

УДК 577.18

ИНГИБИРОВАНИЕ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ ПУТЕМ CRISPR/Cas9-SAM ОПОСРЕДОВАННОГО УСИЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПЕПТИДОГЛИКАН-РАСПОЗНАЮЩИХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ ЛИНИИ HeLa

© 2020 П.А. Бобровский^{1*}, В.Д. Мороз¹, В.Н. Лавренова^{1,2},
В.А. Манувера¹, В.Н. Лазарев¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России
119435 Москва, Россия; электронная почта: pbobrovskiy@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 07.07.2020

После доработки 22.08.2020

Принята к публикации 23.08.2020

Глобальная проблема роста антибиотикорезистентности микроорганизмов делает актуальным поиск новых природных веществ, обладающих антибактериальными свойствами. К данной группе относят пептидогликан-распознающие белки (PGLYRP), являющиеся компонентами врожденного иммунитета многих организмов, в том числе и человека. Эти белки обладают уникальным механизмом действия, позволяющим избегать формирования резистентности к ним бактерий, а также быть активными как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий. Однако применение рекомбинантных пептидогликан-распознающих белков не всегда целесообразно из-за сложности локальной доставки белков и их стабильности, в связи с этим представляется актуальным активация компонентов собственного врожденного иммунитета. Целью данного исследования было увеличить уровень экспрессии собственных генов пептидогликан-распознающих белков человека в клетках линии HeLa с помощью технологии редактирования генома, используя синергичные медиаторы активации (CRISPR/Cas9-SAM), чтобы оценить антихламидийный эффект PGLYRP. Мы показали активацию генов двухкомпонентной системы хламидий *ctcB-ctcC*, играющей ключевую роль в механизме действия пептидогликан-распознающих белков. Нами были получены клетки линии HeLa, трансдуцированные лентивирусами, кодирующими активационную систему CRISPR/Cas9-SAM с повышенной экспрессией генов *pglyrp*. Мы показали, что активация экспрессии генов собственных пептидогликан-распознающих белков человека в линии клеток HeLa приводит к ингибированию развития хламидийной инфекции. Предложенный подход позволяет использовать возможности врожденного иммунитета для борьбы с инфекционными заболеваниями, вызываемыми грамположительными и грамотрицательными бактериями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пептидогликан, *Chlamydia trachomatis*, PGLYRP, CRISPR/Cas9.

DOI: 10.31857/S0320972520110032

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день рост количества антибиотикорезистентных штаммов является глобальной проблемой. Возникновение резистентных штаммов приводит к снижению эффектив-

ности терапии социально-значимых инфекционных заболеваний. Заболевания, вызываемые резистентными штаммами, труднее поддаются лечению и часто протекают в более тяжелой форме [1]. Описаны серьезные побочные эффекты применения некоторых антибиотиков [2, 3]. В этой связи становится актуальным поиск новых природных веществ, обладающих бактерицидными свойствами. Перспективными кандидатами являются пептидогликан-распознающие белки (PGLYRP, peptidoglycan recognition proteins), обнаруженные у многих организмов от насекомых до млекопитающих. Эти белки являются компонентами системы врожденного иммунитета, выполняющей роль первого барьера

Принятые сокращения: CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; dCas9 – дефектная нуклеаза Cas9; DMEM – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла; HSF1 – фактор теплового шока; PEI – полиэтиленимин; PGLYRP – пептидогликан-распознающие белки; p65 – субъединица транскрипционного фактора NF-κB; SAM – синергичные медиаторы активации.

* Адресат для корреспонденции.

иммунной защиты организма [4]. Все PGLYRP содержат пептидогликан-распознающие домены, связывающие пептидогликан в пептидогликан-связывающей бороздке, открывающейся при клеточном делении [5]. Также они содержат сайты связывания с липополисахаридами и липотейхоевыми кислотами [6, 7]. Таким образом, PGLYRP способны узнавать пептидогликан, липополисахариды и липотейхоевые кислоты клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий [7]. У млекопитающих описано четыре PGLYRP: PGLYRP1, PGLYRP3, PGLYRP4, которые были идентифицированы как бактерицидные белки, и PGLYRP2, который дополнительно обладает амидазной активностью. В 2011 г. был предложен механизм действия этих белков. PGLYRP связываются с пептидогликаном бактериальной клеточной стенки или липополисахаридами наружных мембран и активируют белок-чувствительную двухкомпонентную систему [5]. Бактерии имеют множество двухкомпонентных систем, которые состоят из сенсорных и регуляторных компонентов и позволяют бактериям быстро реагировать на изменяющиеся условия окружающей среды. Двухкомпонентные системы CsrR-CsrS у *Bacillus subtilis* и CpxA-CpxR у *Escherichia coli* являются функциональными гомологами, и аналогичные двухкомпонентные системы характерны для большинства бактерий [8, 9]. Эти двухкомпонентные системы обнаруживают и элиминируют секретлируемые и мембранные белки с неправильной структурой, причем они реагируют как на собственные, так и на чужеродные белки, независимо от причины накопления белка в примембранном компартменте [10, 11]. Помимо этого, они также могут подавать сигнал в клетку для активации продукции гидроксильных радикалов, деполяризации мембраны, прекращения синтеза белков, РНК и ДНК, что приводит к гибели бактериальной клетки [12]. Поскольку эти белки являются частью системы врожденного иммунитета человека, высокая бактерицидная активность по отношению к патогенным микроорганизмам и устойчивость собственной микрофлоры [13] являются неоспоримыми преимуществами по сравнению с антибиотиками. Особый интерес представляет активность PGLYRP по отношению к внутриклеточным паразитам, таким как, например *Chlamydia*, которая является патогенной грамотрицательной бактерией с уникальным жизненным циклом. Хламидии вызывают серьезные патологии беременности и родов, непроходимость маточных труб и офтальмохламидиоз [14, 15]. Хламидии существуют в организме в двух формах: инфекционные, метаболически неак-

тивные элементарные тельца, и неинфекционные, метаболически активные ретикулярные тельца [16]. Уникальные особенности взаимоотношений хламидий с иммунной системой человека часто способствуют развитию персистирующей формы инфекции [17]. Ранее мы продемонстрировали антибактериальную активность рекомбинантных PGLYRP человека в отношении внутриклеточной патогенной бактерии *Chlamydia trachomatis* и активацию экспрессии генов двухкомпонентной системы CtcB-CtcC после контакта хламидийных элементарных телец с PGLYRP [18]. Альтернативой применения рекомбинантных антимикробных белков, полученных в гетерологичных системах экспрессии, является использование различных генотерапевтических подходов. Одним из способов борьбы с инфекционными заболеваниями с помощью генной терапии является введение генетических конструкций, кодирующих различные компоненты врожденного иммунитета, например антимикробные пептиды [19–21], или активация экспрессии белков врожденного иммунитета [22]. В данной работе с использованием технологии геномного редактирования, применяя синергичные медиаторы активации (SAM, Synergistic Activation Mediator), мы смоделировали ингибирование развития хламидийной инфекции путем увеличения уровня экспрессии генов пептидогликан-распознающих белков в клетках линии HeLa. Полученные данные демонстрируют, что данный подход может являться многообещающим инструментом для специфической и целевой активации компонентов врожденного иммунитета для борьбы с тяжелыми инфекционными заболеваниями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и клеточные линии. В работе использовали штамм *E. coli* TOP10 («Invitrogen», США), генотип F – mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ -, элементарные тельца штамма *C. trachomatis* D/UW-3/Cx (ATCC VR-885) («ATCC», США), очищенные путем ультрацентрифугирования в градиенте урографина, как описано ранее [23].

В работе использовали клеточные линии HeLa («ATCC CCL-2», США) и HEK-293FT («Thermo Fisher Scientific», США). Клетки HeLa культивировали в среде DMEM («Thermo Fisher Scientific», США), содержащей 10%-ную инактивированную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) («Thermo Fisher Scientific», США) и

Список олигонуклеотидов, использованных в работе

Праймеры для клонирования протоспейсеров	Последовательность праймеров (5'–3')
pglyrp1-1F	caccgagaagatgtgccaatgcccc
pglyrp1-2F	caccgaacttacatcgagaggcc
pglyrp2-1F	caccgagaagagactggggagacc
pglyrp2-2F	caccgtctgaaccacctggtctcc
pglyrp3-1F	caccgattagtgcctcacattat
pglyrp3-2F	caccggccccgagaagcctgagcc
pglyrp4-1F	caccgctggaggagaaggcaccat
pglyrp4-2F	caccgggactcctccctgggaa
pglyrp1-1R	aaacggggcattggcacatctctc
pglyrp1-2R	aaacggcctctcgatgtaagtcc
pglyrp2-1R	aaacggctctccccagctctctc
pglyrp2-2R	aaacggagaccaggtggtcagacc
pglyrp3-1R	aaacataaatgtgaggcactaatc
pglyrp3-2R	aaacggctcaggctctcggggccc
pglyrp4-1R	aaacactggcgcctctcctccagc
pglyrp4-2R	aaactcccaggaggagtgcccc
Праймеры для количественной ПЦР	
pglyrp 1qF1	gcctgaggtccaactatgt
pglyrp 1qR1	cggtagtgtggccaattctg
pglyrp 2qF1	ctgtctcatggactctgtca
pglyrp 2qR1	cttagtgggcaggatcca
pglyrp 3qF1	tgccctaggaattgccttca
pglyrp 3qR1	gcccacagcaggtagtttg
pglyrp 4qF1	tgactcccaactacctgctg
pglyrp 4qR1	tgagccaagctggatggtta
ctcbF	tctcacgacttctcttct
ctcbR	caggatctatagagcgtgt
ctccF	caagcgtacaacaagaca
ctccR	tggttgcaaatggatcgga
euoF	gcagcaagaagagaatgctg
euoR	tgcgctcagcttctctt
omcbF	tgcaacagtatgcgctgtc
omcbR	aagaccaatctgctctgca
actbF	agagctacgagctgcctgac
actbR	agcactgtgtggcgtacag

10 мкг/мл гентамицина («Thermo Fisher Scientific», США). При моделировании хламидийной инфекции клетки HeLa культивировали до достижения монослоем 80–90% конфлюент-

ности с использованием среды без антибиотиков. Клетки заражали элементарными тельцами *S. trachomatis* с множественностью инфекции 0,9–1,0 ВОЕ (включение образующих единиц) на клетку центрифугированием в течение 1 ч при 900 г. После центрифугирования клетки культивировали в термостате при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Для продукции PGLYRP клетки-продуценты HeLa-PGLYRP, полученные нами ранее [18], культивировали в среде DMEM с 10 мкг/мл гентамицина и без ЭТС в течение 72 ч.

Количественная ПЦР. Выделение РНК из образцов проводили реагентом Trizol («Thermo Fisher Scientific», США). Суммарную РНК обрабатывали 2 е.а. ДНКазы I («Thermo Fisher Scientific», США) в присутствии 20 е.а. ингибитора рибонуклеаз («Thermo Fisher Scientific», США). Синтез первой цепи кДНК проводили с помощью RevertAid RT Reverse Transcription Kit («Thermo Fisher Scientific», США) с использованием гексамерных праймеров. Последовательности праймеров («Литех», Россия), использованных в работе, представлены в таблице. ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе CFX96 Touch («BioRad», США) с использованием Taq-полимеразы («Литех», Россия) и 0,1× SYBR-Green («Thermo Fisher Scientific», США). Количество РНК, соответствующей целевым и референсным генам, определяли по разности порогового цикла реакции (Ct) для каждого образца. Для определения уровня экспрессии *pglyrp 1–pglyrp 4* использовали специфические праймеры. Нормализацию данных проводили по уровню референсного гена β-актина (использовали пару праймеров actbF/actbR). Для определения уровня активации двухкомпонентной системы хламидий использовали пары праймеров ctcbF/ctcbR и ctccF/ctccR. Данные были нормированы по уровню генов *euo* и *omcB* (использовали пары праймеров euoF/euoR и omcbF/omcbR) (таблица).

Конструирование плазмидных векторов для активации экспрессии генов PGLYRP. Система активации экспрессии SAM включает в себя три плазмидных вектора: lenti sgRNA(MS2)_puro, lenti MS2-P65-HSF1_Hygro и lenti dCAS-VP64_Blast («Addgene», США) [24]. Для получения вектора, кодирующего химерную гидовую РНК, вектор lenti sgRNA(MS2)_puro был обработан эндонуклеазой рестрикции BsmBI («Thermo Fisher Scientific», США), после чего были клонированы олигонуклеотидные дуплексы, соответствующие протоспейсерным последовательностям, расположенных в промоторных областях пептидогликан-распознающих белков (таблица). Подбор протоспейсерных

последовательностей проводили с помощью сервиса crisprg по наличию специфических РАМ-последовательностей в промоторных регионах [25].

Продукция лентивирусов и трансдукция. Для сборки лентивирусов клеткам НЕК-293FT меняли среду на DMEM с 25 мкМ хлорохин дифосфата («Sigma», США) и инкубировали в течение 5 ч. Клетки, культивированные в матрасах площадью 225 см², трансфицировали одновременно четырьмя плазмидами с помощью полиэтиленимина (PEI): PEIMAX 40K (1мг/мл) («Polysciences», США) (соотношение ДНК/PEI = 1/3), согласно описанной ранее методике [26]. После инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре смесь ДНК/PEI по каплям добавляли к клеткам и инкубировали в течение 6 ч. Затем среду меняли на OptiMEM с 2 мМ бутиратом натрия («Sigma», США). Через 48 ч среду, содержащую лентивирусы, концентрировали на колонках Amicon 30 кДа («Merk», США) до уменьшения объема в 50 раз, после чего замораживали при -70 °С.

Сконцентрированные вирусные частицы добавляли к клеткам HeLa в среду DMEM, содержащую 50 мкг/мл протамина сульфата («Эллара», Россия). Клетки инкубировали в течение 6 ч. Далее среду меняли на DMEM с соответствующим антибиотиком и культивировали клетки при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ до момента гибели всех нетрансдуцированных клеток.

Получение трансдуцированных линий с активной экспрессией PGLYRP. Для получения трансдуцированных линий с активированной экспрессией собственных PGLYRP проводили последовательную трансдукцию тремя лентивирусами с промежуточной селекцией. Для селекции клеток HeLa, трансдуцированных лентивирусом dCAS-VP64_Blast, использовали бластицидин (3 мкг/мл). Для селекции клеток HeLa, трансдуцированных MS2-P65-HSF1_Hygro, использовали бластицидин и гигромицин (3 мкг/мл и 550 мкг/мл соответственно). Полученную клеточную линию назвали HeLa-dCas9-MS2. Для селекции клеток HeLa, трансдуцированных лентивирусом sgRNA(MS2)_rigo-PGLYRP1-4, использовали бластицидин, гигромицин и пурамицин (3 мкг/мл, 550 мкг/мл и 0,5 мкг/мл соответственно). Для анализа антихламидийной активности культуральную среду меняли на DMEM без антибиотиков.

Флуоресцентная микроскопия. Клетки, инфицированные *S. trachomatis*, окрашивали антителами РекомбиСлайд («Галарт Диагностикум», Россия) по описанной ранее методике [18] через 48 ч после заражения. Степень заражения определяли количественно путем подсчета количест-

ва клеток и включений с использованием флуоресцентной микроскопии не менее чем в 10 полях зрения в трех повторах. Изображения были получены с помощью микроскопа Nikon Eclipse E800 («Nikon», Япония) с аргоновым (488 нм) и гелий-неоновым (594 нм) лазерами. Изображения получали с помощью программного обеспечения EZ-C1 («Nikon», Япония), а анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ 1.48 [27]. Для определения антихламидийной активности PGLYRP определяли количество включений в клетках, синтезирующих PGLYRP относительно немодифицированных клеток HeLa.

Статистический анализ данных. Для количественного анализа экспрессии генов *pglyrp* использовали метод Pfaffl [28]. Для количественного анализа экспрессии генов двухкомпонентной системы использовали метод 2^{-ΔΔCT} [29]. Анализ данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента и теста множественных сравнений (двухсторонний дисперсионный анализ) с использованием программного обеспечения Statistica 8.0 («StatSoft», Россия). Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Различия между средними значениями считались значимыми при *p* < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Модификация клеток HeLa с использованием технологии CRISPR/Cas9-SAM для транскрипционной активации генов *pglyrp*. Для каждого гена *pglyrp* было подобрано по две протоспейсерных последовательности в области промоторов. В результате было сконструировано 8 плазмидных векторов, кодирующих гидовые РНК для распознавания промоторных областей генов *pglyrp*. Эти векторы были использованы для получения лентивирусов и трансдукции клеток HeLa-dCas9-MS2. Эти клетки синтезируют дефектную нуклеазу Cas9, не способную вносить разрывы в цепь ДНК после связывания с гидовой РНК, слитую с тетрамером VP16 для активации транскрипции, а также химерный белок фактора теплового шока 1 (HSF1), и субъединицы р65 фактора транскрипции NF-κB для привлечения транскрипционных факторов. Для определения транскрипционной активации генов *pglyrp* была выделена суммарная РНК, получена кДНК с использованием гексамерных праймеров, после чего была проведена ПЦР в режиме реального времени. Было показано, что в клетках, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими гидовые РНК с протоспейсерными

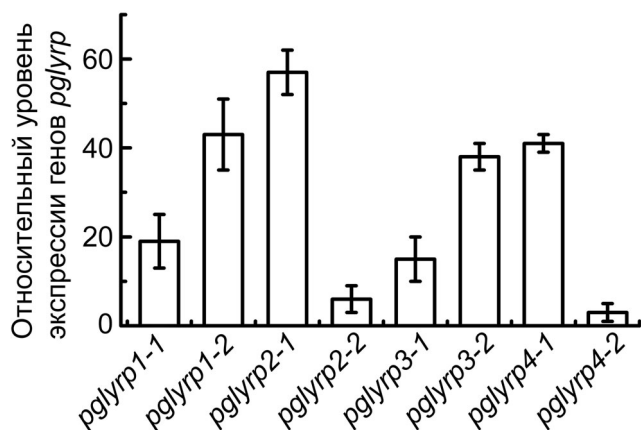


Рис. 1. Относительное изменение уровня экспрессии генов *pglyrp* в трансдуцированной линии клеток HeLa лентивирусами, кодирующими компоненты активационной системы CRISPR/Cas9-SAM. Для каждого гена *pglyrp* было подобрано по два протоспейсера для конструирования гидовой РНК. На гистограмме столбцы соответствуют разным протоспейсерным последовательностям гидовых РНК

последовательностями *pglyrp1-2*, *pglyrp2-1*, *pglyrp3-1* и *pglyrp4-1*, относительный уровень экспрессии целевых генов составил $43,2 \pm 8,1$, $57,0 \pm 5,2$, $38,5 \pm 3,1$ и $41,8 \pm 2,6$ соответственно

(рис. 1). Для дальнейшей работы были использованы трансдуцированные клетки с наибольшим уровнем экспрессии.

Анализ активации двухкомпонентной системы *C. trachomatis*. Для изучения активации экспрессии генов двухкомпонентной системы CtcB-CtcC хламидий в ответ на PGLYRP мы использовали стабильные линии клеток-продуцентов рекомбинантных PGLYRP, полученных нами ранее [18]. Мы выделили суммарную РНК из клеток, инфицированных *C. trachomatis*, через 30, 60, 90, 120, 180 и 300 мин после заражения. С помощью ПЦР в режиме реального времени была показана активация экспрессии генов двухкомпонентной системы хламидий (*ctcB* и *ctcC*) после инфицирования клеточных линий-продуцентов рекомбинантных PGLYRP. Уровни мРНК *ctcB-ctcC* сравнивали с исходным количеством мРНК этих генов в интактных элементарных тельцах. Мы показали, что инкубация хламидийных элементарных телец в культуральной среде с рекомбинантными PGLYRP приводила к значительному увеличению уровня мРНК генов *ctcB* и *ctcC* (рис. 2).

Максимальные уровни мРНК наблюдали через 2 ч после контакта элементарных телец с

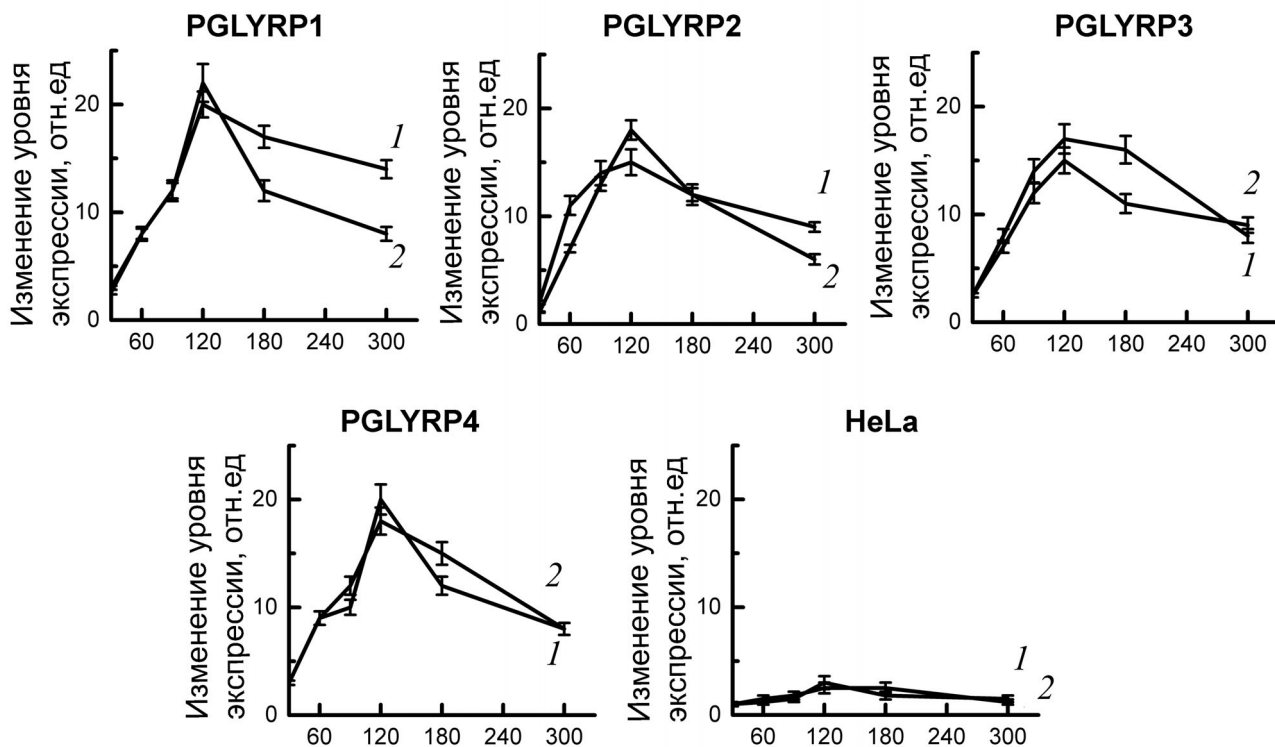


Рис. 2. Анализ активации двухкомпонентной системы CtcB-CtcC *C. trachomatis* после взаимодействия с рекомбинантными PGLYRP. Суммарную РНК выделяли из клеток через 30, 60, 90, 120, 180 и 300 мин после заражения. Данные ПЦР в режиме реального времени нормировали по уровню генов *euo* и *omcB*. Данные представлены как изменение уровня экспрессии, рассчитанные по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$. Изменение уровня экспрессии генов *ctcB* (линия 1) и *ctcC* (линия 2) оценивали относительно уровня РНК в интактных элементарных тельцах, не контактировавших с PGLYRP

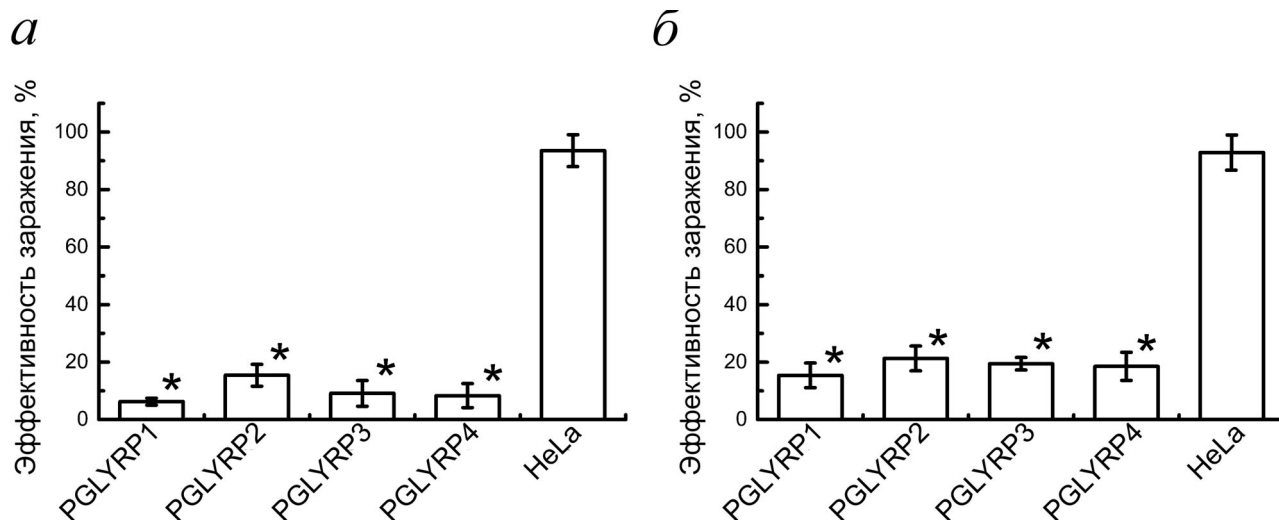


Рис. 3. Определение антихламидийной активности PGLYRP. *а* – Гистограмма, показывающая эффективность заражения клеток HeLa – продуцентов рекомбинантных PGLYRP. *б* – Гистограмма, показывающая эффективность заражения трансдуцированных клеток HeLa с активированной экспрессией генов собственных PGLYRP с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9-SAM (* $p < 0,05$)

PGLYRP. Экспрессия гена *ctcB* увеличилась в 15–20 раз, а *ctcC* – в 15–22 раза от исходного количества мРНК в хламидийных элементарных тельцах. После добавления элементарных телец в среду к контрольным клеткам HeLa уровни мРНК существенно не отличались от исходного количества мРНК *ctcB-ctcC* в элементарных тельцах.

Антихламидийная активность PGLYRP. Для определения антихламидийной активности PGLYRP мы подсчитали количество включений *S. trachomatis*, образующихся в клетках стабильных линий HeLa, продуцирующих рекомбинантные PGLYRP, и в трансдуцированных клетках линии HeLa с активированной экспрессией генов *pglyrp* через 48 ч после добавления элементарных телец в среду, содержащую PGLYRP. Была определена эффективность заражения ((количество включений/общее количество клеток) × 100%). Эффективность заражения клеток-продуцентов рекомбинантных PGLYRP, инфицированных *S. trachomatis* составляла $6,2 \pm 1,0\%$, $15,4 \pm 2,9\%$, $9,1 \pm 3,3\%$ и $8,3 \pm 4,0\%$ для PGLYRP1, PGLYRP2, PGLYRP3 и PGLYRP4 соответственно, в то время как для контрольных клеток эффективность заражения составляла $93,5 \pm 6,2\%$ (рис. 3, *а*). Через 48 ч после заражения элементарными тельцами пулов трансдуцированных клеток HeLa-PGLYRP эффективность заражения составила $15,4 \pm 3,2\%$, $21,3 \pm 3,2\%$, $19,4 \pm 1,8\%$ и $18,5 \pm 3,7\%$ для клеток-продуцентов PGLYRP1, PGLYRP2, PGLYRP3 и PGLYRP4 соответственно. Эффективность заражения контрольных клеток составила $92,9 \pm$

$\pm 6,9\%$ (рис. 3, *б*). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка.

Таким образом, мы показали, что активация экспрессии генов пептидогликан-распознающих белков человека в линии клеток HeLa приводит к ингибированию развития хламидийной инфекции в условиях *in vitro*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Кожа и слизистые оболочки защищают организм от проникновения патогенной микрофлоры. Эти ткани образуют не только механический барьер, но также синтезируют и секретируют различные антимикробные пептиды и белки [30, 31]. Антимикробные белки и пептиды считаются наиболее перспективными противоинфекционными агентами, поскольку они вызывают меньше побочных эффектов по сравнению с антибиотиками [32], и развитие резистентности к ним затруднено в силу специфического механизма действия [33]. Одним из направлений поиска новых антимикробных препаратов, как альтернативы антибиотикам, является исследование врожденных систем защиты организма. Пептидогликан-распознающие белки представляют собой класс бактерицидных белков системы врожденного иммунитета. Эти белки активны против патогенных грамотрицательных и грамположительных бактерий *in vivo* и *in vitro* [12, 34] и обладают уникальным механизмом действия. Он заключается в том, что PGLYRP связываются с пептидогликаном клеточной

стенки бактерии во время деления и активируют бактериальную двухкомпонентную систему ответа на стресс, в результате чего происходит индукция деполяризации мембраны и продукции гидроксил-радикалов в цитоплазме [12]. Этот процесс сопровождается прекращением всех основных внутриклеточных биосинтетических реакций, вероятно, из-за нехватки энергии, зависящей от мембранного потенциала [35]. Двухкомпонентные белок-чувствительные системы, которые играют роль в этом механизме действия, предназначены для обнаружения и утилизации бактериальных белков с неправильной структурой, которые не смогли выйти в периплазматическое пространство или экспортироваться из клетки, застряв в мембране [8, 9]. Связывание PGLYRP с пептидогликаном вызывает изменение в PGLYRP, что блокирует пептидогликан в пептидогликан-связывающей бороздке и делает связывание необратимым [36]. PGLYRP также имеют гидрофобную часть на противоположной стороне от пептидогликан-связывающей бороздки, в результате чего эти белки распознаются как белки с неправильной структурой, которые обычно имеют открытые гидрофобные участки, либо как агрегированные белки, поскольку неправильно свернутые белки часто агрегируют и связываются с пептидогликаном [37]. Особенность механизма действия PGLYRP заключается в том, что PGLYRP убивает бактерии, одновременно вызывая у них окислительный, тиол-дисульфидный и металлический стресс. Окислительный стресс, индуцированный PGLYRP, возникает из-за повышенной выработки перекиси водорода и гидроксильных радикалов [5, 38, 39]. Тиол-дисульфидный стресс возникает из-за истощения пула внутриклеточных тиолов, в особенности глутатиона (более чем на 90%), а металлический стресс возникает в связи с увеличением внутриклеточной концентрации ионов Zn^{2+} и Cu^{2+} [38, 39]. Для бактерицидного эффекта требуется индукция всех трех стрессовых реакций. Каждая реакция на стресс в отдельности является только бактериостатической, и только комбинированная индукция всех трех событий является бактерицидной [39]. Устойчивость к PGLYRP могла бы возникнуть, если бы все три реакции на стресс (т.е. на окислительный, тиоловый и металлический стресс) индуцировались PGLYRP через один сигнальный путь. Однако PGLYRP индуцирует окислительный, тиоловый и металлический стресс тремя независимыми путями [38]. При этом каждый PGLYRP обладает разным спектром бактерицидной активности [34]. По всей видимости, бактерии нормальной флоры выработали устойчивость к бактерицидным белкам в органах и

тканях, где постоянно секретируются PGLYRP (например, в коже, глазах и слизистых оболочках секретируются PGLYRP3 и PGLYRP4), и могут колонизировать эти области. Бактериостатическое действие PGLYRP на бактерии нормальной флоры имеет физиологический смысл для хозяина — бактерии нормальной флоры не погибают, но их разрастание ограничено [13].

Пептидогликан является основным компонентом клеточных стенок бактерий и мишенью для некоторых антибактериальных препаратов. Ранее считалось, что у хламидий нет пептидогликана, хотя в геноме присутствуют все компоненты для его биосинтеза [40, 41], в связи с этим влияние PGLYRP на хламидии не исследовалось. В 2014 г. было показано наличие пептидогликана у хламидий [42]. Также у хламидий присутствует двухкомпонентная система (StcB-StcC) [43], которая может принимать участие в механизме действия PGLYRP. Хламидии являются облигатными внутриклеточными грамотрицательными бактериями, способными обходить механизмы иммунной защиты и сохраняющими жизнеспособность в клетках в течение длительного периода времени [44]. Ранее мы впервые показали антихламидийную активность выделенных и очищенных рекомбинантных пептидогликан-распознающих белков, полученных в клетках человека Exp293, определили минимальные подавляющие концентрации [18] и оценили уровень накопления белков в линиях-продуцентах [45]. В этой работе мы оценили антихламидийный эффект стабильных линий клеток HeLa, которые секретируют рекомбинантные человеческие PGLYRP1, PGLYRP2, PGLYRP3 и PGLYRP4. Мы показали, что при заражении линий-продуцентов рекомбинантных PGLYRP количество идентифицируемых хламидийных включений внутри клеток ниже, чем при заражении контрольных клеток (рис. 3, а).

Мы показали, что контакт PGLYRP с элементарными тельцами *S. trachomatis* способствует увеличению уровня экспрессии генов двухкомпонентной системы, что может приводить к ингибированию хламидийной инфекции (рис. 2). При этом максимальное количество мРНК генов двухкомпонентной системы наблюдается через 2 ч после контакта с раствором рекомбинантного белка. Для некоторых бактериальных двухкомпонентных систем описан механизм аутоактивации, который может объяснить чрезмерную индукцию реакции на стресс [46]. Таким образом, вероятно, механизм действия PGLYRP на хламидии схож с действием этих белков на другие бактерии.

Существуют ограничения на использование рекомбинантных белков для терапии инфекци-

онных заболеваний. Это низкая стабильность некоторых выделенных рекомбинантных белков [47], а также ограниченная возможность локального применения [48]. Альтернативным вариантом применения рекомбинантных белков могут служить генотерапевтические подходы путем активации собственных генов системы врожденного иммунитета для борьбы с инфекцией [49]. Генная терапия инфекционных заболеваний имеет значительный потенциал для лечения инфекций, которые не поддаются стандартному клиническому лечению [50–54]. При этом одним из способов терапии является индукция врожденного иммунитета, например через активацию сигнальных путей Toll-подобных рецепторов [55, 56].

Для определения антихламидийной активности PGLYRP человека мы повысили уровень экспрессии генов *pglyrp* в клетках линии HeLa с помощью системы CRISPR/Cas9-SAM. Система синергичных медиаторов активации состоит из трех компонентов: специфичная химерная гидовая РНК, имеющая два аптамера MS2 для связывания с димеризованными белками оболочки бактериофага MS2; белки MS2 с различными активаторами, такими как активационный домен р65 транскрипционного фактора NF-κB и активационный домен белка теплового шока HSF1, которые привлекают факторы транскрипции вокруг промотора гена-мишени; и дефектная нуклеаза dCas9-VP64, которая слита с тетрамером VP16, являющимся активатором транскрипции. Такая система позволяет существенно увеличивать экспрессию целевых генов [57].

Клетки HeLa после трансдукции лентивирусными, кодирующими активационную систему CRISPR/Cas9-SAM продемонстрировали повышенный уровень экспрессии генов пептидогликан-распознающих белков (рис. 1), а также присутствие белков в культуральной среде (данные

не представлены). Мы показали, что в клетках, в которых активирована экспрессия генов пептидогликан-распознающих белков, на 79,5–85% снижается эффективность заражения клеток хламидиями по сравнению с контролем (рис. 3, б).

Применение антибиотиков приводит к образованию резистентных штаммов. Одним из направлений решения проблемы устойчивости бактерий к используемым препаратам может служить применение белков врожденного иммунитета, к которым затруднено развитие резистентности в связи со специфическими механизмами действия данных белков. Несмотря на то что применение рекомбинантных белков врожденного иммунитета, полученных в гетеро- и гомологичных системах экспрессии, выгодно за счет отсутствия токсических эффектов, использование их ограничено из-за трудности локального применения. В этой работе описывается подход, позволяющий решить этот недостаток терапевтического использования белков врожденного иммунитета путем активации экспрессии генов пептидогликан-распознающих белков в эукариотических клетках. Предложенный подход позволяет использовать ресурсы врожденного иммунитета для борьбы с инфекциями, в том числе и с теми, которые вызываются антибиотико-резистентными штаммами.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00270).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prestinaci, F., Pezzotti, P., and Pantosti, A. (2015) Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon, *Pathog. Glob. Health*, **109**, 309-318, doi: 10.1179/2047773215y.0000000030.
2. Grill, M. F., and Maganti, R. K. (2011) Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **72**, 381-393, doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.03991.x.
3. Roberts, M. C. (2002) Antibiotic toxicity, interactions and resistance development, *Periodontol.* **28**, 280-297, doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.280112.x.
4. Liu, C., Xu, Z., Gupta, D., and Dziarski, R. (2001) Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules, *J. Biol. Chem.*, **276**, 34686-34694, doi: 10.1074/jbc.M105566200.
5. Kashyap, D. R., Wang, M., Liu, L. H., Boons, G. J., Gupta, D., and Dziarski, R. (2011) Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating protein-sensing two-component systems, *Nat. Med.*, **17**, 676-683, doi: 10.1038/nm.2357.
6. Sharma, P., Dube, D., Singh, A., Mishra, B., Singh, N., et al. (2011) Structural basis of recognition of pathogen-associated molecular patterns and inhibition of proinflammatory cytokines by camel peptidoglycan recognition protein, *J. Biol. Chem.*, **286**, 16208-16217, doi: 10.1074/jbc.M111.228163.
7. Tydell, C. C., Yuan, J., Tran, P., and Selsted, M. E. (2006) Bovine peptidoglycan recognition protein-S: antimicrobial activity, localization, secretion, and binding properties., *J. Immunol.*, **176**, 1154-1162, doi: 10.4049/jimmunol.176.2.1154.
8. Hyyryläinen, H. L., Bolhuis, A., Darmon, E., Muukkonen, L., Koski, P., Vitikainen, M., Sarvas, M., Prágai, Z., Bron, S., van Dijk, J. M., and Kontinen, V. P. (2001) A novel two-component regulatory system in

- Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress, *Mol. Microbiol.*, **41**, 1159-1172, doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02576.x.
9. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G., and Collins, J. J. (2008) Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death, *Cell*, **135**, 679-690, doi: 10.1016/j.cell.2008.09.038.
 10. Darmon, E., Noone, D., Masson, A., Bron, S., Kuipers, O. P., Devine, K. M., and van Dijl, J. M. (2002) A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsrRS two-component system of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, **184**, 5661-5671, doi: 10.1128/jb.184.20.5661-5671.2002.
 11. Westers, H., Westers, L., Darmon, E., van Dijl, J. M., Quax, W. J., and Zanen, G. (2006) The CsrRS two-component regulatory system controls a general secretion stress response in *Bacillus subtilis*, *FEBS J.*, **273**, 3816-3827, doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05389.x.
 12. Dziarski, R., Kashyap, D. R., and Gupta, D. (2012) Mammalian peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating two-component systems and modulate microbiome and inflammation., *Microb. Drug Res.*, **18**, 280-285, doi: 10.1089/mdr.2012.0002.
 13. Dziarski, R., and Gupta, D. (2006) Mammalian PGRPs: novel antibacterial proteins, *Cell. Microbiol.*, **8**, 1059-1069, doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00726.x.
 14. O'Connell, C. M., and Ferone, M. E. (2016) *Chlamydia trachomatis* genital infections, *Microb. Cell*, **3**, 390-403, doi: 10.15698/mic2016.09.525.
 15. Kalayoglu, M. V. (2002) Ocular chlamydial infections: pathogenesis and emerging treatment strategies, *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, **2**, 85-91, doi: 10.2174/1568005024605918.
 16. Moulder, J. W. (1991) Interaction of chlamydiae and host cells *in vitro*, *Microb. Rev.*, **55**, 143-190.
 17. Panzetta, M. E., Valdivia, R. H., and Saka, H. A. (2018) *Chlamydia* persistence: a survival strategy to evade antimicrobial effects *in vitro* and *in vivo*, *Front. Microbiol.*, **9**, 3101, doi: 10.3389/fmicb.2018.03101.
 18. Bobrovsky, P., Manuvera, V., Polina, N., Podgorny, O., Prusakov, K., Govorun, V., and Lazarev, V. (2016) Recombinant human peptidoglycan recognition proteins reveal antichlamydial activity, *Infect. Immun.*, **84**, doi: 10.1128/IAI.01495-15.
 19. Zhu, M., Miao, B., Zhu, J., Wang, H., and Zhou, Z. (2017) Expression and antimicrobial character of cells transfected with human β -defensin-3 against periodontitis-associated microbiota *in vitro*, *Mol. Med. Rep.*, **16**, 2455-2460, doi: 10.3892/mmr.2017.6913.
 20. Zhang, J., Xie, L., Xu, D., Yue, S., Li, Y., Guo, X., and Lai, X. (2017) Targeting expression of antimicrobial peptide CAMA-Syn by adenovirus vector in macrophages inhibits the growth of intracellular bacteria, *Gene*, **630**, 59-67, doi: 10.1016/j.gene.2017.07.079.
 21. Ramos-Espinosa, O., Hernández-Bazán, S., Francisco-Cruz, A., Mata-Espinosa, D., Barrios-Payán, J., et al. (2016) Gene therapy based in antimicrobial peptides and proinflammatory cytokine prevents reactivation of experimental latent tuberculosis, *Pathog. Dis.*, **74**, doi: 10.1093/femspd/ftw075.
 22. Dolgachev, V., Panicker, S., Balijepalli, S., McCandless, L. K., Yin, Y., et al. (2018) Electroporation-mediated delivery of FER gene enhances innate immune response and improves survival in a murine model of pneumonia, *Gene Therapy*, **25**, 359-375, doi: 10.1038/s41434-018-0022-y.
 23. Scidmore, M. A. (2005) Cultivation and laboratory maintenance of *Chlamydia trachomatis*, *Curr. Protoc. Microbiol.*, **11**, 11A.11, doi: 10.1002/9780471729259.mc11a01s00.
 24. Joung, J., Konermann, S., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Platt, R. J., Brigham, M. D., Sanjana, N. E., and Zhang, F. (2017) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening, *Nat. Protoc.*, **12**, 828-863, doi: 10.1038/nprot.2017.016.
 25. Haessler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., et al. (2016) Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR, *Genome Biol.*, **17**, 148, doi: 10.1186/s13059-016-1012-2.
 26. Tiscornia, G., Singer, O., and Verma, I. M. (2006) Production and purification of lentiviral vectors, *Nat. Protoc.*, **1**, 241-245, doi: 10.1038/nprot.2006.37.
 27. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods*, **9**, 671-675, doi: 10.1038/nmeth.2089.
 28. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45, doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
 29. Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., and Lin, X. (2013) An improvement of the 2^{-ΔΔCT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis, *Biostat. Bioinform. Biomath.*, **3**, 71-85.
 30. Schitteck, B., Paulmann, M., Senyürek, I., and Steffen, H. (2008) The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases, *Infect. Dis. Drug Targets*, **8**, 135-143, doi: 10.2174/1871526510808030135.
 31. Schaubert, J., and Gallo, R. L. (2008) Antimicrobial peptides and the skin immune defense system, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **122**, 261-266, doi: 10.1016/j.jaci.2008.03.027.
 32. Huang, G. T., Zhang, H. B., Kim, D., Liu, L., and Ganz, T. (2002) A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human beta-defensin 2 antimicrobial activities *in vivo*, *Hum. gene Ther.*, **13**, 2017-2025, doi: 10.1089/10430340260395875.
 33. Joo, H. S., Fu, C. I., and Otto, M. (2016) Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **371**, 20150292, doi: 10.1098/rstb.2015.0292.
 34. Lu, X., Wang, M., Qi, J., Wang, H., Li, X., Gupta, D., and Dziarski, R. (2006) Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins, *J. Biol. Chem.*, **281**, 5895-5907, doi: 10.1074/jbc.M511631200.
 35. Dimroth, P., Kaim, G., and Matthey, U. (2000) Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases, *J. Exp. Biol.*, **203**, 51-59.
 36. Wang, Z. M., Li, X., Cocklin, R. R., Wang, M., Wang, M., Fukase, K., et al. (2003) Human peptidoglycan recognition protein-L is an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, *J. Biol. Chem.*, **278**, 49044-49052, doi: 10.1074/jbc.M307758200.
 37. Lim, J. H., Kim, M. S., Kim, H. E., Yano, T., Oshima, Y., et al. (2006) Structural basis for preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins, *J. Biol. Chem.*, **281**, 8286-8295, doi: 10.1074/jbc.M513030200.
 38. Kashyap, D. R., Kuzma, M., Kowalczyk, D. A., Gupta, D., and Dziarski, R. (2017) Bactericidal peptidoglycan recognition protein induces oxidative stress in *Escherichia coli* through a block in respiratory chain and increase in central carbon catabolism, *Mol. Microbiol.*, **105**, 755-776, doi: 10.1111/mmi.13733.
 39. Kashyap, D. R., Rompca, A., Gaballa, A., Helmann, J. D., Chan, J., Chang, C. J., Hozo, I., Gupta, D., and Dziarski, R. (2014) Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by inducing oxidative, thiol, and metal stress, *PLoS Pathogens*, **10**, e1004280, doi: 10.1371/journal.ppat.1004280.
 40. Chopra, I., Storey, C., Falla, T. J., and Pearce, J. H. (1998) Antibiotics, peptidoglycan synthesis and genomics: the chlamydial anomaly revisited, *Microbiol. (Reading)*, **144**, 2673-2678, doi: 10.1099/00221287-144-10-2673.
 41. Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., et al. (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*, *Science*, **282**, 754-759, doi: 10.1126/science.282.5389.754.
 42. Liechti, G. W., Kuru, E., Hall, E., Kalinda, A., Brun, Y. V., VanNieuwenhze, M., and Maurelli, A. T. (2014) A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan

- in *Chlamydia trachomatis*, *Nature*, **506**, 507-510, doi: 10.1038/nature12892.
43. Koo, I. C., and Stephens, R. S. (2003) A developmentally regulated two-component signal transduction system in *Chlamydia*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 17314-17319, doi: 10.1074/jbc.M212170200.
 44. Witkin, S. S., Minis, E., Athanasiou, A., Leizer, J., and Linhares, I. M. (2017) *Chlamydia trachomatis*: the persistent pathogen, *Clin. Vaccine Immunol.*, **24**, doi: 10.1128/cvi.00203-17.
 45. Bobrovsky, P. A., Larin, A. K., Polina, N. F., and Lazarev, V. N. (2019) Transcriptional analysis of HELA cells – producers of the recombinant peptidoglycan recognition protein PGLYRP1 at different stages of the *Chlamydia trachomatis* infection development, *Biomed. Chem. Res. Methods*, **2**, e00113, doi: 10.18097/BMCRM00113.
 46. De Wulf, P., Kwon, O., and Lin, E. C. (1999) The CpxRA signal transduction system of *Escherichia coli*: growth-related autoactivation and control of unanticipated target operons, *J. Bacteriol.*, **181**, 6772-6778.
 47. Deller, M. C., Kong, L., and Rupp, B. (2016) Protein stability: a crystallographer's perspective, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, **72**, 72-95, doi: 10.1107/s2053230x15024619.
 48. Muheem, A., Shakeel, F., Jahangir, M. A., Anwar, M., Mallick, N., Jain, G. K., Warsi, M. H., and Ahmad, F. J. (2016) A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives, *Saudi Pharm. J.*, **24**, 413-428, doi: 10.1016/j.jsps.2014.06.004.
 49. O'Neill, L. A., Bryant, C. E., and Doyle, S. L. (2009) Therapeutic targeting of toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer, *Pharmacol. Rev.*, **61**, 177-197, doi: 10.1124/pr.109.001073.
 50. Sierra-Delgado, J. A., Bautista-Nino, P. K., Vargas-Castellanos, C. I., Serrano Diaz, N. C., and Rincon, M. Y. (2019) Immune response and gene therapy with adeno-associated viral vectors, *Medicina*, **79**, 493-501.
 51. Bergmann, B., Fei, Y., Jirholt, P., Hu, Z., Bergquist, M., et al. (2020) Pre-treatment with IL2 gene therapy alleviates *Staphylococcus aureus* arthritis in mice, *BMC Infect. Dis.*, **20**, 185, doi: 10.1186/s12879-020-4880-8.
 52. Chandler, L. C., Yusuf, I. H., McClements, M. E., Barnard, A. R., MacLaren, R. E., and Xue, K. (2020) Immunomodulatory effects of hydroxychloroquine and chloroquine in viral infections and their potential application in retinal gene therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, doi: 10.3390/ijms21144972.
 53. Verma, R., Sahu, R., Singh, D. D., and Egbo, T. E. (2019) A CRISPR/Cas9 based polymeric nanoparticles to treat/inhibit microbial infections, *Seminars Cell Dev. Biol.*, **96**, 44-52, doi: 10.1016/j.semcd.2019.04.007.
 54. Lazarev, V. N., Polina, N. F., Shkarupeta, M. M., Kostjukova, E. S., Vassilevski, A. A., Kozlov, S. A., Grishin, E. V., and Govorun, V. M. (2011) Spider venom peptides for gene therapy of *Chlamydia* infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 5367-5369, doi: 10.1128/aac.00449-11.
 55. Abe, T., Kaname, Y., Wen, X., Tani, H., Moriishi, K., Uematsu, S., Takeuchi, O., Ishii, K. J., Kawai, T., Akira, S., and Matsuura, Y. (2009) Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner, *J. Virol.*, **83**, 7629-7640, doi: 10.1128/jvi.00679-09.
 56. Abe, T., Hemmi, H., Miyamoto, H., Moriishi, K., Tamura, S., Takaku, H., Akira, S., and Matsuura, Y. (2005) Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus, *J. Virol.*, **79**, 2847-2858, doi: 10.1128/jvi.79.5.2847-2858.2005.
 57. Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Joung, J., Abudayeh, O. O., et al. (2015) Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex, *Nature*, **517**, 583-588, doi: 10.1038/nature14136.

INHIBITION OF CHLAMYDIAL INFECTION BY CRISPR/Cas9-SAM MEDIATED ENHANCEMENT OF HUMAN PEPTIDOGLYCAN RECOGNITION PROTEINS GENE EXPRESSION IN HeLa CELLS

P. A. Bobrovsky^{1*}, V. D. Moroz¹, V. N. Lavrenova^{1,2}, V. A. Manuvera¹, and V. N. Lazarev¹

¹ Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia; E-mail: pbobrovskiy@gmail.com

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Received July 7, 2020

Revised August 22, 2020

Accepted August 23, 2020

The global problem of emerging resistance of microorganisms to antibiotics makes the search for new natural substances with antibacterial properties relevant. Such substances include peptidoglycan recognition proteins (PGLYRP), which are the components of the innate immunity of many organisms, including humans. These proteins have a unique mechanism of action that allows them to evade the resistance of bacteria to them, as well as to be active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, the use of antimicrobial recombinant proteins is not always advisable due to the complexity of local delivery of the proteins and their stability; in this regard it seems appropriate to activate the components of the innate immunity. The aim of this study was to increase the expression level of native peptidoglycan recognition protein genes in HeLa cells using genome-editing technology with synergistic activation mediators (CRISPR/Cas9-SAM) and evaluate antichlamydial effect of PGLYRP. We demonstrated activation of the chlamydial two-component gene system (*ctcB-ctcC*), which played a key role in the mechanism of action of the peptidoglycan recognition proteins. We generated the HeLa cell line transduced with lentiviruses encoding CRISPR/Cas9-SAM activation system with increased PGLYRP gene expression. It was shown that activation of the own peptidoglycan recognition proteins gene expression in the cell line caused inhibition of the chlamydial infection development. The proposed approach makes it possible to use the capabilities of innate immunity to combat infectious diseases caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Keywords: peptidoglycan, *Chlamydia trachomatis*, PGLYRP, CRISPR/Cas9