

ШТАММ БЦЖ С НОКАУТИРОВАННЫМ ГЕНОМ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ**М.С. Шумков, А.В. Гончаренко**

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Циклический 3',5'-АМР (сАМР) является одним из наиболее широко распространённых вторичных мессенджеров бактерий, архей и эукариот [1].

Аденилатциклазы микобактерий, осуществляющие синтез сАМР, представлены большим количеством различных генов. Для многих бактерий, но не для микобактерий, передача сигналов сАМР связана с классической системой катаболитной репрессии [2]. У микобактерии туберкулеза (*Mtb*) уровень сАМР регулирует иные метаболические пути, в том числе взаимодействие патогена с хозяином [3].

Ранее мы показали, что гиперэкспрессия гена аденилатциклазы (AC) *Rv2212* в *Mtb* усиливает вирулентность рекомбинантного штамма. Клетки, гиперэкспрессирующие AC, демонстрировали значительно более высокую скорость роста в легких и селезенке инфицированных мышей по сравнению с контрольным штаммом и, в отличие от контрольного штамма, приводили к гибели устойчивых к туберкулёзу мышей. Кроме того, гиперэкспрессия *Rv2212* препятствовала переходу *Mtb* в покоящееся состояние [4].

Штамм *Mycobacterium bovis* BCG (БЦЖ) давно и успешно используется как живой вакцинный препарат для профилактики туберкулеза и постоперационной иммунотерапии рака мочевого пузыря. Клетки вакцинного штамма длительно персистируют в организме и формируют эффективный иммунитет против всех форм туберкулеза у детей и нелёгочных форм туберкулеза у взрослых. Однако при ослаблении иммунитета БЦЖ, введённый с целью вакцинации или иммунотерапии, способен сам формировать очаг инфекции. Мы предположили, что удаление кодирующего аденилатциклазу гена *BCGR_2410*, аналога *Rv2212*, приведет к дополнительной аттенуации вакцинного штамма БЦЖ, что в дальнейшем, при подтверждении его меньшей вирулентности и сохранении протективных свойств, позволит использовать полученный штамм как более безопасную альтернативу вакцинного варианта.

Поскольку для получения рекомбинантного вакцинного штамма неприемлемо использование селективных маркеров, мы применили метод гомологичной рекомбинации с использованием системы *p2Nil-Goal* с целью получения немаркированных делеций [5]. В вектор *p2Nil* были клонированы плечи гомологии длиной около 1000 п.о., фланкирующие ген *BCGR_2410*, после чего проведены два раунда гомологичной рекомбинации. В результате получен клон штамма *Mycobacterium bovis* BCG Δ *BCGR_2410* с немаркированным нокаутом гена *BCGR_2410*. Дальнейшие исследования протективности и безопасности полученного рекомбинантного вакцинного штамма позволят оценить перспективы его использования для профилактики туберкулёза и в терапии злокачественных новообразований.

Литература

1. Botsford J., Harman J. // *Microbiol Rev* 1992. V. 56(1). P. 100–22.
2. De Carvalho L., Fischer S., Marrero J., Nathan C., Ehrh S., Rhee K. // *Chem Biol* 2010. V. 29; 17(10). P. 1122–31.
3. Bai G., Schaak D., McDonough K. // *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009. V. 55(1). P. 68–73.
4. Shleeve M., Kondratieva T., Demina G., Rubakova E., Goncharenko A., Apt A., Kaprelyants A. // *Front Cell Infect Microbiol* 2017. V. 7. P. 370.
5. Parish T., Stoker N.G. // *Microbiology (Reading)* 2000. V. 146 (8). P. 1969–1975.