

Создание GFP-продуцирующего штамма *S. pneumoniae* для визуализации взаимодействия пневмококка с клетками хозяина

Научный руководитель – Икрянникова Лариса Николаевна

Белых Дарья Алексеевна

Студент (бакалавр)

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
Москва, Россия

E-mail: darya-belyx@mail.ru

Streptococcus pneumoniae (пневмококк) является одним из важных патогенов человека, причиной ряда заболеваний и осложнений, в том числе пневмонии, менингита, сепсиса. Ежегодно от инфекции, вызванной этим микроорганизмом, умирает свыше 1 миллиона человек в мире, при этом в группы риска попадают дети до 5 лет и пожилые люди старше 60 лет [1]. Благодаря своей клинической значимости, пневмококк является одним из наиболее исследуемых патогенов; несмотря на это, возможности генетических манипуляций с ним все еще недостаточно изучены.

Целью настоящей работы являлся выбор и валидация подхода к созданию модели взаимодействия пневмококка с поверхностью живых клеток хозяина в режиме реального времени, в том числе в объемных 3D-клеточных системах. Первым шагом стало создание генно-модифицированного штамма *S. pneumoniae*, продуцирующего зеленый флуоресцентный белок (GFP). Для этого была выбрана методика, предполагающая создание химерной конструкции на основе GFP и нуклеоид-ассоциированного хромосомно-кодируемого белка HrpA [2]. Преимущество данного подхода состоит в том, что устойчиво продуцируемый HrpA компактно локализован в клетке, а значит, созданная конструкция должна обеспечить яркое и продолжительное свечение.

Для создания GFP-продуцирующего штамма пневмококка был выбран лабораторный штамм *S. pneumoniae* 2009 (GenBank Ref. GCA_000385795.1). Трансформируемый участок был последовательно собран из пяти фрагментов, включающих, соответственно, гены, кодирующие HrpA, химерный белок GFP-HrpA и ген устойчивости к хлорамфениколу *cmR*, а также протяженные фланкирующие регионы, гомологичные соответствующим хромосомным участкам. Для трансформации был использован метод, в основе которого лежит способность альфа-гемолитических стрептококков переходить в состояние «природной компетентности» (состояние, в котором они способны легко акцептировать донорную ДНК из окружающей среды) при наличии в среде уникального для каждого штамма компетентность-стимулирующего пептида (CSP, Competence-Stimulating Peptide). Полученный генетический материал внутри клетки утилизируется, либо, при условии гомологичности, встраивается в геном. Для трансформации был использован специально синтезированный уникальный для *S. pneumoniae* 2009 пептид EMRLSKFFRDFILQRKK (CSP-1).

Успех трансформации генетической конструкции в нужный участок хромосомы штамма *S. pneumoniae* 2009 (GFP) подтверждался рядом методов, включая микроскопическое исследование, вестерн-блоттинг с использованием антител к GFP, а также амплификацию отдельных фрагментов хромосомной ДНК.

Таким образом, в результате работы получен генно-модифицированный штамм *S. pneumoniae* 2009 (GFP), обладающий устойчивым, ярким свечением в области около 500 нм. Сконструированный штамм будет использован для дальнейших исследований.

Источники и литература

- 1) Iovino F. Streptococcus pneumoniae. Methods and Protocols. – New York, NY: Humana Press, 2019. doi:10.1007/978-1-4939-9199-0
- 2) Kjos M. et al. Bright fluorescent Streptococcus pneumoniae for live-cell imaging of host-pathogen interactions // Journal of bacteriology. – 2015. – Т. 197. – №. 5. – С. 807-818. doi:10.1128/JB.02221-14