

**Использование флуоресцентной микроскопии в исследовании заражения
клеток бактериофагом phiKZ**

Научный руководитель – Якунина Мария Вячеславовна

Антонова Дарья Александровна

Сотрудник

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

E-mail: nasada12@mail.ru

Гигантский бактериофаг phiKZ инфицирует клетки *Pseudomonas aeruginosa*. Внутри инфицированной клетки образуется белковая структура, по своим функциям напоминающая ядро эукариотической клетки. ДНК бактериофага располагается в псевдоядре, в то время как ДНК бактерии находится в цитоплазме клетки[1]. Образование такой структуры оберегает ДНК фага от воздействия CRISPR-Cas систем и систем рестрикции-модификации[2]. Процесс образования псевдоядра, как и его роль в регуляции транскрипции генома phiKZ неясны. Применение флуоресцентной микроскопии может помочь в решении этих вопросов.

С целью выбора флуоресцентных белков для работы, на шатл-вектор pHERD20T под арабинозный промотор были помещены гены белков mCherry, mNeonGreen или YFP. Клетки *P. aeruginosa* трансформировались одной из полученных плазмид. Клетки растили в присутствии арабинозы, инфицировали phiKZ и помещали под флуоресцентный микроскоп. Эксперимент показал, что mCherry и mNeonGreen не попадают в псевдоядро, в то время как YFP оказывается внутри него. Далее ген mCherry был слит с генами gp180 или gp55. Ген gp55 кодирует субъединицу невирионной РНК-полимеразы phiKZ, которая синтезируется во время инфекции, ген gp180 кодирует субъединицу вирионной РНК-полимеразы phiKZ, которая попадает внутрь клетки вместе с ДНК фага[3]. Клетки трансформировали плазмидой, содержащей ген gp180 или gp55, и подготавливали к съемке аналогично эксперименту с флуоресцентными белками. По результатам съемки можно заключить, что gp180 остается снаружи псевдоядра, а gp55 поступает в псевдоядро (рис.1). С помощью ко-иммунопреципитации было показано, что меченная субъединица gp180 входит в состав новосинтезируемых vРНКП и способна упаковываться в новые фаговые частицы. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что благодаря физическому разобщению vРНКП и фаговой ДНК, упаковывающийся внутрь псевдоядра, происходит ингибирование ранней транскрипции. В тоже время nvРНКП для транскрипции поздних генов требуется попасть внутрь псевдоядра.

Работа сделана при поддержке Российского научного фонда, грант№ 19-74-10030.

Источники и литература

- 1) 1. Danilova, Y.A., Belousova, V.V., Moiseenko, A.V. et al. Maturation of Pseudo-Nucleus Compartment in *P. aeruginosa*, Infected with Giant phiKZ Phage // *Viruses*, Vol. 12. 2020. No. 10 p. 1197.
- 2) 2. Mendoza S.D., Nieweglowska E.S., Govindarajan S. et al. A bacteriophage nucleus-like compartment shields DNA from CRISPR nucleases // *Nature*, Vol. 577. 2020. p. 244-248.
- 3) 3. Yakunina M., Artamonova T., Borukhov S. et al. A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by a giant bacteriophage // *Nucleic Acid Res.*, Vol. 43. 2015. No. 21 p. 10411-10420.

Иллюстрации

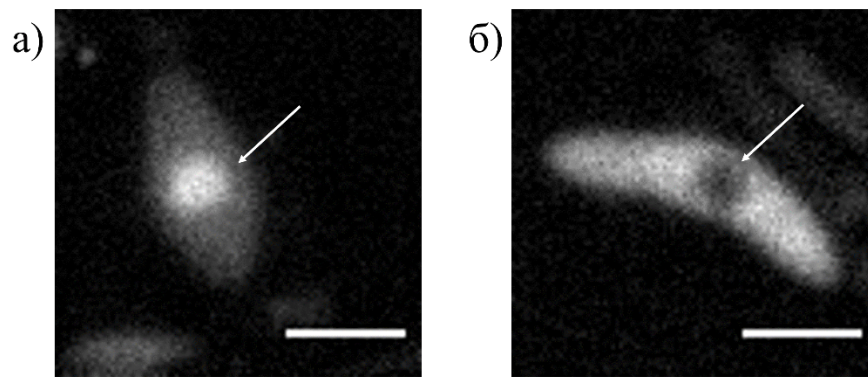


Рис. 1. Изображение инфицированных клеток *P. aeruginosa* с плазмидой, кодирующей gr55-mCh (а) или mCh-gr180 (б) на 30 минуте инфекции. Стрелка указывает на расположение псевдоядра. Масштабный отрезок 2 мкм обозначен белой полосой.