

Исследование антифаговой защиты, опосредованной прокариотическим белком-аргонавтом, в гетерологичной системе *Escherichia coli*.

Научный руководитель – Простова Мария Андреевна

Пантелеев Владимир Александрович

Студент (бакалавр)

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени
К.И.Скрябина, Москва, Россия
E-mail: panteleev.vova205@yandex.ru

Белки-аргонавты - металл-зависимые эндонуклеазы, использующие короткие гидовые нуклеиновые кислоты для узнавания и специфического расщепления нуклеиновых кислот - мишеней. Вопросы, связанные с функциями аргонавтов в бактериальной клетке, остаются открытыми, но предположительно одной из их ролей является защита бактерий от мобильных генетических элементов. Аргонавты имеют большой потенциал использования в различных методиках *in vitro* и для геномного редактирования *in vivo*.

Цель исследования - охарактеризовать в системе *in vitro* особенности эндонуклеазной активности аргонавта из мезофильной бактерии *Exiguobacterium marinum* (EmaAgo) и изучить его влияние на протекание фаговой инфекции *in vivo* в гетерологической системе *Escherichia coli*.

Для изучения свойств белка EmaAgo *in vitro*, он был экспрессирован в клетках *E. coli* BL21 (DE3) и очищен с помощью металл-хелатной хроматографии и аффинной хроматографии на гепариновой колонке. Для определения субстратной специфичности EmaAgo инкубировали с одноцепочечными ДНК- или РНК-мишенями и комплементарными им гидовыми ДНК или РНК, продукты реакции были визуализированы с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Было показано, что EmaAgo использует ДНК-гиды для разрезания ДНК-мишеней.

Для исследования влияния аргонавта на протекание фаговой инфекции клетки *E. coli* K-12 MG1655, несущие плазмиду pBAD со вставкой аргонавта, были заражены бактериофагом P1 (литический мутант). Кривые роста были получены с помощью плащечного спектрофотометра. Титр фага в среде определяли с помощью метода подсчета бляшек. Для определения относительных количеств ДНК бактериофага P1 и *E. coli* внутри клеток на разных стадиях инфекции бактерий отмывали от среды и разрушали. Подсчет количества ДНК производили с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени. Анализ кривых роста культур клеток, зараженных фагом, свидетельствует о том, что присутствие EmaAgo откладывает наступление полного лизиса культуры бактерий при разных множественностях инфекции. Через 7 часов после заражения, титр фага в культуре клеток с аргонавтом оказывается на 2 порядка ниже, чем в бактериях без аргонавта. Данные количественной ПЦР также показали пониженное содержание ДНК бактериофага, нормированное на количество клеточной ДНК, внутри бактерий с аргонавтом на поздних стадиях инфекции, по сравнению с клетками, не экспрессирующими EmaAgo.

Таким образом, показано, что белок-аргонавт из бактерии *E. marinum* является ДНК-зависимой ДНК-нуклеазой. Культуры клеток, экспрессирующих EmaAgo, выживают дольше после заражения бактериофагом P1, чем клетки без аргонавта, при этом производится меньшее количество фаговых частиц. Предположительно, аргонавт мешает нормальному протеканию инфекции на стадии репликации генома бактериофага, когда образуется большое количество одноцепочечной ДНК.