

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-88

**СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ HSPA14*****CREATION OF RECOMBINANT MYCOBACTERIAL STRAINS EXPRESSING HSPA14**А. Ю. Маркова^{1,2}, Л. Г. Кондратьева^{1,5}¹Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова³Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», МоскваA. Yu. Markova^{1,2}, L. G. Kondratyeva^{1,5}¹Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow²Lomonosov Moscow State University³National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow

✉ ayumarkova@mail.ru

Аннотация

Известно, что TLR являются основными рецепторами на поверхности клеток врожденного иммунитета, участвующими в обучении этих клеток. Получена плаزمид, содержащая ген агониста TLR — HSPA14, для создания рекомбинантных микобактериальных штаммов, экспрессирующих активаторы ТИ. Проведена трансформация микобактерий полученными конструкциями, лизаты клеток протестированы с помощью вестерн-блот-анализа.

Abstract

TLR are known as the main receptors on the surface of innate immune cells and involved in the training of these cells. A plasmid containing the TLR agonist gene, HSPA14, was obtained to create recombinant mycobacterial strains expressing trained immunity activators. Mycobacteria were transformed by this plasmid, cell lysates were analyzed using western blot.

Клетки врожденной иммунной системы способны не только распознавать патоген и реагировать на него посредством фагоцитоза и презентации антигенов, но и проявлять способность к долгосрочным адаптивным характеристикам, известными как феномен тренированного иммунитета. Тренированный иммунитет (ТИ) — программирование клеток врожденного иммунитета (моноцитов, макрофагов, дендритных клеток) при первом воздействии патогена, которое обеспечивает более сильный эффект при вторичном появлении патогена. Одними из основных рецепторов, распознающих сигналы от патогенов и активирующих врожденный иммунитет, являются Толл-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR). Активация TLR приводит к продукции провоспалительных цитокинов. Агонистами TLR являются патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP), среди которых компоненты клеточной стенки бактерий, двуцепочечная РНК и сигналы с поверхности поврежденных клеток. В частности, к агонистам TLR относится белок теплового шока HSPA14. В норме HSPA14 выполняет шаперонную функцию, его появление на мембране является сигналом клеточного стресса для TLR2 и TLR4. Ген HSPA14 был выбран для создания генетически модифицированных бактериальных штаммов, продуцирующих иммуноактиваторные белки на поверхности клетки для эффективного формирования ТИ. Одной из широко известных бактериальных вакцин, индуцирующей ТИ, является микобактериальная вакцина БЦЖ.

Лидерный пептид микобактериального гена Ag19 размеров 84 нт был получен амплификацией перекрывающихся праймеров методом ПЦР. Далее методом СПЕС (*Circular Polymerase Extension Cloning*) с использованием высокоточной Fusion полимеразы последовательность Ag19 клонировали в плазмиду pMV261, проводили трансформацию клеток *E. coli* и отбор на среде с канамицином. Состав конструкции pMV261-Ag19 был подтвержден ПЦР-скринингом, рестриктивным анализом и секвенированием по методу Сэнгера. Ген GFP был амплифицирован с использованием праймеров, содержащих сайт узнавания *SalI* на 5'-конце и последовательность FLAG на 3'-конце, и коммерческой плазмиды pEGFP-N1 в качестве матрицы. Вставку GFP-FLAG

* Работа проведена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт», а также при поддержке гранта РНФ (проект № 22-14-00308).

и вектор pMV261-Ag19 гидролизовали по *Sall* и *HpaI*, а затем лигировали в течение ночи при 16 °С. Лигатом трансформировали клетки *E.coli* и проводили отбор на среде с канамицином. Состав полученной конструкции pMV261-Ag19-GFP-FLAG был подтвержден ПЦР-скринингом и секвенированием по методу Сэнгера. Ген HSPA14 был амплифицирован с помощью ПЦР с использованием праймеров, содержащих сайт узнавания *Sall* на 5'-конце и сайт *PsiI* на 3'-конце, и ранее полученной в лаборатории плазмиды, кодирующей этот ген. Далее аналогично конструкции pMV261-Ag19-GFP-FLAG была получена плазида pMV261-Ag19-HSPA14-FLAG и подтвержден ее состав.

Затем была проведена трансформация модельных микобактерий *M. smegmatis* плазмидой pMV261-Ag19-GFP-FLAG, получены клоны, содержащие корректную плазмиду, получены лизаты клеток и протестированы с помощью вестерн-блот-анализа с использованием антител к эпитопу FLAG и GFP. Аналогично *M. smegmatis* трансформировали плазмидой pMV261-Ag19-HSPA14-FLAG, лизаты клонов с корректной плазмидой также протестировали с помощью вестерн-блот-анализа с использованием антител к эпитопу FLAG и HSPA14.