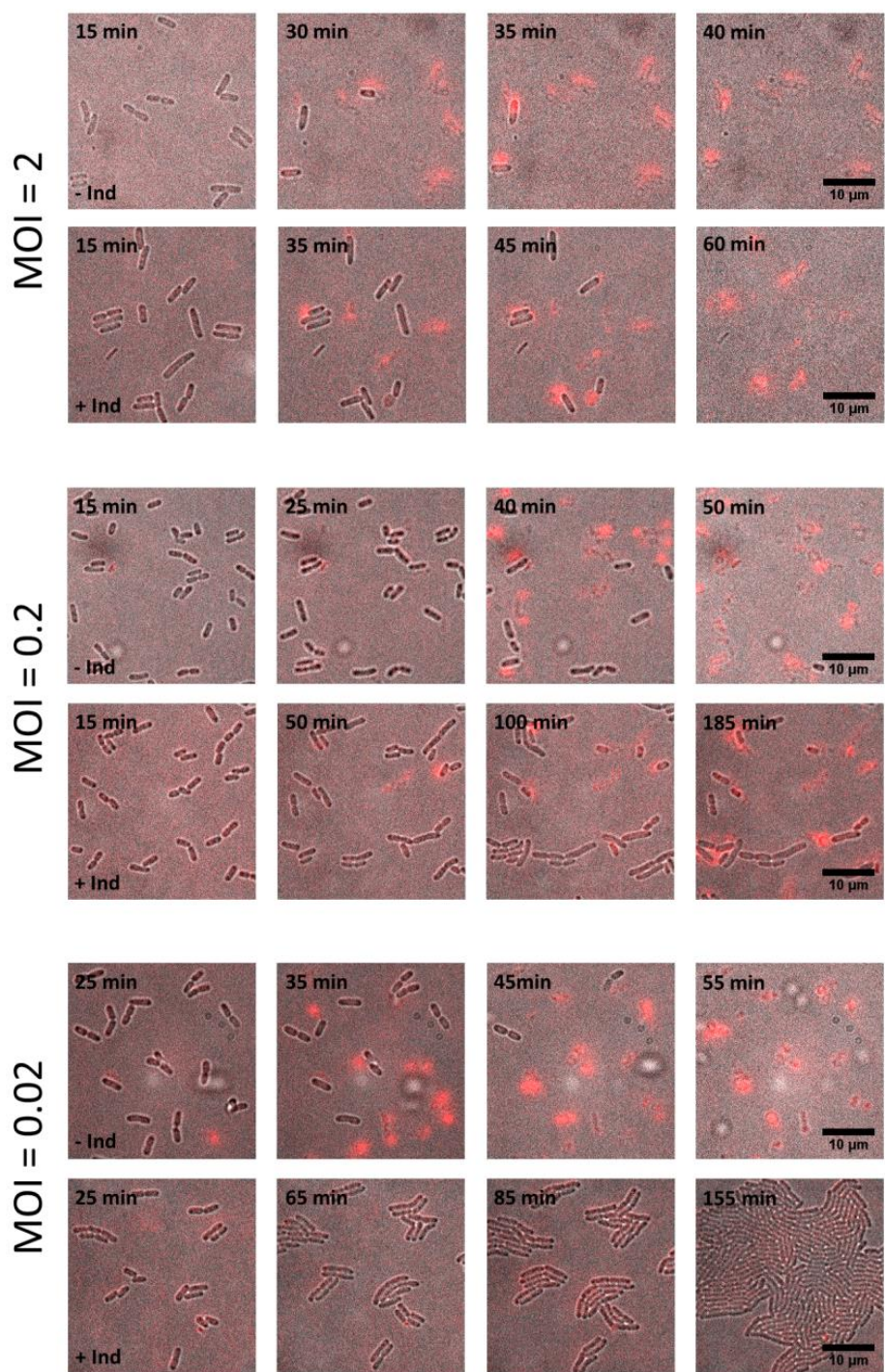


Рисунок 33. Изображения процесса инфекции вирусом T7 клеток *E. coli* с не активированной (верхний ряд) и активированной (нижний ряд) системой CRISPR-Cas I-E при разных множественностях инфекции. Изображения представляют собой наложения фотографий бактерий в проходящем свете и флуоресцентных изображений клеток, окрашенных иодидом пропидия для визуализации актов бактериального лизиса

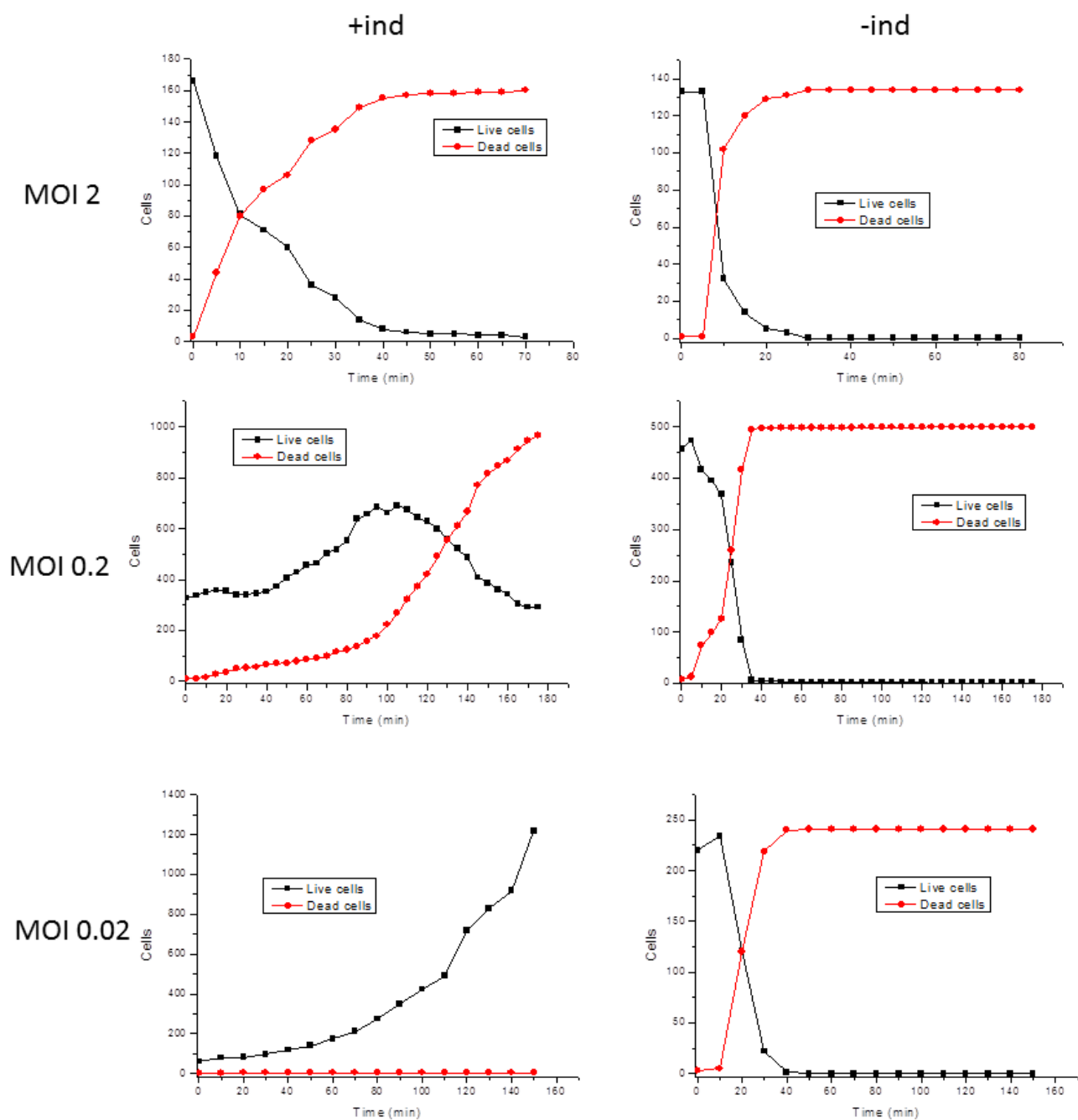


Рисунок 34. Количество живых (чёрный) и мёртвых (красный) клеток на поле зрения в процессе инфекции бактериофагом T7 клеток *E. coli* с активированной (слева) и не активированной (справа) системой CRISPR-Cas I-E при разных множественностях инфекции

4.7 Изучение защитной системы BREX

В процессе экспериментов по индукции профага λ из клеток с системой BREX и без неё было показано, что BREX не мешает выходу бактериофага λ из клеток, в случае если он находился в состоянии профага ещё до внесения в эти клетки защитной системы. На рисунке 35 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 ней.

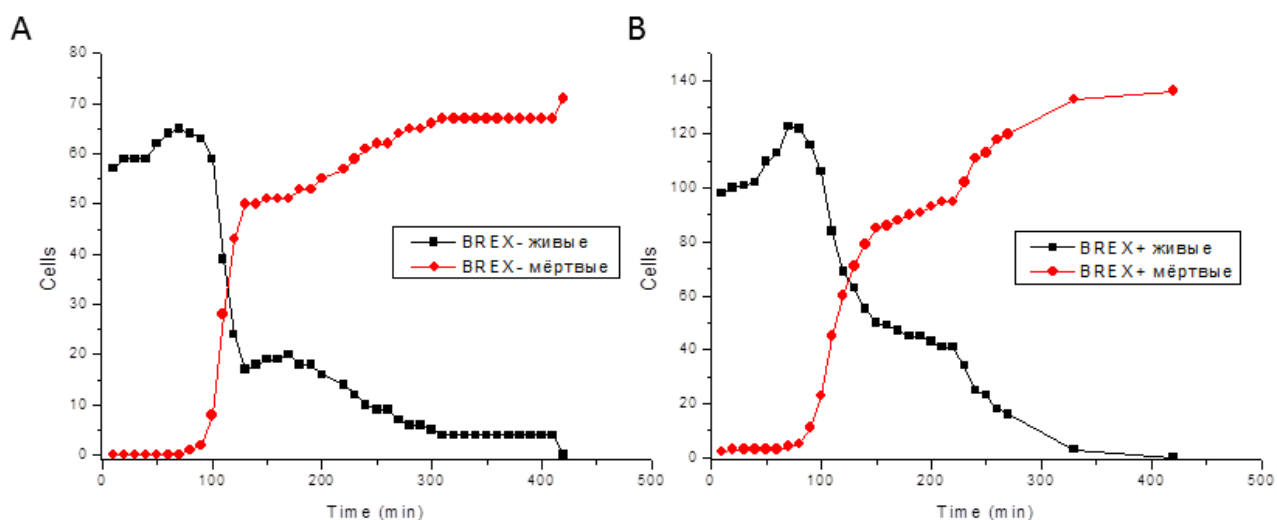


Рисунок 35. Динамика выхода бактериофага λ , находящегося в лизогенном состоянии, из **A.** клеток без системы BREX и **B.** клеток с системой BREX

Бактериофаг λ , вышедший из клеток с системой BREX и без неё ($\lambda_{\text{BREX+}}$, $\lambda_{\text{BREX-}}$ соответственно) отбирался, после чего данными бактериофагами заражались бактерии, несущие систему BREX (Рисунок 36). В качестве контроля выступала динамика роста не заражённых вирусом клеток с системой BREX (Рисунок 36A).

Видно, что в процессе заражения клеток бактериофагом $\lambda_{\text{BREX-}}$ актов бактериальной смерти практически не происходит (Рисунок 36Б). Количество же окрашивающихся иодидом пропидия клеток с повреждённой мембраной не превышает количество таковых в популяции незаражённых клеток (Рисунок 36A).

При заражении же клеток вирусом $\lambda_{\text{BREX}+}$ наблюдается заметный лизис культуры (Рисунок 36B). Было показано, что бактериофаг, индуцированный из клеток с системой BREX, приобретает модификацию по GGTAAG сайтам, которые также являются модифицированными в геноме клеток с системой BREX, а потомство такого бактериофага становится устойчивым к её действию.

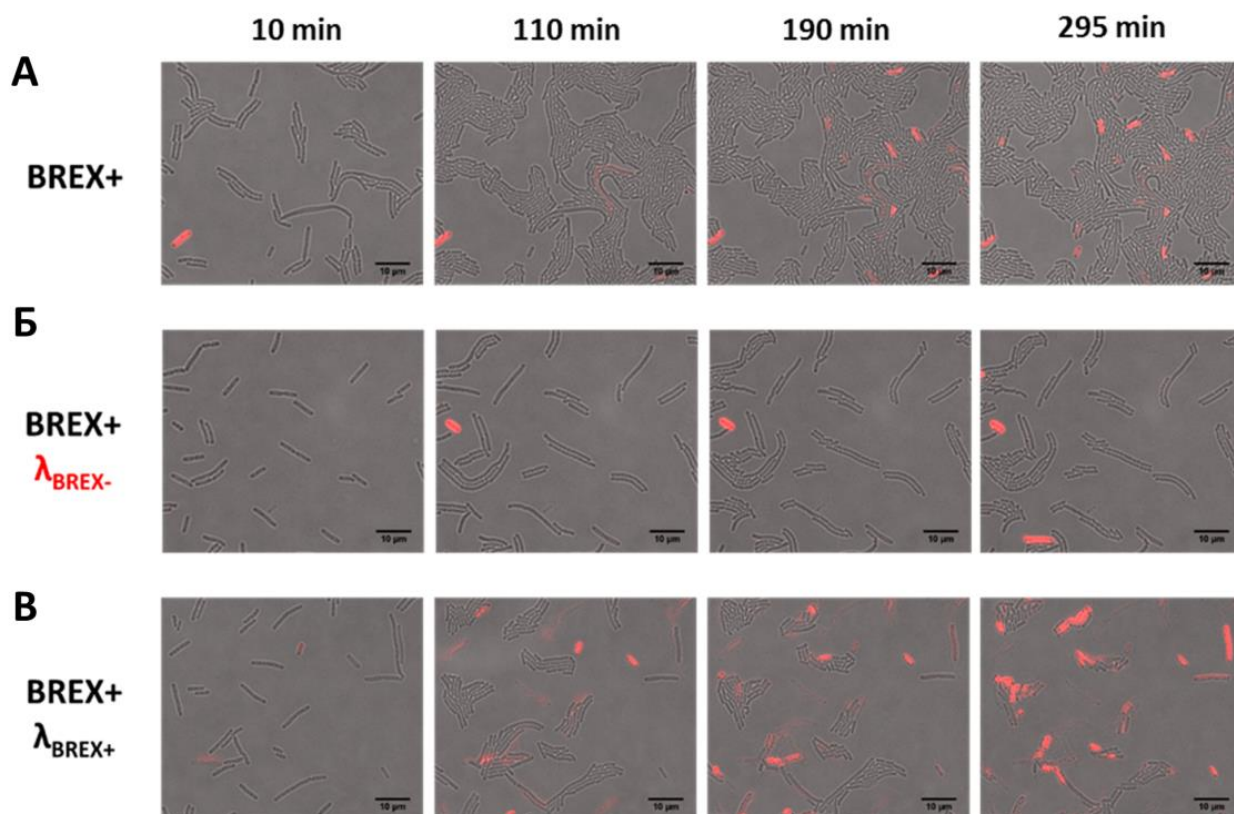


Рисунок 36. Динамика заражения клеток с системой BREX. **А.** Клетки с системой BREX и без вируса. **Б.** Клетки с BREX- вирусом. **В.** Клетки с BREX+ вирусом. Красным цветом показана флуоресценция клеток, окрашенных иодидом пропидия для визуализации актов бактериального лизиса

Глава 5. Заключение

Таким образом, в работе были исследованы три различные системы защиты бактерий от вирусов. Были получены новые данные, проливающие свет на различные механизмы их работы.

Впервые, на уровне одиночных клеток было показано, что динамика синтеза ферментов CPM Esp1396I_Fluo в новой одиночной хозяйской клетке значительно отличается. При этом МТ начинает синтезироваться раньше и имеет характерный пик, в то время как ЭР имеет кардинально отличающийся характер синтеза и начинает появляться в клетках с задержкой в 30-60 минут, относительно МТ. Также нами было показано, что зависимости синтеза МТ и ЭР от времени хорошо совпадают с моделью, описывающей данный процесс, и основанной на известных данных о регуляции системы РМ белком С, а также на данных о скорости деления клеток в эксперименте. Кроме того нами было показано, что изменение количества белка С в клетках значительно влияет на регуляцию данной защитной системы и концентрации МТ и ЭР в клетках.

Также было показано, что копияность плазмиды, несущей защитную систему РМ, значительно сказывается на эффективности противовирусной защиты, количестве ферментов данной системы в клетках, а также на соотношении этих ферментов. Если же искусственно сдвигать соотношение МТ к ЭР в клетках, также наблюдается изменение эффективности защиты от вируса. При этом смещение данного соотношения в сторону увеличения МТ приводит к ухудшению защиты, в то время как увеличение количества ЭР приводит к её улучшению.

Изучение процесса инфекции бактериофагом Т7 бактериальных клеток *E. coli* с системой CRISPR-Cas, активной против ранних, средних или поздних генов вируса не показало существенного различия в динамике инфекции для этих трёх случаев. Было показано, что при малой множественности инфекции ($MOI=0,02$) бактериальные клетки с индуцированной I-E CRISPR-Cas системой ведут себя практически как неинфицированные. При $MOI=0,2$ по сравнению с контрольными

клетками без индукции CRISPR-Cas системы вирусная инфекция значительно замедляется. Однако при MOI=2 вирусная инфекция развивается одинаково эффективно как в клетках с индуцированной, так и с не индуцированной CRISPR-Cas системой, что свидетельствует о преодолении защиты при высоких множественностях инфекции. Для множественности же инфекции MOI=0,2 имеет место сложная зависимость, включающая в себя акты бактериальной смерти и бактериального роста, кроме того наблюдается замедление скорости деления бактерий, что, по-видимому, можно объяснить тратой некоторых ресурсов клетки на преодоление инфекции.

Кроме того удалось пролить свет на некоторые аспекты работы защитной системы BREX из *Escherichia coli*. Было показано, что данная система не влияет на индукцию бактериофага λ из клеток, если вирус встроился в клеточный геном до попадания в них BREX системы, а также может модифицировать вирус, делая его устойчивым к защите.

Выводы

1. После появления системы-рестрикции модификации Esp1396I в новой бактериальной клетке-хозяине МТ накапливается раньше и имеет характерный пик концентрации в клетке, в то время как ЭР начинает синтезироваться с задержкой в 30-60 минут.

2. Копийность плазмиды, на которой находится CPM Esp1396I_Fluo существенно влияет на эффективность противовирусной защиты данной CPM. Уменьшение копийности плазмиды, несущей CPM, приводит к уменьшению количества ферментов МТ и ЭР в клетке, а также к увеличению отношения МТ/ЭР.

3. Искусственный сдвиг отношения МТ/ЭР влияет на эффективность противовирусной защиты клеток. При этом если отношение смещается в сторону увеличения количества МТ, то эффективность защиты уменьшается, если же

отношение смещается в сторону увеличения количества ЭР, то эффективность защиты увеличивается.

4. Динамика появления МТ и ЭР в новой хозяйской клетке значительно изменяется, если в СРМ Esp1396I отсутствует регуляторный белок С. ЭР в этом случае перестаёт синтезироваться практически полностью, в то время как динамика синтеза метилтрансферазы сохраняется. В стабильно трансформированных клетках различные концентрации белка С также значительно изменяют уровень ферментов СРМ в клетке.

5. Процесс заражения бактериофагом Т7 бактериальных клеток с системой CRISPR-Cas имеет одинаковую динамику, вне зависимости от того, спейсер к каким генам вируса Т7 (ранним, средними или поздним) присутствует в CRISPR-кассете. При малых множественностях инфекции ($MOI = 0,02$) культура заражённых клеток ведёт себя так же, как и культура незаражённых. При больших множественностях инфекции ($MOI = 0,2-2$) заражение происходит, однако весь бактериофаг является мутантным.

6. Защитная система BREX не влияет на выход профага λ из клеток.

7. Бактериофаг, вышедший из клеток с системой BREX, оказывается метилированным и устойчивым к действию защитной системы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Системы РМ – система рестрикции-модификации

МТ – метилтрансфераза

ЭР – эндонуклеаза рестрикции

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 Строцкую 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 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. 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.
3. 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.
4. J. Gordeeva, N. Morozova, N. Sierro, A. Isaev, T. Sinkunas, K. Tsvetkova, M. Matlashov, L. Truncaite, R.D. Morgan, N.V. Ivanov, V. Siksnys, L. Zeng, K. Severinov. BREX system of *Escherichia coli* distinguishes self from non-self by methylation of a specific DNA site. // *Nucleic Acids Res*, 2018.
5. A. Strotskaya, E. Savitskaya, A. Metlitskaya, N. Morozova, K.A. Datsenko, E. Semenova, K. Severinov. The action of *Escherichia coli* CRISPR-Cas system on lytic bacteriophages with different lifestyles and development strategies. // *Nucleic Acids Res*, 2017. 45(4): p. 1946-1957.
6. C. Canchaya, G. Fournous, S. Chibani-Chennoufi, M.L. Dillmann, H. Brussow. Phage as agents of lateral gene transfer. // *Current Opinion in Microbiology*, 2003. 6(4): p. 417-424.
7. J. Haaber, J.J. Leisner, M.T. Cohn, A. Catalan-Moreno, J.B. Nielsen, H. Westh, J.R. Penades, H. Ingmer. Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. // *Nature Communications*, 2016. 7.
8. F. Rodriguez-Valera, A.B. Martin-Cuadrado, B. Rodriguez-Brito, L. Pasic, T.F. Thingstad, F. Rohwer, A. Mira. OPINION Explaining microbial population genomics through phage predation. // *Nature Reviews Microbiology*, 2009. 7(11): p. 828-836.
9. M.E. Hankin. L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du choléra. // *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1896. 10: p. Ann Inst Pasteur (Paris)
10. F.W. Twort. An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. // *Lancet*, 1915. 2: p. 1241–1243.
11. F. d'Hérelle. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. // *C R Acad Sci Ser D.*, 1917. 165: p. 373–375.
12. P. Forterre. To be or not to be alive: How recent discoveries challenge the traditional definitions of viruses and life. // *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*, 2016. 59: p. 100-8.
13. J.R. Clark, J.B. March. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. // *Trends Biotechnol*, 2006. 24(5): p. 212-8.

14. H.W. Ackermann. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. // *Adv Virus Res*, 1998. 51: p. 135-201.
15. J. Doss, K. Culbertson, D. Hahn, J. Camacho, N. Barekzi. A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. // *Viruses-Basel*, 2017. 9(3).
16. 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.
17. M.R. Clokie, A.D. Millard, A.V. Letarov, S. Heaphy. Phages in nature. // *Bacteriophage*, 2011. 1(1): p. 31-45.
18. J. Doss, K. Culbertson, D. Hahn, J. Camacho, N. Barekzi. A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. // *Viruses*, 2017. 9(3).
19. R. Barrangou, J. van der Oost. Bacteriophage exclusion, a new defense system. // *EMBO J*, 2015. 34(2): p. 134-5.
20. R.E. Lenski. Dynamics of Interactions between Bacteria and Virulent Bacteriophage. // *Advances in Microbial Ecology*, 1988. 10: p. 1-44.
21. J.A. Fuhrman. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. // *Nature*, 1999. 399(6736): p. 541-548.
22. C.A. Suttle. Viruses in the sea. // *Nature*, 2005. 437(7057): p. 356-361.
23. K.E. Ashelford, M.J. Day, M.J. Bailey, A.K. Lilley, J.C. Fry. In situ population dynamics of bacterial viruses in a terrestrial environment. // *Applied and Environmental Microbiology*, 1999. 65(1): p. 169-174.
24. 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.
25. *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*; URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (дата обращения: 05.04.2018).
26. S.D. Brown, J.D. Fiedler, M.G. Finn. Assembly of hybrid bacteriophage Qbeta virus-like particles. // *Biochemistry*, 2009. 48(47): p. 11155-7.
27. W. Fiers, R.L. Sinsheimer. The structure of the DNA of bacteriophage phi-X174. I. The action of exopolynucleotidases. // *J Mol Biol*, 1962. 5: p. 408-19.
28. F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. 74(12): p. 5463-7.
29. M. Goulian, A. Kornberg, R.L. Sinsheimer. Enzymatic synthesis of DNA, XXIV. Synthesis of infectious phage phi-X174 DNA. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1967. 58(6): p. 2321-8.
30. F.E. Angly, D. Willner, A. Prieto-Davo, R.A. Edwards, R. Schmieder, R. Vega-Thurber, D.A. Antonopoulos, K. Barott, M.T. Cottrell, C. Desnues, E.A. Dinsdale, M. Furlan, M. Haynes, M.R. Henn, Y. Hu, D.L. Kirchman, T. McDole, J.D. McPherson, F. Meyer, R.M. Miller, E. Mundt, R.K. Naviaux, B. Rodriguez-Mueller, R. Stevens, L. Wegley, L. Zhang, B. Zhu, F.

Rohwer. The GAAS metagenomic tool and its estimations of viral and microbial average genome size in four major biomes. // *PLoS Comput Biol*, 2009. 5(12): p. e1000593.

31. A. Cornelissen, S.C. Hardies, O.V. Shaburova, V.N. Krylov, W. Mattheus, A.M. Kropinski, R. Lavigne. Complete genome sequence of the giant virus OBP and comparative genome analysis of the diverse PhiKZ-related phages. // *J Virol*, 2012. 86(3): p. 1844-52.

32. D. Lavysh, M. Sokolova, L. Minakhin, M. Yakunina, T. Artamonova, S. Kozyavkin, K.S. Makarova, E.V. Koonin, K. Severinov. The genome of AR9, a giant transducing *Bacillus* phage encoding two multisubunit RNA polymerases. // *Virology*, 2016. 495: p. 185-96.

33. V.V. Mesyanzhinov, J. Robben, B. Grymonprez, V.A. Kostyuchenko, M.V. Bourkaltseva, N.N. Sykilinda, V.N. Krylov, G. Volckaert. The genome of bacteriophage phiKZ of *Pseudomonas aeruginosa*. // *J Mol Biol*, 2002. 317(1): p. 1-19.

34. Z.J. Storms, D. Sauvageau. Modeling tailed bacteriophage adsorption: Insight into mechanisms. // *Virology*, 2015. 485: p. 355-362.

35. S. Chaturongakul, P. Ounjai. Phage-host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. // *Frontiers in Microbiology*, 2014. 5.

36. J.E. Samson, A.H. Magadan, M. Sabri, S. Moineau. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. // *Nature Reviews Microbiology*, 2013. 11(10): p. 675-687.

37. K. Heller, V. Braun. Polymannose O-Antigens of *Escherichia-Coli*, the Binding-Sites for the Reversible Adsorption of Bacteriophage-T5+ Via the L-Shaped Tail Fibers. // *Journal of Virology*, 1982. 41(1): p. 222-227.

38. H. Shin, J.H. Lee, H. Kim, Y. Choi, S. Heu, S. Ryu. Receptor Diversity and Host Interaction of Bacteriophages Infecting *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. // *Plos One*, 2012. 7(8).

39. Y. Choi, H. Shin, J.H. Lee, S. Ryu. Identification and Characterization of a Novel Flagellum-Dependent *Salmonella*-Infecting Bacteriophage, iEPS5. // *Applied and Environmental Microbiology*, 2013. 79(16): p. 4829-4837.

40. H.W. Bae, Y.H. Cho. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Podophage MPK7, Which Requires Type IV Pili for Infection. // *Genome Announc*, 2013. 1(5).

41. J. Bertozzi Silva, Z. Storms, D. Sauvageau. Host receptors for bacteriophage adsorption. // *FEMS Microbiol Lett*, 2016. 363(4).

42. I.J. Molineux, D. Panja. Popping the cork: mechanisms of phage genome ejection. // *Nat Rev Microbiol*, 2013. 11(3): p. 194-204.

43. L. Letellier, P. Boulanger, L. Plancon, P. Jacquot, M. Santamaria. Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. // *Front Biosci*, 2004. 9: p. 1228-339.

44. A.D. Hershey, M. Chase. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. // *J Gen Physiol*, 1952. 36(1): p. 39-56.
45. P. Grayson, I.J. Molineux. Is phage DNA 'injected' into cells--biologists and physicists can agree. // *Curr Opin Microbiol*, 2007. 10(4): p. 401-9.
46. Y.T. Lanni. First-step-transfer deoxyribonucleic acid of bacteriophage T5. // *Bacteriol Rev*, 1968. 32(3): p. 227-42.
47. 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.
48. E. Beghetto, N. Gargano. Lambda-display: a powerful tool for antigen discovery. // *Molecules*, 2011. 16(4): p. 3089-105.
49. M. Ptashne. *A Genetic Switch*, Third Edition: Phage Lambda Revisited, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. // 2004.
50. A.A. Aksyuk, M.G. Rossmann. Bacteriophage assembly. // *Viruses*, 2011. 3(3): p. 172-203.
51. L.W. Black. DNA packaging in dsDNA bacteriophages. // *Annu Rev Microbiol*, 1989. 43: p. 267-92.
52. D.L. Caspar. Structure of bushy stunt virus. // *Nature*, 1956. 177(4506): p. 475-6.
53. F.H. Crick, J.D. Watson. Structure of small viruses. // *Nature*, 1956. 177(4506): p. 473-5.
54. D.L. Caspar, A. Klug. Physical principles in the construction of regular viruses. // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1962. 27: p. 1-24.
55. B.G. Condon, J.F. Atkins, R.F. Gesteland. Frameshifting in gene 10 of bacteriophage T7. // *J Bacteriol*, 1991. 173(21): p. 6998-7003.
56. B.A. Fane, P.E. Prevelige, Jr. Mechanism of scaffolding-assisted viral assembly. // *Adv Protein Chem*, 2003. 64: p. 259-99.
57. A. Huet, J.F. Conway, L. Letellier, P. Boulanger. In vitro assembly of the T=13 procapsid of bacteriophage T5 with its scaffolding domain. // *J Virol*, 2010. 84(18): p. 9350-8.
58. M.E. Cerritelli, F.W. Studier. Assembly of T7 capsids from independently expressed and purified head protein and scaffolding protein. // *J Mol Biol*, 1996. 258(2): p. 286-98.
59. E. Medina, D. Wiecezorek, E.M. Medina, Q. Yang, M. Feiss, C.E. Catalano. Assembly and Maturation of the Bacteriophage Lambda Procapsid: gpC Is the Viral Protease. // *Journal of Molecular Biology*, 2010. 401(5): p. 813-830.
60. E. Kellenberger. Form determination of the heads of bacteriophages. // *Eur J Biochem*, 1990. 190(2): p. 233-48.
61. J.M. Valpuesta, J.L. Carrascosa. Structure of Viral Connectors and Their Function in Bacteriophage Assembly and DNA Packaging. // *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1994. 27(2): p. 107-155.

62. H. Fujisawa, M. Morita. Phage DNA packaging. // *Genes to Cells*, 1997. 2(9): p. 537-545.
63. L.G. Pell, A. Liu, L. Edmonds, L.W. Donaldson, P.L. Howell, A.R. Davidson. The X-ray crystal structure of the phage lambda tail terminator protein reveals the biologically relevant hexameric ring structure and demonstrates a conserved mechanism of tail termination among diverse long-tailed phages. // *J Mol Biol*, 2009. 389(5): p. 938-51.
64. M.G. Rossmann, V.V. Mesyanzhinov, F. Arisaka, P.G. Leiman. The bacteriophage T4 DNA injection machine. // *Curr Opin Struct Biol*, 2004. 14(2): p. 171-80.
65. M.J. Catalao, F. Gil, J. Moniz-Pereira, C. Sao-Jose, M. Pimentel. Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. // *Fems Microbiology Reviews*, 2013. 37(4): p. 554-571.
66. I.N. Wang. Lysis timing and bacteriophage fitness. // *Genetics*, 2006. 172(1): p. 17-26.
67. A. Sulakvelidze, Z. Alavidze, J.G. Morris. Bacteriophage therapy. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001. 45(3): p. 649-659.
68. S. Parasion, M. Kwiatak, R. Gryko, L. Mizak, A. Malm. Bacteriophages as an Alternative Strategy for Fighting Biofilm Development. // *Polish Journal of Microbiology*, 2014. 63(2): p. 137-145.
69. S. Meaden, B. Koskella. Exploring the risks of phage application in the environment. // *Frontiers in Microbiology*, 2013. 4.
70. F.L. Nobrega, A.R. Costa, L.D. Kluskens, J. Azeredo. Revisiting phage therapy: new applications for old resources. // *Trends Microbiol*, 2015. 23(4): p. 185-91.
71. A.M. Ormala, M. Jalasvuori. Phage therapy: Should bacterial resistance to phages be a concern, even in the long run? // *Bacteriophage*, 2013. 3(1): p. e24219.
72. S. van Houte, A. Buckling, E.R. Westra. Evolutionary Ecology of Prokaryotic Immune Mechanisms. // *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016. 80(3): p. 745-63.
73. K.D. Seed. Battling Phages: How Bacteria Defend against Viral Attack. // *Plos Pathogens*, 2015. 11(6).
74. S. van Houte, A. Buckling, E.R. Westra. Evolutionary Ecology of Prokaryotic Immune Mechanisms. // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016. 80(3): p. 745-763.
75. A.D.T. Samuel, T.P. Pitta, W.S. Ryu, P.N. Danese, E.C.W. Leung, H.C. Berg. Flagellar determinants of bacterial sensitivity to chi-phage. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. 96(17): p. 9863-9866.
76. D. Bikard, L.A. Marraffini. Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages. // *Current Opinion in Immunology*, 2012. 24(1): p. 15-20.

77. N.M. Hoyland-Kroghsbo, R.B. Maerkedahl, S. Lo Svenningsen. A Quorum-Sensing-Induced Bacteriophage Defense Mechanism. // *Mbio*, 2013. 4(1).
78. A. Uc-Mass, E.J. Loeza, M. de la Garza, G. Guarneros, J. Hernandez-Sanchez, L. Kameyama. An orthologue of the cor gene is involved in the exclusion of temperate lambdoid phages. Evidence that Cor inactivates FhuA receptor functions. // *Virology*, 2004. 329(2): p. 425-433.
79. C. Bebeacua, J.C.L. Fajardo, S. Blangy, S. Spinelli, S. Bollmann, H. Neve, C. Cambillau, K.J. Heller. X-ray structure of a superinfection exclusion lipoprotein from phage TP-J34 and identification of the tape measure protein as its target. // *Molecular Microbiology*, 2013. 89(1): p. 152-165.
80. M.J. Lu, U. Henning. Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. // *Trends Microbiol*, 1994. 2(4): p. 137-9.
81. W.H. Pope, D. Jacobs-Sera, D.A. Russell, C.L. Peebles, Z. Al-Atrache, T.A. Alcoser, L.M. Alexander, M.B. Alfano, S.T. Alford, N.E. Amy, M.D. Anderson, A.G. Anderson, A.A.S. Ang, M. Ares, A.J. Barber, L.P. Barker, J.M. Barrett, W.D. Barshop, C.M. Bauerle, I.M. Bayles, K.L. Belfield, A.A. Best, A. Borjon, C.A. Bowman, C.A. Boyer, K.W. Bradley, V.A. Bradley, L.N. Broadway, K. Budwal, K.N. Busby, I.W. Campbell, A.M. Campbell, A. Carey, S.M. Caruso, R.D. Chew, C.L. Cockburn, L.B. Cohen, J.M. Corajod, S.G. Cresawn, K.R. Davis, L.S. Deng, D.R. Denver, B.R. Dixon, S. Ekram, S.C.R. Elgin, A.E. Engelsen, B.E.V. English, M.L. Erb, C. Estrada, L.Z. Filliger, A.M. Findley, L. Forbes, M.H. Forsyth, T.M. Fox, M.J. Fritz, R. Garcia, Z.D. George, A.E. Georges, C.R. Gissendanner, S. Goff, R. Goldstein, K.C. Gordon, R.D. Green, S.L. Guerra, K.R. Guiney-Olsen, B.G. Guiza, L. Haghighat, G.V. Hagopian, C.J. Harmon, J.S. Harmson, G.A. Hartzog, S.E. Harvey, S.P. He, K.J. He, K.E. Healy, E.R. Higinbotham, E.N. Hildebrandt, J.H. Ho, G.M. Hogan, V.G. Hohenstein, N.A. Holz, V.J. Huang, E.L. Hufford, P.M. Hynes, A.S. Jackson, E.C. Jansen, J. Jarvik, P.G. Jasinto, T.C. Jordan, T. Kasza, M.A. Katelyn, J.S. Kelsey, L.A. Kerrigan, D. Khaw, J. Kim, J.Z. Knutter, C.C. Ko, G.V. Larkin, J.R. Laroche, A. Latif, K.D. Leuba, S.I. Leuba, L.O. Lewis, K.E. Loesser-Casey, C.A. Long, A.J. Lopez, N. Lowery, T.Q. Lu, V. Mac, I.R. Masters, J.J. McCloud, M.J. McDonough, A.J. Medenbach, A. Menon, R. Miller, B.K. Morgan, P.C. Ng, E. Nguyen, K.T. Nguyen, E.T. Nguyen, K.M. Nicholson, L.A. Parnell, C.E. Peirce, A.M. Perz, L.J. Peterson, R.E. Pferdehirt, S.V. Philip, K. Pogliano, J. Pogliano, T. Polley, E.J. Puopolo, H.S. Rabinowitz, M.J. Resiss, C.N. Rhyhan, Y.M. Robinson, L.L. Rodriguez, A.C. Rose, J.D. Rubin, J.A. Ruby, M.S. Saha, J.W. Sandoz, J. Savitskaya, D.J. Schipper, C.E. Schnitzler, A.R. Schott, J.B. Segal, C.D. Shaffer, K.E. Sheldon, E.M. Shepard, J.W. Shepardson, M.K. Shroff, J.M. Simmons, E.F. Simms, B.M. Simpson, K.M. Sinclair, R.L. Sjöholm, I.J. Slette, B.C. Spaulding, C.L. Straub, J. Stukey, T. Sughrue, T.Y. Tang, L.M. Tatyana, S.B. Taylor, B.J. Taylor, L.M. Temple, J.V. Thompson, M.P. Tokarz, S.E. Trapani, A.P. Troum, J. Tsay, A.T. Tubbs, J.M. Walton, D.H. Wang, H.N. Wang, J.R. Warner, E.G. Weisser, S.C. Wendler, K.A. Weston-Hafer, H.M. Whelan, K.E. Williamson,

A.N. Willis, H.S. Wirtshafter, T.W. Wong, P.L. Wu, Y.J. Yang, B.C. Yee, D.A. Zaidins, B. Zhang, M.Y. Zuniga, R.W. Hendrix, G.F. Hatfull. Expanding the Diversity of Mycobacteriophages: Insights into Genome Architecture and Evolution. // Plos One, 2011. 6(1).

82. S. Domingues, A. Chopin, S.D. Ehrlich, M.C. Chopin. The Lactococcal abortive phage infection system AbiP prevents both phage DNA replication and temporal transcription switch. // J Bacteriol, 2004. 186(3): p. 713-21.

83. D.H. Kruger, T.A. Bickle. Bacteriophage Survival - Multiple Mechanisms for Avoiding the Deoxyribonucleic-Acid Restriction Systems of Their Hosts. // Microbiological Reviews, 1983. 47(3): p. 345-360.

84. D.T.F. Dryden, N.E. Murray, D.N. Rao. Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. // Nucleic Acids Research, 2001. 29(18): p. 3728-3741.

85. S.E. Luria, M.L. Human. A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. // J Bacteriol, 1952. 64(4): p. 557-69.

86. H.O. Smith, D. Nathans. Letter: A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. // J Mol Biol, 1973. 81(3): p. 419-23.

87. R.Z. Jurkowska, A. Jeltsch. DNA Methyltransferases - Role and Function Preface. // DNA Methyltransferases - Role and Function, 2016. 945: p. V-Vi.

88. H.W. Boyer. DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. // Annu Rev Microbiol, 1971. 25: p. 153-76.

89. R.J. Roberts, M. Belfort, T. Bestor, A.S. Bhagwat, T.A. Bickle, J. Bitinaite, R.M. Blumenthal, S. Degtyarev, D.T. Dryden, K. Dybvig, K. Firman, E.S. Gromova, R.I. Gumport, S.E. Halford, S. Hattman, J. Heitman, D.P. Hornby, A. Janulaitis, A. Jeltsch, J. Josephsen, A. Kiss, T.R. Klaenhammer, I. Kobayashi, H. Kong, D.H. Kruger, S. Lacks, M.G. Marinus, M. Miyahara, R.D. Morgan, N.E. Murray, V. Nagaraja, A. Piekarowicz, A. Pingoud, E. Raleigh, D.N. Rao, N. Reich, V.E. Repin, E.U. Selker, P.C. Shaw, D.C. Stein, B.L. Stoddard, W. Szybalski, T.A. Trautner, J.L. Van Etten, J.M. Vitor, G.G. Wilson, S.Y. Xu. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. // Nucleic Acids Res, 2003. 31(7): p. 1805-12.

90. N.E. Murray. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). // Microbiol Mol Biol Rev, 2000. 64(2): p. 412-34.

91. G.G. Wilson. Organization of Restriction-Modification Systems. // Nucleic Acids Research, 1991. 19(10): p. 2539-2566.

92. 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.

93. A. Pingoud, A. Jeltsch. Structure and function of type II restriction endonucleases. // Nucleic Acids Res, 2001. 29(18): p. 3705-27.

94. G.G. Wilson. Organization of restriction-modification systems. // *Nucleic Acids Res*, 1991. 19(10): p. 2539-66.
95. R.J. Roberts, T. Vincze, J. Posfai, D. Macelis. REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. // *Nucleic Acids Res*, 2015. 43(Database issue): p. D298-9.
96. W. Szybalski, S.C. Kim, N. Hasan, A.J. Podhajska. Class-IIS restriction enzymes--a review. // *Gene*, 1991. 100: p. 13-26.
97. F. Hennecke, H. Kolmar, K. Brundl, H.J. Fritz. The *vsr* gene product of *E. coli* K-12 is a strand- and sequence-specific DNA mismatch endonuclease. // *Nature*, 1991. 353(6346): p. 776-8.
98. T. Tao, J.C. Bourne, R.M. Blumenthal. A family of regulatory genes associated with type II restriction-modification systems. // *J Bacteriol*, 1991. 173(4): p. 1367-75.
99. E. Bogdanova, M. Djordjevic, I. Papapanagiotou, T. Heyduk, G. Kneale, K. Severinov. Transcription regulation of the type II restriction-modification system AhdI. // *Nucleic Acids Res*, 2008. 36(5): p. 1429-42.
100. I.V. Beletskaya, M.V. Zakharova, M.G. Shlyapnikov, L.M. Semenova, A.S. Solonin. DNA methylation at the CfrBI site is involved in expression control in the CfrBI restriction-modification system. // *Nucleic Acids Res*, 2000. 28(19): p. 3817-22.
101. M. Zakharova, L. Minakhin, A. Solonin, K. Severinov. Regulation of RNA polymerase promoter selectivity by covalent modification of DNA. // *J Mol Biol*, 2004. 335(1): p. 103-11.
102. A. Karyagina, I. Shilov, V. Tashlitskii, M. Khodoun, S. Vasil'ev, P.C. Lau, I. Nikolskaya. Specific binding of sso II DNA methyltransferase to its promoter region provides the regulation of sso II restriction-modification gene expression. // *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(11): p. 2114-20.
103. E. Bogdanova, M. Zakharova, S. Streeter, J. Taylor, T. Heyduk, G. Kneale, K. Severinov. Transcription regulation of restriction-modification system Esp1396I. // *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(10): p. 3354-66.
104. E. Cesnaviciene, G. Mitkaite, K. Stankevicius, A. Janulaitis, A. Lubys. Esp1396I restriction-modification system: structural organization and mode of regulation. // *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(2): p. 743-9.
105. R.N. Martin, J.E. McGeehan, G. Kneale. Structural and mutagenic analysis of the RM controller protein C.Esp1396I. // *PLoS One*, 2014. 9(6): p. e98365.
106. P. Janscak, U. Sandmeier, M.D. Szczelkun, T.A. Bickle. Subunit assembly and mode of DNA cleavage of the type III restriction endonucleases EcoP1I and EcoP15I. // *J Mol Biol*, 2001. 306(3): p. 417-31.
107. D.T. Dryden, N.E. Murray, D.N. Rao. Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. // *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(18): p. 3728-41.
108. U. Pieper, D.H. Groll, S. Wunsch, F.U. Gast, C. Speck, N. Mucke, A. Pingoud. The GTP-dependent restriction enzyme McrBC from *Escherichia coli* forms high-molecular mass complexes with DNA and produces a cleavage

pattern with a characteristic 10-base pair repeat. // *Biochemistry*, 2002. 41(16): p. 5245-54.

109. Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. // *J Bacteriol*, 1987. 169(12): p. 5429-33.

110. K.S. Makarova, Y.I. Wolf, E.V. Koonin. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. // *Nucleic Acids Res*, 2013. 41(8): p. 4360-77.

111. A. Bolotin, B. Quinquis, A. Sorokin, S.D. Ehrlich. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. // *Microbiology*, 2005. 151(Pt 8): p. 2551-61.

112. 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.

113. C. Pourcel, G. Salvignol, G. Vergnaud. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. // *Microbiology*, 2005. 151(Pt 3): p. 653-63.

114. R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D.A. Romero, P. Horvath. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. // *Science*, 2007. 315(5819): p. 1709-12.

115. J. van der Oost, E.R. Westra, R.N. Jackson, B. Wiedenheft. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. // *Nat Rev Microbiol*, 2014. 12(7): p. 479-92.

116. R. Jansen, J.D. Embden, W. Gaastra, L.M. Schouls. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. // *Mol Microbiol*, 2002. 43(6): p. 1565-75.

117. V. Kunin, R. Sorek, P. Hugenholtz. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. // *Genome Biol*, 2007. 8(4): p. R61.

118. E.V. Koonin, K.S. Makarova, F. Zhang. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. // *Current Opinion in Microbiology*, 2017. 37: p. 67-78.

119. K.S. Makarova, D.H. Haft, R. Barrangou, S.J. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath, S. Moineau, F.J. Mojica, Y.I. Wolf, A.F. Yakunin, J. van der Oost, E.V. Koonin. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. // *Nat Rev Microbiol*, 2011. 9(6): p. 467-77.

120. L.A. Marraffini, E.J. Sontheimer. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. // *Nature*, 2010. 463(7280): p. 568-71.

121. I. Yosef, M.G. Goren, U. Qimron. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. // *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(12): p. 5569-76.

122. M. Babu, N. Beloglazova, R. Flick, C. Graham, T. Skarina, B. Nocek, A. Gagarinova, O. Pogoutse, G. Brown, A. Binkowski, S. Phanse, A. Joachimiak, E.V. Koonin, A. Savchenko, A. Emili, J. Greenblatt, A.M. Edwards, A.F. Yakunin. A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. // *Mol Microbiol*, 2011. 79(2): p. 484-502.
123. E.L. Garside, A.M. MacMillan. Analysis of CRISPR Pre-crRNA Cleavage. // *Methods Mol Biol*, 2015. 1311: p. 35-46.
124. H. Nishimasu, F.A. Ran, P.D. Hsu, S. Konermann, S.I. Shehata, N. Dohmae, R. Ishitani, F. Zhang, O. Nureki. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. // *Cell*, 2014. 156(5): p. 935-49.
125. M.M. Jore, M. Lundgren, E. van Duijn, J.B. Bultema, E.R. Westra, S.P. Waghmare, B. Wiedenheft, U. Pul, R. Wurm, R. Wagner, M.R. Beijer, A. Barendregt, K. Zhou, A.P. Snijders, M.J. Dickman, J.A. Doudna, E.J. Boekema, A.J. Heck, J. van der Oost, S.J. Brouns. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. // *Nat Struct Mol Biol*, 2011. 18(5): p. 529-36.
126. M. Spilman, A. Cocozaki, C. Hale, Y. Shao, N. Ramia, R. Terns, M. Terns, H. Li, S. Stagg. Structure of an RNA silencing complex of the CRISPR-Cas immune system. // *Mol Cell*, 2013. 52(1): p. 146-52.
127. E. Semenova, M.M. Jore, K.A. Datsenko, A. Semenova, E.R. Westra, B. Wanner, J. van der Oost, S.J. Brouns, K. Severinov. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(25): p. 10098-103.
128. S. Mulepati, A. Heroux, S. Bailey. Structural biology. Crystal structure of a CRISPR RNA-guided surveillance complex bound to a ssDNA target. // *Science*, 2014. 345(6203): p. 1479-84.
129. T.A. Chinenova, N.M. Mkrtumian, N.D. Lomovskaia. [Genetic characteristics of a new phage resistance trait in *Streptomyces coelicolor* A3(2)]. // *Genetika*, 1982. 18(12): p. 1945-52.
130. P.A. Hoskisson, P. Sumby, M.C.M. Smith. The phage growth limitation system in *Streptomyces coelicolor* A(3)2 is a toxin/antitoxin system, comprising enzymes with DNA methyltransferase, protein kinase and ATPase activity. // *Virology*, 2015. 477: p. 100-109.
131. T. Goldfarb, H. Sberro, E. Weinstock, O. Cohen, S. Doron, Y. Charpak-Amikam, S. Afik, G. Ofir, R. Sorek. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. // *Embo Journal*, 2015. 34(2): p. 169-183.
132. 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.
133. T.F. Mah, B. Pitts, B. Pellock, G.C. Walker, P.S. Stewart, G.A. O'Toole. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. // *Nature*, 2003. 426(6964): p. 306-310.

134. C.A. Lo, I. Kays, F. Emran, T.J. Lin, V. Cvetkovska, B.E. Chen. Quantification of Protein Levels in Single Living Cells. // *Cell Reports*, 2015. 13(11): p. 2634-2644.
135. A.U. Acuna, F. Amat-Guerri, P. Morcillo, M. Liras, B. Rodriguez. Structure and Formation of the Fluorescent Compound of *Lignum nephriticum*. // *Organic Letters*, 2009. 11(14): p. 3020-3023.
136. D. Brewster. XIX. On the Colours of Natural Bodies. // *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 2013. 12(2): p. 538-545.
137. E.D. Clarke. Account of a newly discovered variety of green fluor spar, of very uncommon beauty, and with remarkable properties of colour and phosphorescence. // *The Annals of Philosophy*, 1819. 14: p. 34–36.
138. J.F.W. Herschel. On a Case of Superficial Colour Presented by a Homogeneous Liquid Internally Colourless. // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1845. 135: p. 143-145.
139. J.W. Lichtman, J.-A. Conchello. Fluorescence microscopy. // *Nature Methods*, 2005. 2: p. 910.
140. J. Cazes. *Encyclopedia of chromatography*. // New York: Marcel Dekker, 2001. 927 p.
141. G.G. Stokes. Ueber die Veränderung der Brechbarkeit des Lichts; zweite Abhandlung. // *Annalen der Physik*, 1855. 172(12): p. 522-542.
142. A. Baeyer. Ueber eine neue Klasse von Farbstoffen. // *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1871. 4(2): p. 555-558.
143. E. P. FLUORESCENCE MICROSCOPY IN BIOLOGY. // *Biological Reviews*, 1940. 15(3): p. 323-347.
144. J.G. Donaldson. Immunofluorescence staining. // *Curr Protoc Cell Biol*, 2001. Chapter 4: p. Unit 4 3.
145. I.D. Odell, D. Cook. Immunofluorescence techniques. // *J Invest Dermatol*, 2013. 133(1): p. e4.
146. J. Kapuscinski. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. // *Biotech Histochem*, 1995. 70(5): p. 220-33.
147. S.A. Latt, G. Stetten. Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. // *J Histochem Cytochem*, 1976. 24(1): p. 24-33.
148. S.A. Latt, G. Stetten, L.A. Juergens, H.F. Willard, C.D. Scher. Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence. // *J Histochem Cytochem*, 1975. 23(7): p. 493-505.
149. H. Lecoer. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. // *Exp Cell Res*, 2002. 277(1): p. 1-14.
150. T. Gessner, U. Mayer. Triarylmethane and Diarylmethane Dyes. // *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2000.
151. T. Terai, T. Nagano. Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging. // *Pflugers Arch*, 2013. 465(3): p. 347-59.

152. O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. // *J Cell Comp Physiol*, 1962. 59: p. 223-39.
153. M. Ormo, A.B. Cubitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien, S.J. Remington. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. // *Science*, 1996. 273(5280): p. 1392-5.
154. Fluorescent Proteins – Introduction and Photo Spectral Characteristics. URL: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescent-proteins-introduction-and-photo-spectral-characteristics/> (дата обращения: 20.05.2018).
155. R.Y. Tsien. The green fluorescent protein. // *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 509-44.
156. O. Zapata-Hommer, O. Griesbeck. Efficiently folding and circularly permuted variants of the Sapphire mutant of GFP. // *BMC Biotechnol*, 2003. 3: p. 5.
157. M.A. Mena, T.P. Treynor, S.L. Mayo, P.S. Daugherty. Blue fluorescent proteins with enhanced brightness and photostability from a structurally targeted library. // *Nat Biotechnol*, 2006. 24(12): p. 1569-71.
158. G.J. Kremers, J. Goedhart, D.J. van den Heuvel, H.C. Gerritsen, T.W. Gadella, Jr. Improved green and blue fluorescent proteins for expression in bacteria and mammalian cells. // *Biochemistry*, 2007. 46(12): p. 3775-83.
159. W. Tomosugi, T. Matsuda, T. Tani, T. Nemoto, I. Kotera, K. Saito, K. Horikawa, T. Nagai. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. // *Nat Methods*, 2009. 6(5): p. 351-3.
160. M.A. Rizzo, G.H. Springer, B. Granada, D.W. Piston. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. // *Nat Biotechnol*, 2004. 22(4): p. 445-9.
161. S. Jayaraman, P. Haggie, R.M. Wachter, S.J. Remington, A.S. Verkman. Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. // *J Biol Chem*, 2000. 275(9): p. 6047-50.
162. T. Nagai, K. Ibata, E.S. Park, M. Kubota, K. Mikoshiba, A. Miyawaki. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. // *Nat Biotechnol*, 2002. 20(1): p. 87-90.
163. M.V. Matz, A.F. Fradkov, Y.A. Labas, A.P. Savitsky, A.G. Zaraisky, M.L. Markelov, S.A. Lukyanov. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. // *Nat Biotechnol*, 1999. 17(10): p. 969-73.
164. G.S. Baird, D.A. Zacharias, R.Y. Tsien. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(22): p. 11984-9.
165. K. Nishizawa, Y. Kita, M. Kitayama, M. Ishimoto. A red fluorescent protein, DsRed2, as a visual reporter for transient expression and stable transformation in soybean. // *Plant Cell Rep*, 2006. 25(12): p. 1355-61.

166. R.E. Campbell, O. Tour, A.E. Palmer, P.A. Steinbach, G.S. Baird, D.A. Zacharias, R.Y. Tsien. A monomeric red fluorescent protein. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(12): p. 7877-82.
167. N.C. Shaner. The mFruit collection of monomeric fluorescent proteins. // *Clin Chem*, 2013. 59(2): p. 440-1.
168. N.C. Shaner, R.E. Campbell, P.A. Steinbach, B.N. Giepmans, A.E. Palmer, R.Y. Tsien. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. // *Nat Biotechnol*, 2004. 22(12): p. 1567-72.
169. A. Edelstein, N. Amodaj, K. Hoover, R. Vale, N. Stuurman. Computer control of microscopes using microManager. // *Curr Protoc Mol Biol*, 2010. Chapter 14: p. Unit14 20.
170. J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. // *Nat Methods*, 2012. 9(7): p. 676-82.
171. D. Knowle, R.E. Lintner, Y.M. Tuma, R.M. Blumenthal. Nature of the promoter activated by C.PvuII, an unusual regulatory protein conserved among restriction-modification systems. // *J Bacteriol*, 2005. 187(2): p. 488-97.
172. R. Reyes-Lamothe, T. Tran, D. Meas, L. Lee, A.M. Li, D.J. Sherratt, M.E. Tolmasky. High-copy bacterial plasmids diffuse in the nucleoid-free space, replicate stochastically and are randomly partitioned at cell division. // *Nucleic Acids Res*, 2014. 42(2): p. 1042-51.
173. G. Sezonov, D. Joseleau-Petit, R. D'Ari. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. // *J Bacteriol*, 2007. 189(23): p. 8746-9.
174. M.A. Shea, G.K. Ackers. The OR control system of bacteriophage lambda. A physical-chemical model for gene regulation. // *J Mol Biol*, 1985. 181(2): p. 211-30.