

Получение и характеристика генно-инженерных фагов с модифицированными структурными деполимеразы, специфичными к разным капсульным типам *Acinetobacter baumannii*

Сухова А.С.^{1,2}, Зверева С.Д.^{1,2}, Перескокова Е.С.¹, Коробова О.В.¹, Борзилов А.И.¹, Попова А.В.¹

¹ ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

Введение

Acinetobacter baumannii – один из наиболее значимых возбудителей внутрибольничных инфекций во всем мире. Возможным подходом для решения проблемы широкого распространения антибиотико-резистентных штаммов *A. baumannii* является использование литических бактериофагов. Первичными рецепторами для фагов, несущих структурные деполимеразы, являются капсульные полисахариды (КПС) *A. baumannii*, которые формируют толстый защитный слой вокруг клетки. На сегодняшний день насчитывается более 240 вариантов капсульных генных локусов, предсказанных в геномах *A. baumannii* биоинформатически. Генетическая модификация фагов может способствовать созданию коллекции бактериальных вирусов, способных инфицировать разные капсульные типы внутри одного вида.

Цель

Разработка методологии получения *A. baumannii*-фагов с измененной капсульной специфичностью путем CRISPR/Cas9-редактирования, изучение биологических свойств и оценка профилактической и терапевтической эффективности полученных рекомбинантных фагов в сравнении с природными фагами на септической модели ацинетобактерной инфекции у лабораторных животных.

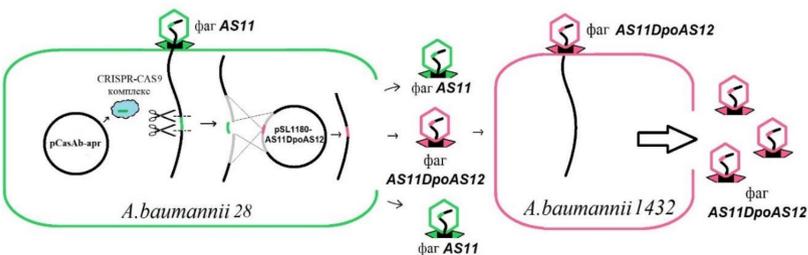


Рисунок 1 – Схема редактирования генома фага AS11, демонстрирующая вставку фрагмента гена, кодирующего ферментативно-распознающий домен деполимеразы фага AS12, в геном фага AS11.

Материалы и методы

В работе были использованы вирулентные фаги рода *Friuvirus*: vB_AbaP_AS11 (AS11, номер доступа Genbank: KY268296) и vB_AbaP_AS12 (AS12, Genbank: KY268295), на основе которых были получены рекомбинантные фаги с измененной капсульной специфичностью, обозначенные как AS11DpoAS12 и AS12DpoAS11.

Особенности взаимодействия рекомбинантных фагов с бактериальными клетками *A. baumannii* были изучены в экспериментах по определению параметров инфекционного процесса.

Для изучения лечебно-профилактической эффективности рекомбинантного фага AS11DpoAS12 в сравнении с природным фагом AS12, инфицирующим тот же штамм *A. baumannii*, использовали очищенные фаголизаты, которые вводили мышам линии BALB/c по следующим схемам: внутрибрюшинно однократно за 1 ч до инфицирования; внутрибрюшинно через 1,5 ч после инфицирования, 1 раз в день в течение 5 суток; внутрибрюшинно однократно через 1,5 ч после инфицирования; внутрибрюшинно однократно через 6 ч после инфицирования. Разовая доза фагов во всех случаях составляла 1×10^9 БОЕ/мышь.

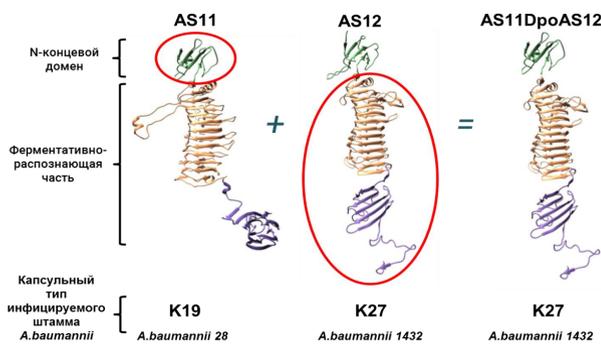


Рисунок 2 – Схема конструирования гибридной деполимеразы AS12DpoAS11.

Результаты

Разработана методология редактирования геномов вирулентных *A. baumannii*-фагов (Рис. 1), с помощью которой получены:

- рекомбинантный фаг AS11DpoAS12 со вставкой гибридного гена, кодирующего структурную деполимеразу, содержащую N-концевой домен деполимеразы фага AS11 и ферментативно-распознающую часть деполимеразы фага AS12 (Рис.2), специфичной к капсульным полисахаридам (КПС) K27-типа *A. baumannii* 1432 (Рис.3).

- рекомбинантный фаг AS12DpoAS11 со вставкой гибридного гена, кодирующего структурную деполимеразу, содержащую N-концевой домен деполимеразы фага AS12 и ферментативно-распознающую часть деполимеразы фага AS11, специфичной к КПС K19-типа *A. baumannii* 28.

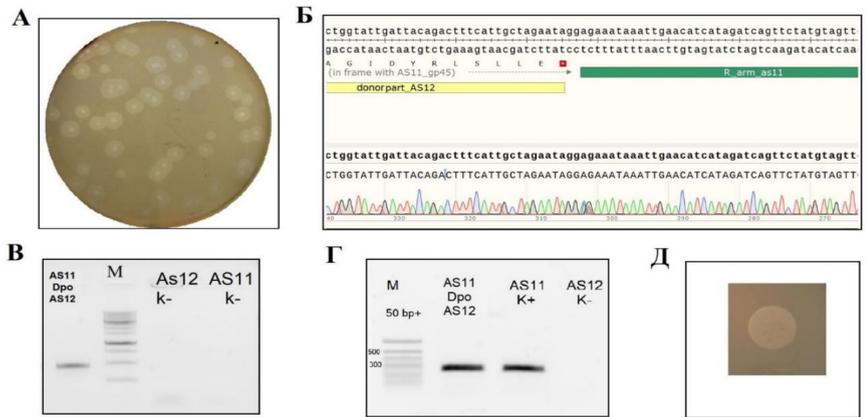


Рисунок 3 – А. Морфология негативных колоний рекомбинантного фага AS11DpoAS12; Б. Хроматограмма фрагмента гибридного участка ДНК фага AS11DpoAS12; В. Электрофореграмма продуктов ПЦР со специфическими праймерами на гибридный участок ДНК фага AS11DpoAS12; Г. Электрофореграмма продуктов ПЦР со специфическими праймерами на уникальный для фага AS11 ген *g_5*; Д. Зона деполимеризации, сформированная на бактериальном газоне *A. baumannii* 1432, при нанесении препарата, содержащего гибридную деполимеразу, состоящую из N-концевого домена деполимеразы фага AS11 и ферментативно-распознающей части деполимеразы фага AS12; М – маркер 1 kb DNA Ladder, М 50 bp+ и 50+ bp DNA Ladder (Евроген).

Показано, что в течение 5 мин адсорбируются почти 95%, а в течение 10 мин почти 99% частиц рекомбинантного фага AS11DpoAS12, что соответствует показателям скорости адсорбции природного фага AS12 (Рис. 4).

Константа скорости адсорбции составляет $5,79 \cdot 10^{-9}$ мл/мин для фага AS11DpoAS12 и $6,27 \cdot 10^{-9}$ мл/мин – для фага AS12, соответственно.

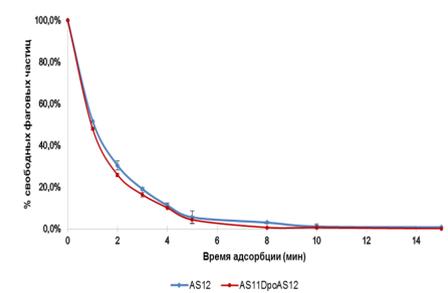


Рисунок 4 – Скорости адсорбции рекомбинантного фага AS11DpoAS12 и природного фага AS12 на клетках штамма *A. baumannii* 1432.

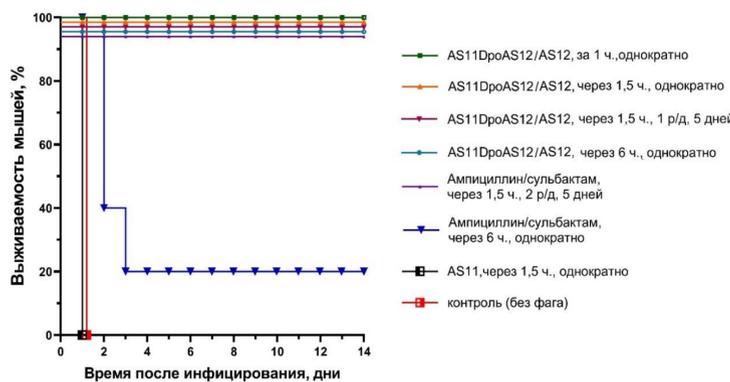


Рисунок 5 – Эффективность рекомбинантного фага AS11DpoAS12 в сравнении с природными фагами и антибиотиком при лечении и профилактике летальной ацинетобактерной инфекции, вызванной штаммом *A. baumannii* 1432, у мышей.

Лечебно-профилактическая эффективность рекомбинантного фага AS11DpoAS12 изучена в сравнении с природными вирулентными фагами AS12 и AS11 на септической модели ацинетобактерной инфекции у лабораторных животных. Внутрибрюшинное введение препарата очищенного рекомбинантного фага AS11DpoAS12 и природного фага AS12 той же специфичности за 1 ч до, через 1,5 и через 6 ч после парентерального инфицирования летальной дозой штамма *A. baumannii* 1432, обеспечивает выживание 100% животных (Рис.5).

Выводы

В ходе проведенного исследования разработан и оптимизирован протокол, позволяющий стабильно получать путем Cas9-редактирования и гомологичной рекомбинации рекомбинантные *A. baumannii*-фаги с измененной капсульной специфичностью. Для рекомбинантных фагов, как и для природных, продемонстрирована высокая скорость адсорбции к клеткам *A. baumannii*. Также продемонстрирована высокая лечебно-профилактическая эффективность данных фагов в экспериментах на модели летальной ацинетобактерной инфекции у мышей.

