

На правах рукописи

ПОЛИНА НАДЕЖДА ФЕДОРОВНА

**Биологическая активность антимикробных пептидов
из яда паука *Lachesana tarabaevi* на модели инфекции
*Chlamydia trachomatis***

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», в лаборатории генной инженерии.

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Лазарев Василий Николаевич

Официальные оппоненты: **Зигангирова Наиля Ахатовна**
доктор биологических наук, профессор,
ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России, заведующий отделом

Сергиев Петр Владимирович
доктор химических наук,
МГУ имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита состоится «10» декабря 2015 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИБМХ www.ibmc.msk.ru.

Автореферат разослан _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности.

В настоящее время во всем мире наблюдается значительный рост устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам. Возникновение резистентных штаммов является естественным биологическим ответом на использование этих препаратов, зачастую излишнее и неправильное. Это приводит к снижению эффективности лечения социально значимых инфекционных заболеваний. В этой связи актуальной задачей является поиск новых альтернативных подходов к лечению инфекционных заболеваний. В качестве нового поколения лекарственных средств против инфекционных заболеваний могут выступать антимикробные пептиды (АМП).

АМП являются основными компонентами системы врожденного иммунитета и представляют собой крайне разнообразную группу соединений. За последние годы изучено большое количество АМП, охарактеризованы их свойства и функции. На данный момент описано более 2000 АМП (aps.unmc.edu/AP/main.php), обнаруженных у самых разнообразных организмов. Так, АМП были выделены из растений, грибов, беспозвоночных и позвоночных животных, человека (Tossi *et al.*, 2000). Они обладают широким спектром действия и проявляют свою активность по отношению как к грам-отрицательным, так и к грам-положительным микроорганизмам. Также в литературе были описаны противовирусная и противогрибковая активности АМП.

По сравнению с антибиотиками АМП обладают рядом преимуществ, а именно:

- действием в микромолярных концентрациях,
- более широким спектром бактерицидной активности,
- низкой вероятностью возникновения резистентности к ним со стороны возбудителей инфекции.

Высокая антимикробная активность пептидов обусловлена механизмом их действия. При взаимодействии АМП с клеткой-мишенью происходит образование поры в мембране клетки, что, в конечном счете, приводит к нарушению ее целостности и последующему лизису клетки. Такая низкая специфичность действия делает возникновение резистентности к АМП маловероятным событием. Исходя из этого, АМП являются крайне перспективными агентами в борьбе с возбудителями инфекционных заболеваний.

Известно, что АМП могут оказывать цитотоксическое действие на клетки высших эукариот, что ограничивает использование АМП в ветеринарной и медицинской практике. Одним из подходов для решения данной проблемы является исследование антибактериального действия пептидов при экспрессии кодирующих их генов в

инфицированной клетке. Уменьшения цитотоксического эффекта, вероятно, можно достичь благодаря использованию системы регулирования экспрессии генов, кодирующих эти пептиды.

Среди всего многообразия АМП особое внимание привлекают пептиды из ядов членистоногих. В ходе длительной эволюции членистоногие выработали уникальные средства атаки и защиты, представляющие собой многокомпонентную смесь веществ, в состав которой входят цитолитические пептиды с антимикробной активностью. В нашей работе мы остановили свой выбор на новых уникальных классах пептидов из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaevi*, а именно на латарцинах и цито-инсектотоксине СІТ1а. Это линейные, катионные и амфифильные пептиды. В водном растворе они имеют неупорядоченную структуру, а в мембранном окружении склонны к образованию α -спиралей.

В качестве мишени для применения АМП из яда паука *Lachesana tarabaevi* нами были выбраны бактерии из рода *Chlamydia*. Хламидии остаются одними из самых распространенных бактериальных агентов, передающихся половым путем, в том числе и в России. Хламидии вызывают такие заболевания человека как воспаления органов малого таза, непроходимость маточных труб, патологии беременности и родов, снижение фертильности у мужчин. Кроме того, уникальные особенности взаимоотношений этих внутриклеточных паразитов с иммунной системой человека часто способствуют развитию персистенции хламидий в организме.

Цель и задачи работы

Целью настоящей работы являлось изучение действия антимикробных пептидов из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaevi* на развитие инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis*. Были поставлены следующие задачи:

1. Определить антимикробную активность химически синтезированных латарцинов Ltc1, Ltc2, Ltc3a, Ltc4b, Ltc5 и цито-инсектотоксина СІТ1а из яда паука *L. tarabaevi* в отношении *C. trachomatis*.
2. Исследовать эффективность ингибирования развития хламидийной инфекции при экспрессии генов, кодирующих латарцины и цито-инсектотоксин СІТ1а в клетках линии НЕК293.
3. Изучить влияние цито-инсектотоксина СІТ1а при экспрессии кодирующего его гена в клетках линии НЕК293 на развитие *C. trachomatis* на разных фазах жизненного цикла патогена.

Научная новизна.

В настоящей работе впервые исследована активность АМП из яда паука *Lachesana tarabaevi* в отношении инфекции *Chlamydia trachomatis*. Антихламидийная активность показана как для химически синтезированных АМП, так и при контролируемой экспрессии их генов непосредственно в инфицированной клетке. Для этого получены плазмидные векторы, экспрессирующие гены АМП из яда паука *L. tarabaevi*. Данные векторы позволяют точно регулировать экспрессию исследуемых генов АМП, что является необходимым условием для снижения токсического эффекта продуктов экспрессии.

Впервые при экспрессии гена, кодирующего цито-инсектотоксин СІТ1а из яда паука *L. tarabaevi*, показано изменение в транскрипции генов и трансляции белков, продукты которых вовлечены в функционирование актинового цитоскелета и аппарата Гольджи в клетках, экспрессирующих ген цито-инсектотоксина, что приводит к нарушению развития *C. trachomatis*. Также впервые изучено влияние экспрессии гена, кодирующего цито-инсектотоксина СІТ1а из яда паука *L. tarabaevi* на развитие *C. trachomatis* на различных стадиях жизненного цикла.

Теоретическая и практическая значимость.

Данная работа демонстрирует возможность использования латарцинов и цито-инсектотоксина в качестве новых антихламидийных агентов, а именно при экспрессии кодирующих их генов в инфицированной клетке. Разработанная система регулируемой экспрессии генов позволяет избежать токсического эффекта на клетки эукариот. Данные, полученные при анализе транскриптома и протеома клеток, экспрессирующих ген *cit1a*, позволяют более полно объяснить механизмы антихламидийного действия этого пептида.

Методология и методы исследования.

В диссертации использованы современные бактериологические методы (культивирование клеток *E. coli* штамм DH5 α и их трансформация, культивирование и определение титра *C. trachomatis*, определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК)), генно-инженерные методы (выделение аналитических и препаративных количеств плазмидной ДНК, методы рестрикционного анализа, отбор рекомбинантных клонов и другие методы молекулярного клонирования), методы работы с линиями клеток млекопитающих (культивирование, трансфекция, анализ жизнеспособности клеток), методы протеомного и транскриптомного анализов и биоинформатические методы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Продемонстрирована антимикробная активность химически синтезированных латарцинов Ltc1, Ltc2, Ltc3a, Ltc4b, Ltc5 и цито-инсектотоксина C1T1a из яда паука *Lachesana tarabaevi* в отношении *C. trachomatis*.

2. Показано, что экспрессия генов, кодирующих латарцины и цито-инсектотоксин C1T1a, в клетках линии НЕК293 вызывает подавление развития хламидийных включений. Эффективность подавления инфекции составляла 60-85 %.

3. Установлено, при индукции экспрессии гена, кодирующего цито-инсектотоксин C1T1a, наиболее эффективное подавление развития *C. trachomatis* в клетках линии НЕК293 происходит на ранних стадиях инфекции, т.е. стадии образования незрелого включения.

Степень достоверности и апробация результатов.

Для решения поставленных задач в работе использовались современные инструментальные методы. Обсуждение результатов проведено с учетом современных данных медицинской и биологической наук. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на расширенном межлабораторном заседании Отдела молекулярной биологии и генетики ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России (Москва, 16 июня 2015 г.), а также в ходе ряда конференций: "Клеточные взаимоотношения патоген-хозяин" (Амстердам, Нидерланды, 2010), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012» (Москва, Россия, 2012), 1-ый Международный симпозиум по Ядам «ЯДЫ 2012» (Оксфорд, Великобритания, 2012), Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине III международная научно-практическая конференция (Казань Россия, 2012).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 9 работ, из которых 4 статьи в рецензируемых научных журналах и 4 публикации в трудах конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 99 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц и 22 рисунка. Состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы, который включает 176 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Антибактериальная активность пептидов из яда паука *Lachesana tarabaevi* *in vitro*

В нашей работе мы использовали пептиды из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaevi* (таблица 1). В составе яда среднеазиатского паука *L. tarabaevi* обнаруживается широкое разнообразие компонентов. В яде *Lachesana tarabaevi* представлены уникальные по составу АМП, в число которых входит группа латарцинов. Латарцины (*Lachesana tarabaevi*) — это короткие (до 30 а.о.), линейные, катионные (pI>10), амфифильные пептиды. В водном растворе они имеют неупорядоченную структуру, а в мембранном окружении склонны к образованию α -спиралей. Их заряд при нейтральном pH колеблется от +5 до +9 (Kozlov *et al.*, 2006). Также среди пептидов из яда *Lachesana tarabaevi* следует отметить особый уникальный класс пептидов - цитоинсектотоксины. К ним относятся линейные катионные пептиды необычной длины – 69 а.о. (Vassilevski *et al.*, 2008), в последовательности которых не обнаружено остатков цистеина, в то время как лизин составляет около 30% аминокислотного состава. Суммарный заряд при pH 7 составляет +14. Этот необычный класс АМП появился, по всей видимости, благодаря мутации, приведшей к невозможности разделения двух коротких линейных пептидов из молекулы предшественника.

Таблица 1. Антимикробные пептиды из яда паука *L. tarabaevi*, использованные в работе.

Название пептида	Номер в Uniprot	Аминокислотная последовательность	Длина	Масса (Да)	Заряд
CIT1a	P85253	GFFGNTWKKIKGKADKIMLKKAVKIM VKKEGISKEEAQAKVDAMSKKQIRLYL LKYYGKKALQKASEKL	69	7905	14
Ltc3a	Q1ELU3	SWKSMAKKLKEYMEKLLKQRA	21	2482	5
Ltc4b	Q1ELU4	SLKDKVKSMGEKLLKQYIQTWKAKEF	25	2881	5
Ltc5	Q1ELU9	GFFGKMKEYFKKFGASFKRRFANLKK RL	29	3431	9
Ltc1	Q1ELT9	SMWSGMWRRKLLKLRNALKKLLKGE	25	2903	9
Ltc2	Q1ELU1	GLFGKLIKKFGRKAISYAVKKARGKH	26	3074	9

Химический синтез изучаемых пептидов был выполнен в лабораториях химии пептидов и рецепции нейропептидов в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. На первом этапе нами была определена МИК пептидов из яда паука *L. tarabaevi* для *E. coli* (штамм DH5 α). Антимикробная активность пептидов по отношению к *E. coli* различна. Наиболее активными оказались пептиды Ltc2 и Ltc5, для них МИК составляет 0,5 мкМ. Значение

МИК для цито-инсектотоксина СІТ1а - 1 мкМ. Наименьшей активностью среди выбранных пептидов обладал Ltc4b (МИК 4,5 мкМ).

Известно, что некоторые АМП, в частности, мелиттин, способны вызывать аллергические реакции у человека. В то же время не было найдено каких-либо совпадений при сравнении аминокислотной последовательности СІТ1а с последовательностями в базе данных аллергенов (<http://www.allergome.org>). Высокая антибактериальная активность совместно с низкой токсичностью цито-инсектотоксина СІТ1а для клеток эукариот делает его привлекательным агентом в борьбе с внутриклеточными инфекциями.

Далее мы протестировали активность выбранных пептидов в отношении *S. trachomatis*. Для этого после инкубации элементарных телец (ЭТ) хламидий с выбранными пептидами проводили заражение линии клеток HEK293 и затем оценивали антихламидийную активность по числу образовавшихся включений. Концентрации пептидов составляли 20, 100 и 200 мкМ, контроль — ЭТ в фосфатном буфере. Ингибирующий эффект пептидов на развитие *S. trachomatis* наблюдался при концентрации 100 мкМ для всех пептидов. При этом наибольшей антихламидийной активностью обладал цито-инсектотоксин СІТ1а (таблица 2), наименьшей – латарцин Ltc2. Важно отметить, что при увеличении концентрации пептида до 200 мкМ антихламидийная активность исследуемых АМП не усиливалась.

Таблица 2. Антимикробное действие пептидов из яда паука *L. tarabaevi* на *S. trachomatis*.

Пептид	Количество включений в поле зрения (увеличение x400)		
	200мкМ	100мкМ	20мкМ
СІТ1а	21.1±0.5*	18.5±1.4*	32.5±1.6
Ltc1	25.0±0.9*	24.2±1.1*	31.8±1.6
Ltc5	26.7±0.9*	27.5±0.5*	27.8±0.6
Ltc2	29.8±0.9	35.5±1.3	33.1±0.9
Ltc3a	30.4±1.2	30.8±1.1	30.2±0.9
Контроль	34.2±2,3		

* - достоверность отличий по сравнению с контролем, P<0,05

Полученные нами данные по противохламидийной активности исследуемых АМП сопоставимы с ранними результатами, полученными Yasin с соавторами в 1996 г (Yasin *et al.*, 1996). Высокие значения МИК АМП для хламидий, возможно, обусловлены особенностями строения мембраны микроорганизма. Метаболически неактивное, но инфекционное ЭТ хламидии окружено наружной мембраной, состоящей из множества сшитых дисульфидными связями белковых компонентов, главную часть которых составляют цистеин-богатые белки - MOMP, OmpA, OmcB, и OmcA (Abdelrahman and

Belland, 2005, Hatch *et al.*, 1984, Newhall and Jones, 1983, Newhall, 1987). Подобное строение мембраны определяет структурную жесткость элементарного тельца, что препятствует взаимодействию пептида с хламидиями, образуя дополнительный барьер для образования пор в мембране патогена.

С учетом особенностей строения и жизненного цикла *C. trachomatis*, мы предположили, что перспективным для терапии этой инфекции с помощью АМП может быть использование не химически синтезированных пептидов, а регулируемая экспрессия генов, кодирующих АМП из яда паука, непосредственно в инфицированных хламидиями клетках.

Получение плазмидных конструкций, экспрессирующих гены АМП из яда паука *Lachesana tarabaevi*

В своей работе мы использовали тетрациклин-зависимую систему регуляции экспрессии генов (Stieger *et al.*, 2009). В данной системе белок-трансактиватор связывается с последовательностью тетрациклин-зависимого элемента в присутствии индуктора - доксициклина, что приводит к активации транскрипции целевого гена. Белок-трансактиватор rtTA состоит из двух доменов: ДНК-связывающего домена (r)TetR – мутантного белка-репрессора и VP16AD – активаторного домена белка VP16 вируса простого герпеса. TRE находится между двумя идентичными минимальными промоторами цитомегаловируса человека PminCMV. На основе двух экспрессирующих векторов pBI-EGFP и pTet-On был получен вектор pBI-EGFP-rtTA (рисунок 1), несущий перечисленные регуляторные элементы, а также последовательность гена белка-трансактиватора rtTA. Под контролем минимальных промоторов цитомегаловируса человека находятся репортерный ген, кодирующий АМП из яда паука, и ген *gfp*. При добавлении в среду культивирования доксициклина происходит активация транскрипции исследуемого гена и гена *gfp*. В результате были получены плазмидные векторы для всех выбранных нами пептидов из яда паука *L. tarabaevi* (латарцинов Ltc1, Ltc2, Ltc3a, Ltc4b, Ltc5 и цито-инсектотоксина CIT1a). Полученные векторы получили название pBI-EGFP-rtTA-X, где X— ген, кодирующий соответствующий АМП.

Для исследования активности АМП при их экспрессии в клетках, инфицированных *C. trachomatis*, были получены конструкции с делетированным геном *gfp*. Необходимость этого была обусловлена тем, что идентификация хламидийных включений проводится при помощи метода прямой иммунофлуоресценции антителами, специфичными к липоолигосахаридам (ЛОС) хламидий, меченых FITC, спектр флуоресценции которого совпадает со спектром GFP. Были получены векторы pBI-rtTA-ΔGFP-X, где X

соответствует гену, кодирующему исследуемые нами пептиды из яда паука (латарцины Ltc1, Ltc2, Ltc3a, Ltc4b, Ltc5, цито-инсектотоксин CIT1a).

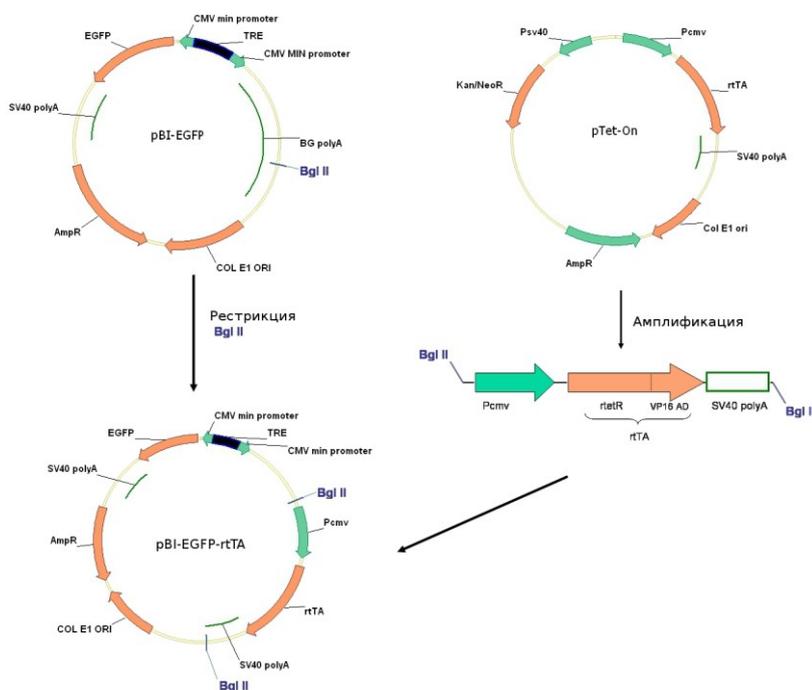


Рисунок 1. Схема получения плазмидного вектора pBI-EGFP-rtTA.

P_{CMV} – ранний промотор цитомегаловируса человека, CMV min promoter – минимальный ранний промотор цитомегаловируса человека, *egfp* – green fluorescent protein (ген зеленого флуоресцирующего белка), TRE – тетрациклин-зависимый элемент, AmpR - ген устойчивости к ампициллину, SV40 poly(A) – сигнал полиаденилирования из вируса SV40, (r)TetR – последовательность из тетрациклинового оперона транспозона Tn10 *E.coli*, VP16AD – активаторный домен белка VP16 вируса простого герпеса, *rtTA* – ген, кодирующий белок-трансактиватор rtTA, ColEI ori – точка начала репликации в *E.coli*

В результате были получены векторы для точной регуляции экспрессии генов, кодирующих выбранные латарцины Ltc1, Ltc2, Ltc3a, Ltc4b, Ltc5 и цито-инсектотоксин CIT1a (рисунок 2).

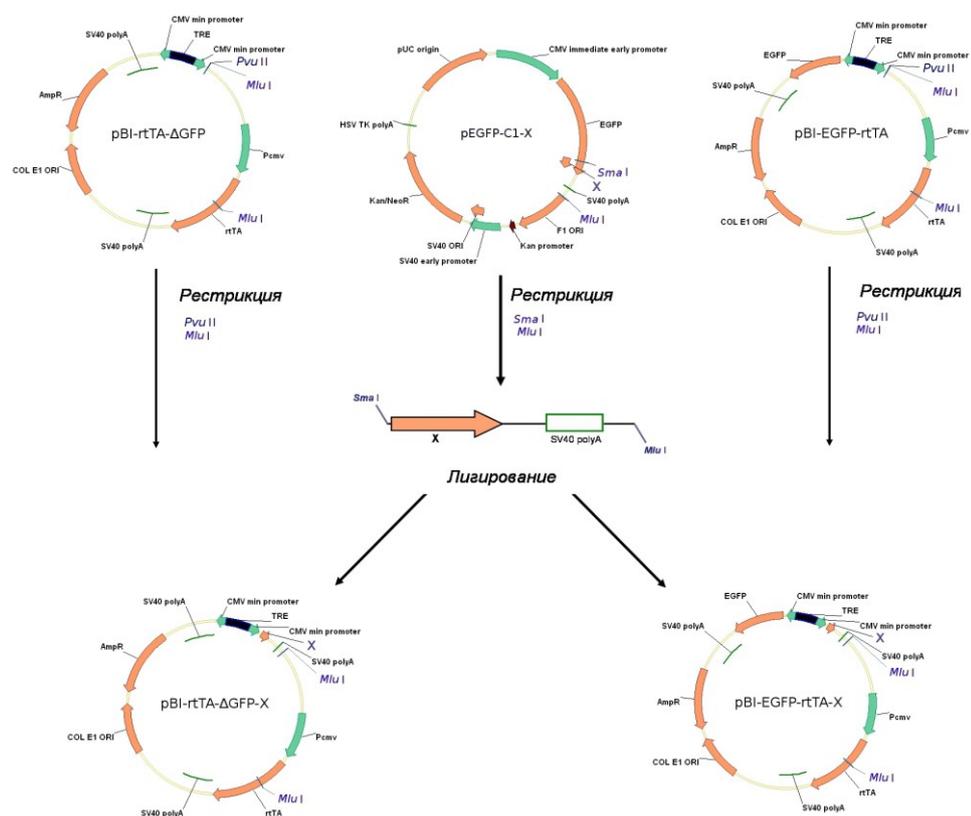


Рисунок 2. Схема получения плазмидных векторов pBI-EGFP-rtTA-X и pBI-rtTA-ΔGFP-X, где X - ген исследуемого АМП из яда паука. Вектор pBI-EGFP-rtTA-X содержит ген, кодирующий АМП из яда паука, и ген *gfp*, вектор pBI-rtTA-ΔGFP-X – только ген, кодирующий соответствующий АМП из яда паука. Обозначения регуляторных элементов см. рисунок 1.

Регуляция экспрессии генов, кодирующих латарцины и цито-инсектотоксин СІТ1а из яда паука *L. tarabaevi*, в клетках млекопитающих

Для проверки работоспособности полученных плазмидных векторов проводили трансфекцию клеток линии НЕК293 (ATCC® CRL-1573™). Линию клеток трансфицировали плазмидными векторами pBI-EGFP-rtTA-X, через 5 часов после этого в культуральную среду добавляли индуктор - доксициклин до концентраций 0,002-2 мкг/мл. Контролем служили нетрансфицированные клетки. Если полученная система регулируемой экспрессии генов функциональна, то при добавлении в среду доксициклина должна активироваться транскрипция генов *gfp* и АМП из яда паука. Таким образом, через 24 часа после трансфекции по флуоресценции GFP оценивали работу полученной системы регулируемой экспрессии генов (рисунок 3). Эффективность трансфекции составляла $85 \pm 5\%$, даже при концентрации индуктора 0,002 мкг/мл наблюдалась флуоресценция GFP. Для подтверждения экспрессии генов, кодирующих исследуемые АМП из яда паука, в клетках линии НЕК293 был проведен ОТ-ПЦР анализ суммарной РНК трансфицированных клеток с использованием специфичных праймеров для

последовательностей, кодирующих соответствующие гены АМП. На рисунке 3Б показана электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР клеток линии НЕК293 при экспрессии в них гена *cit1a*. В результате была продемонстрирована эффективная работа тетрациклин-зависимой системы регуляции экспрессии генов. Также показано, что в трансфицированных линиях клеток НЕК293 экспрессируются гены, кодирующие все исследуемые антимикробные пептиды.

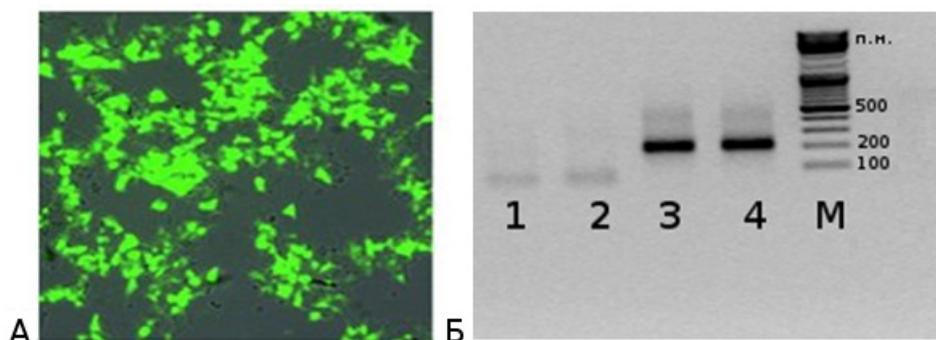


Рисунок 3. Экспрессия генов *gfp* и *cit1a* в клетках линии НЕК293. Концентрация индуктора - 0,02 мкг/мл.

А — Микрофотография линии клеток НЕК293, трансфицированной вектором рВІ-EGFP-rtTA-CIT1a;

Б — Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР клеток линии НЕК293 при экспрессии в них гена *cit1a*.

1 – отрицательный контроль ПЦР (матрица — кДНК нетрансфицированных клеток НЕК293); 2 – отрицательный контроль ПЦР (в реакцию не добавлялась обратная транскриптаза); 3 – ОТ-ПЦР анализ РНК, выделенной из трансфицированной вектором рВІ-EGFP-rtTA-CIT1a линии клеток НЕК293; 4 – положительный контроль ПЦР (матрица - плазмидная ДНК рВІ-EGFP-rtTA-CIT1a, содержащая ген *cit1a*; М – маркер молекулярной массы (DNA Ladder Mix; Thermo Scientific).

Известно, что АМП, в силу особенностей механизма действия, обладают токсическим эффектом и по отношению к эукариотическим клеткам (Kozlov *et al.*, 2006). Для оценки цитотоксичности, наблюдаемой при экспрессии генов, кодирующих АМП из яда паука, в линии клеток НЕК293, проводили анализ жизнеспособности с помощью теста LIVE/DEAD (Invitrogen, США) с использованием различных концентраций доксициклина: 0,02, 0,2 и 2 мкг/мл. Через 24 часа после трансфекции оценивали жизнеспособность клеток методом флуоресцентной микроскопии. Жизнеспособность клеток оценивалась как отношение клеток, окрашенных кальцеином FM (зеленая флуоресценция), ко всем окрашенным клеткам (зеленая и красная флуоресценция). Контролем служили нетрансфицированные клетки НЕК293. Такой контроль позволяет оценить токсическое влияние продуктов экспрессии генов, а также воздействие трансфицирующих агентов на клетки. Количество жизнеспособных клеток не отличалось от контроля, составляло >95%

(рисунок 4). Цитотоксический эффект не наблюдался даже при концентрации доксициклина 2 мкг/мл.

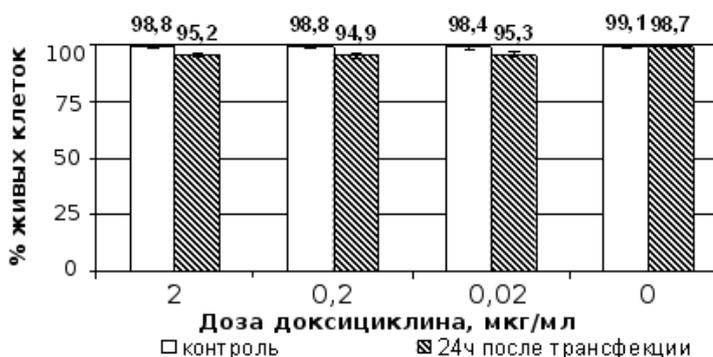


Рисунок 4. Оценка цитотоксического эффекта СІТ1а при его экспрессии в клетках линии НЕК293 через 24 часа после трансфекции вектором рВІ-EGFP-rtТА-СІТ1а. Концентраций доксициклина - 0,02, 0,2 и 2 мкг/мл, контроль - нетрансфицированные клетки НЕК293.

Поскольку МИК доксициклина для *S. trachomatis* D/UW-3/Cx составляет 0,08 мкг/мл, для дальнейших экспериментов по изучению влияния экспрессии генов, кодирующих АМП, на развитие хламидийной инфекции мы использовали концентрацию индуктора 0,02 мкг/мл.

Антихламидийная активность латарцинов и цито-инсектотоксина СІТ1а при экспрессии кодирующих их генов в клетках линии НЕК293

Клетки линии НЕК293 трансфицировали плазмидными векторами рВІ-rtТА-ΔGFP-X, где X – ген, кодирующий АМП из яда паука. Спустя 5 часов добавляли индуктор, а через 24 часа после трансфекции клетки заражали ЭТ *S. trachomatis*. Подавление развития хламидийной инфекции в линии клеток анализировали через 24 часа после заражения клеток при помощи прямой реакции иммунофлуоресцентного окрашивания с антителами специфичными к ЛОС хламидий. Контролем были клетки, трансфицированные тем же вектором, доксициклин в среду не добавляли.

Нами было установлено, что при экспрессии генов, кодирующих АМП из яда паука, в клетках линии НЕК293 наблюдается значительное подавление развития хламидийной инфекции, по сравнению с контролем (рисунок 5).

Ингибирующий эффект определялся как отношение количества включений, образовавшихся в клетках при экспрессии гена, кодирующего АМП, к количеству включений в контроле.

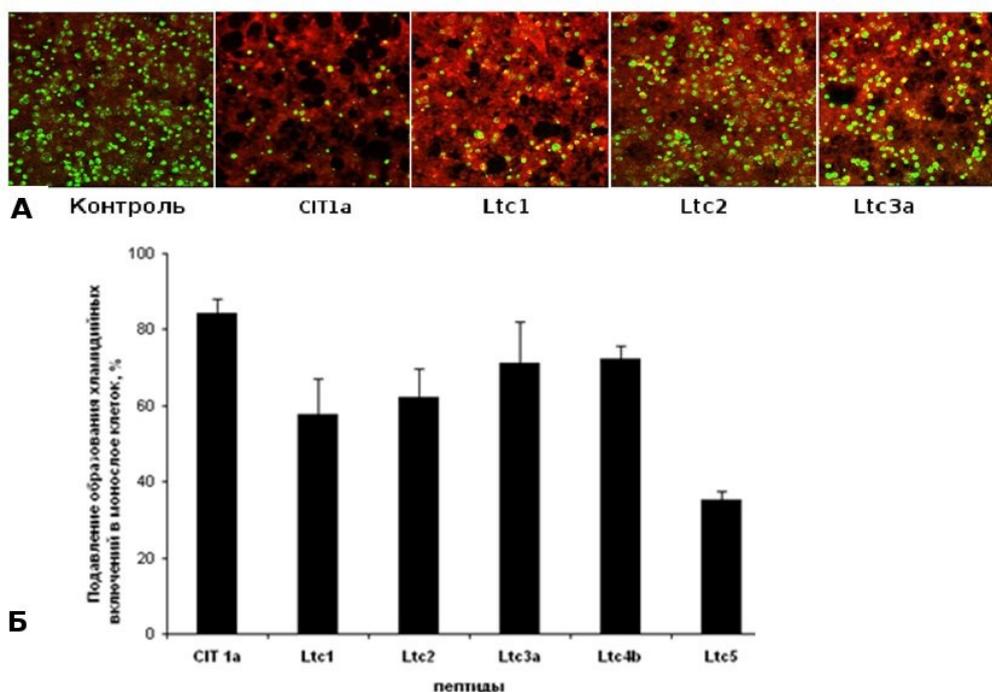


Рисунок 5. Экспрессия генов, кодирующих латарцины и цито-инсектотоксин CIT1a, в клетках линии HEK293 подавляет инфекцию *C. trachomatis*.

А. Микрофотографии иммунофлуоресцентного анализа клеток линии HEK293 при экспрессии в них генов, кодирующих АМП из яда паука, зараженных *C. trachomatis*. Включения *C. trachomatis* окрашены антителами, специфичными к ЛОС хламидий, мечеными FITC (зеленая флуоресценция), цитоплазма клеток - красным. Контроль – клетки, трансфицированные тем же вектором, доксициклин в среду не добавляли.

Б. Процент ингибирования образования хламидийных включений в клетках HEK293 при экспрессии генов, кодирующих латарцины и цито-инсектотоксин CIT1a относительно контроля.

Наибольший антихламидийный эффект наблюдался при экспрессии гена *cit1a*, ингибирование развития инфекции по сравнению с контролем превышало 85%. В случае с другими пептидами, за исключением латарцина Ltc5, эффективность подавления инфекции колебалась в диапазоне 60-70 %. Следует отметить, что при экспрессии гена, кодирующего цито-инсектотоксин CIT1a, ингибирующий эффект был выше, чем при экспрессии гена мелиттина (~60%) (Lazarev *et al.*, 2002). Таким образом, мы показали подавление развития хламидийной инфекции в линии клеток HEK293 при экспрессии исследуемых генов АМП и отсутствие токсического эффекта на клетки.

Принимая во внимание высокую антихламидийную активность пептидов из яда паука при экспрессии кодирующих их генов в клетке, но при этом достаточно высокое значение МИК в экспериментах *in vitro*, на следующем этапе мы решили более полно изучить возможные механизмы подавления развития *C. trachomatis*. Дальнейшие эксперименты мы проводили с использованием пептида с наиболее выраженными антибактериальными свойствами – цито-инсектотоксина CIT1a.

Транскриптомный и протеомный анализ клеток линии НЕК293 при экспрессии гена цито-инсектотоксина *cit1a*

Для выполнения транскрипционного профилирования линию клеток трансфицировали плазмидным вектором рВІ-EGFP-rtТА-СІТ1а, индуктор, доксициклин, добавляли до концентрации 0,02 мкг/мл. Контрольным образцом были клетки, трансфицированные вектором рВІ-EGFP-rtТА. Далее выделяли суммарную РНК из клеток с помощью TRIzol (Invitrogen, США), 200 нг суммарной РНК амплифицировали с помощью Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kit (Ambion, США). Гибридизацию контрольных и опытных образцов проводили на чипах WG-6 версии 2 (Illumina, США), согласно рекомендациям производителя. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения BeadStudio (Illumina, США). Анализ онтологии генов был выполнен при помощи программного обеспечения WebGestalt (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>). Анализ транскриптомного профиля клеток при экспрессии гена *cit1a* 1а показал наличие 44 дифференциально экспрессирующихся генов. При этом экспрессия 33 из них понижалась, 11 – повышалась по сравнению с контролем. Из полученного списка генов, уровень транскрипции которых изменяется, можно выделить следующие: *act1*, *actg1* (кодируют актин), *myh3* (миозин), *atp5I* (кодирует субъединицу E АТФ-синтазы), *cox7b* (субъединицу VIIb цитохром с-оксидазы), *hsd17b10* (гидроксистероид-дегидрогеназу), *hist1h2bd*, *hist1h4h*, *hist2h4a* (гистоны), поскольку продукты этих генов вовлечены в метаболические пути, обеспечивающие проникновение и образование включения при хламидийной инфекции.

Для проведения протеомного анализа линию клеток НЕК293 трансфицировали плазмидным вектором рВІ-EGFP-rtТА-СІТ1а. Индукцию экспрессии проводили добавлением доксициклина до концентрации 0,02 мкг/мл. Контроль - клетки, трансфицированные вектором рВІ-EGFP-rtТА, не содержащим последовательности гена *cit1a* пептида. Двумерный электрофорез с последующей идентификацией белков при помощи масс-спектрометрии показал наличие 49 дифференциально нарабатывающихся белков (рисунок 6).

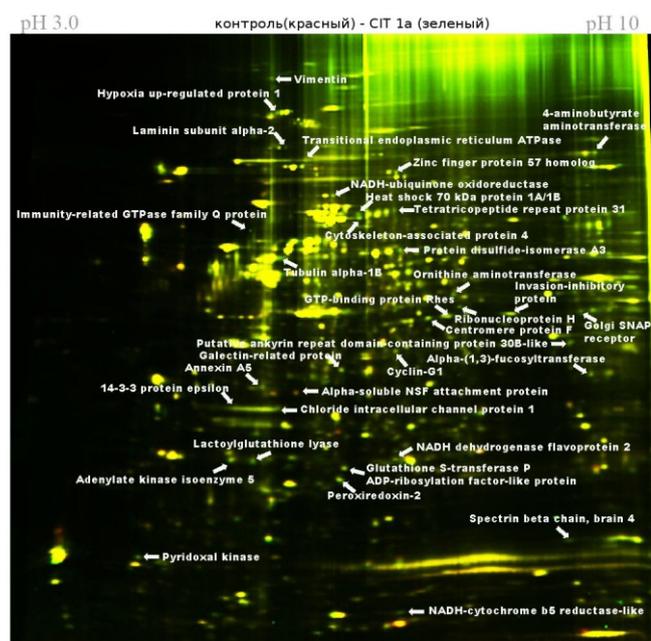


Рисунок 6. 2D-электрофореграмма дифференциально нарабатывающихся белков в линии клеток HEK293 при экспрессии гена *cit1a*.

Экстрагированные белки из контрольных клеток были окрашены флуоресцентным красителем Cy5 (красная флуоресценция). Белки, выделенные из трансфицированной рВ1-EGFP-rtTA-CIT1a линии клеток, окрашены флуоресцентным красителем Cy3 (зеленая флуоресценция).

Среди дифференциально нарабатывающихся белков линии клеток HEK293 при экспрессии в них гена *cit1a* следует выделить миозин, дисульфидизомеразу (PDI), кинезин-подобный белок KIF17, белок 14-3-3ε, белок 1 комплекса рецептора SNAP аппарата Гольджи (Golgi SNAP receptor complex member 1 GOSR1), а также АТФазу гладкого ЭПР (валозин-содержащего белка) VCP. Данные белки также вовлечены в метаболические пути, которые обеспечивают проникновение и образование включения при инфекции *C. trachomatis*.

Влияние экспрессии гена цито-инсектотоксина *cit1a* на ингибирование инфекции *C. trachomatis* на разных фазах жизненного цикла

Мы показали, что экспрессия генов, кодирующих латарцины и цито-инсектотоксин CIT1a, в линии клеток HEK293 ингибирует развитие инфекции *C. trachomatis*. Однако остается неясным, на какой именно стадии жизненного цикла хламидии происходит подавление ее роста.

C. trachomatis – это облигатный внутриклеточный микроорганизм с уникальным двухфазным жизненным циклом (Abdelrahman and Belland, 2005). Можно выделить несколько основных стадий развития хламидийной инфекции:

- прикрепление и проникновение в эукариотическую клетку элементарного тельца хламидии и образование незрелого включения, перемещение включения в перинуклеарное пространство, 0-2 ч;

- дифференциация инфекционных элементарных телец в метаболически активные ретикулярные тельца, их репликация, 2-30 ч;

- обратная (вторичная) дифференциация ретикулярных телец в элементарные, их выход из клетки, 48-72 ч.

В эксперименте по изучению влияния экспрессии гена *cit1a* в клетках линии НЕК293 на развитие хламидийной инфекции мы проводили трансфекцию клеток плазмидой, через 5 часов в культуральную среду добавляли индуктор. Далее через 24 часа проводили заражение клеток *C. trachomatis*. Таким образом, заражение хламидиями происходило на фоне перманентной экспрессии гена *cit1a*. Для изучения влияния экспрессии гена *cit1a* на раннюю стадию развития *C. trachomatis* также проводили трансфекцию клеток, затем через 5 часов заражали клетки ЭТ. Индуктор экспрессии гена *cit1a* добавляли через 1 час после инфицирования клеток хламидиями. Для данной схемы было использовано 2 контроля: 1) нетрансфицированная линия клеток, в которую спустя 1 час после заражения добавлялся доксициклин до конечной концентрации 0,002 мкг/мл; 2) линия клеток НЕК293, которую трансфицировали тем же вектором, что и в опытном образце, но без добавления доксициклина после заражения. Далее, через 48 часов после инфицирования проводили оценку ингибирования развития *C. trachomatis* с помощью прямой реакции иммунофлуоресцентного окрашивания. Через 72 часа после инфицирования определяли титр дочерних ЭТ *C. trachomatis*. Для этого клетки НЕК293 заражали материалом, полученным через 72 часа после первичного заражения линии клеток. Схема эксперимента представлена на рисунке 7.

Из полученных нами данных видно, что включения, образовавшиеся после индукции экспрессии гена, кодирующего цито-инсектотоксин СТ1а, через 1 час после заражения, имеют атипичную форму и размер (рисунок 8). Подсчет хламидийных включений показал, что при индукции экспрессии гена *cit1a* в линии клеток НЕК293 через 1 час после заражения клеток элементарными тельцами наблюдается подавление развития инфекции *C. trachomatis* в трансфицированных клетках. Как видно из графика, представленного на рисунке 9, концентрация доксициклина не влияет на развитие хламидийной инфекции.

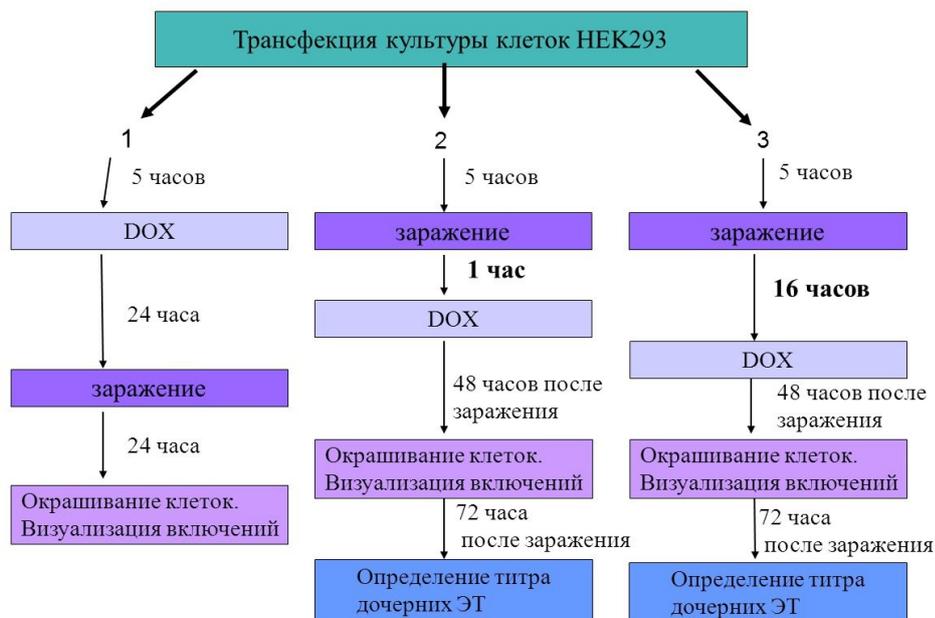


Рисунок 7. Схема экспериментов по изучению влияния экспрессии гена *cit1a* в линии клеток HEK293 на развитие хламидийной инфекции на разных фазах жизненного цикла *S. trachomatis*.

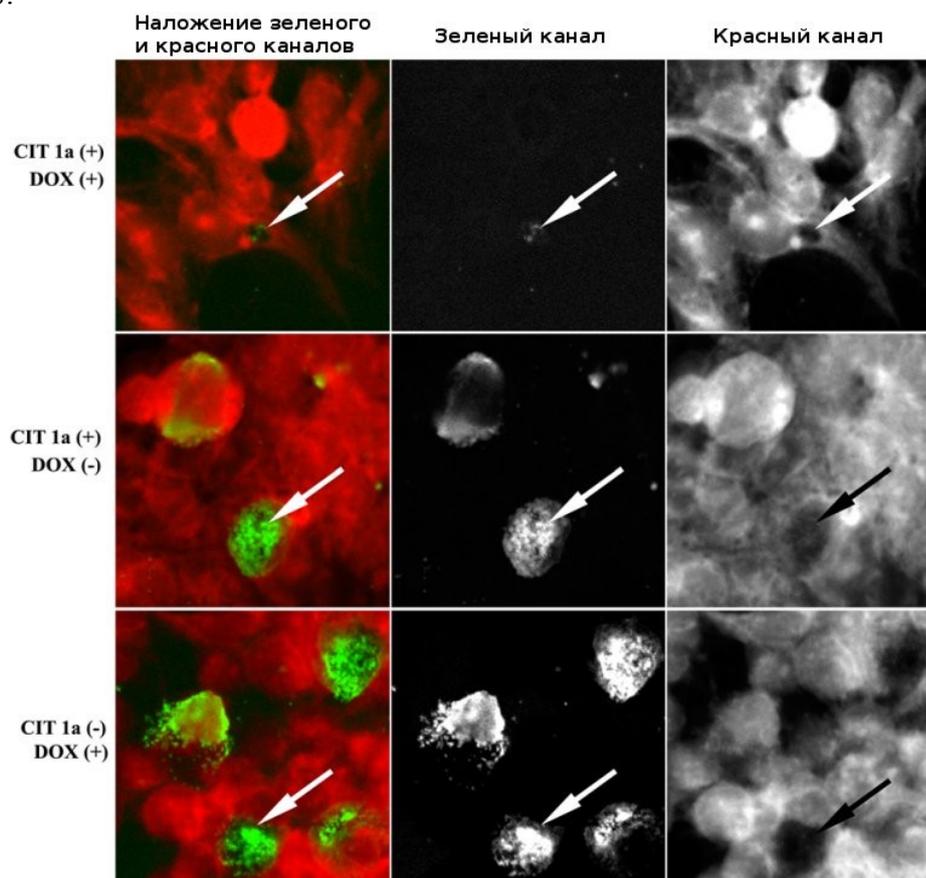


Рисунок 8. Микрофотография линии клеток HEK293 при индукции экспрессии в них гена *cit1a* через 1 час после заражения ЭТ *S. trachomatis*.

Заражение ЭТ клеток HEK293 проведено через 5 часов после трансфекции вектором рV1-rtTA-ΔGFP- CIT1a. Клетки HEK293 окрашены антителами, специфичными к ЛОС хламидий, мечеными FITC. Цитоплазма клеток окрашена красным цветом, включения — зеленым. Стрелками показаны aberrантные (CIT1a+/Dox+) и нормально развивающиеся хламидийные включения (увеличение x600).

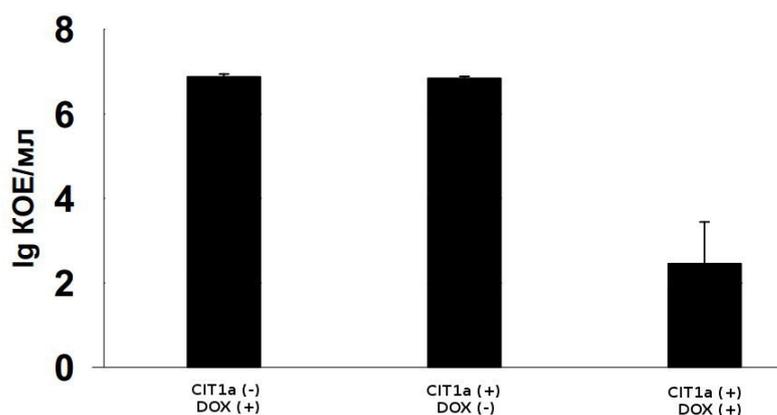


Рисунок 9. Влияние экспрессии гена *cit1a* в линии клеток НЕК293 на раннюю стадию развития хламидийной инфекции. Определение титра дочерних ЭТ.

CIT1a (-), Dox 0,002 мкг/мл — контроль — нетрансфицированные клетки НЕК293, через 1 час после заражения добавляли индуктор в концентрации 0,002 мкг/мл,

CIT1a, Dox (-) - клетки, трансфицированные вектором pBI-rtTA-ΔGFP-CIT1a, индуктор не добавлялся,

CIT1a, Dox 0,002 мкг/мл — клетки, трансфицированные вектором pBI-rtTA-ΔGFP-CIT1a, концентрация индуктора 0,002 мкг/мл.

Для изучения влияния экспрессии гена *cit1a* в линии клеток НЕК293 на среднюю стадию развития хламидийной инфекции индукция экспрессии генов осуществлялась через 16 часов после заражения. В остальном схема эксперимента не отличалась от схемы по изучению влияния экспрессии гена *cit1a* на раннюю стадию инфекции (рисунок 7, 3). Результаты определения титра дочерних ЭТ при индукции экспрессии гена *cit1a* через 16 часов после заражения представлены на рисунке 10.

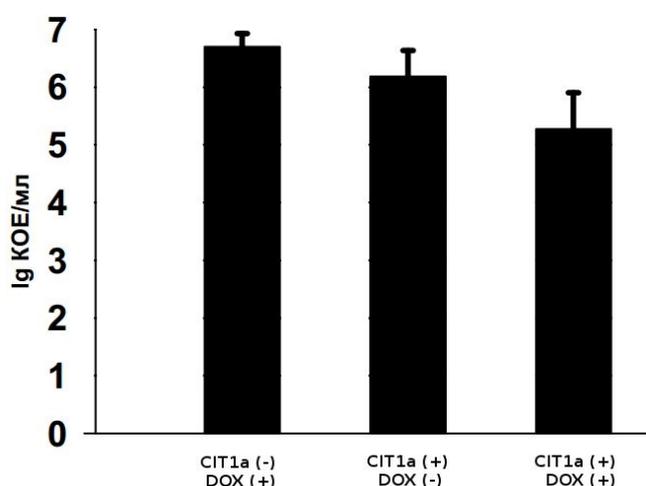


Рисунок 10. Влияние экспрессии гена *cit1a* в линии клеток НЕК293 на среднюю стадию развития хламидийной инфекции. Определение титра дочерних ЭТ.

CIT1a (-), Dox 0,002 мкг/мл — контроль — нетрансфицированные клетки, через 16 часов после заражения добавляли индуктор в концентрации 0,002 мкг/мл,

CIT1a, Dox (-) - клетки, трансфицированные вектором pBI-rtTA-ΔGFP-CIT1a индуктор не добавлялся,

CIT1a, Dox 0,002 мкг/мл - трансфицированные вектором pBI-rtTA-ΔGFP-CIT1a, концентрация индуктора 0,002 мкг/мл.

В этом случае мы наблюдали некоторое снижение титра дочерних ЭТ, но отличия являлись статистически недостоверными в сравнении с контролем. Исходя из полученных

результатов, можно сделать вывод, что индукция экспрессии гена *cit1a* во время средней фазы жизненного цикла *C. trachomatis* не приводит к ингибированию ее дальнейшего развития.

Таким образом, при анализе влияния экспрессии гена, кодирующего цитотоксин CIT1a из яда паука *L. tarabaevi*, в линии клеток HEK293 на разные фазы жизненного цикла *C. trachomatis* мы показали, что наиболее эффективное подавление развития патогена происходит на ранней стадии инфекции, т.е. стадии образования незрелого включения.

Остается до конца неясным, каким именно образом происходит ингибирование развития хламидийной инфекции в клетках HEK293 при экспрессии в них генов АМП. Как уже упоминалось выше, одним из ключевых этапов развития хламидий является прикрепление и проникновение в эукариотическую клетку. Известно, что дисульфидизомераза (PDI) участвует в прикреплении ЭТ *C. trachomatis* серовара E к поверхности клетки (Davis *et al.*, 2002). При этом в процессе прикрепления ЭТ к клетке *C. trachomatis* взаимодействует с белками, которые в свою очередь связаны с этим ферментом. Для проникновения хламидий в клетку необходима ферментативная активность PDI, в результате которой происходит восстановление дисульфидных связей (Abromaitis and Stephens, 2009). Нами было обнаружено изменение количества PDI при экспрессии гена *cit1a* в линии клеток HEK293, что может сказаться на инфекционной способности хламидий.

При проникновении ЭТ в клетку и образовании включения хламидии взаимодействуют с цитоскелетом клетки хозяина: актином, микротрубочками и промежуточными филаментами (Scidmore, 2011). Для проникновения в клетку хламидии используют Ras1-зависимый механизм реорганизации актина. Для своего перемещения хламидии активно используют микротрубочки. Движение происходит динеин-зависимым способом, белки мембраны включения хламидий взаимодействуют с динеином и некоторыми компонентами комплекса динактина (Grieshaber *et al.*, 2003). Далее зрелое включение стабилизируется в клетке за счет образования вокруг него «каркаса», состоящего из F-актина и промежуточных филаментов (Kumar and Valdivia, 2008). Более того, протеаза хламидий CPAF, секретлируемая в цитоплазму, взаимодействуя с виментином, изменяет структурные свойства промежуточных филаментов на поверхности включения. За счет этого «каркас» становится динамичным, т.е. способен расширяться вместе с увеличивающимся в размерах включением на поздних стадиях развития хламидий. Анализ транскриптомного профиля клеток при экспрессии гена цитотоксина *cit1a* показал изменение уровня транскрипции генов *acta1*, *actg1*, *myh3*,

кодирующих актин и миозин соответственно. Кроме того, протеомный анализ тех же клеток показал отличия в уровнях миозина, белка, ассоциированного с цитоскелетом, 4, а также кератина, тубулина, виментина, которые являются главными компонентами цитоскелета эукариотической клетки. Также следует отметить изменение уровня кинезин-подобного белка KIF17, который, как и динеин, является моторным белком, участвуя в транспорте различных компонентов вдоль микротрубочек.

Во время ранней фазы инфекции образующееся включение перемещается в перинуклеарную область клетки-хозяина и остается тесно связанным с аппаратом Гольджи, где оно начинает сливаться с везикулами, содержащими сфингомиелин, перехватывая их на пути транспорта от аппарата Гольджи к плазматической мембране (Carabeo *et al.*, 2003). Во время инфекции *C. trachomatis* в эукариотической клетке происходит фрагментация аппарата Гольджи с образованием миницистерн, окружающих бактериальное включение (Heuer *et al.*, 2009). Таким образом, изменения в функционировании аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума (ЭПР) могут существенным образом повлиять на эффективный рост хламидий внутри эукариотической клетки. При протеомном профилировании линии клеток, экспрессирующей ген *cit1a*, нами было показано изменение количества белка 1 комплекса рецептора SNAP аппарата Гольджи (Golgi SNAP receptor complex member 1 GOSR1), а также АТФазы гладкого ЭПР (валозин-содержащего белка) VCP.

C. trachomatis активно модифицируют мембрану включения с помощью собственных белков сразу после ее проникновения в клетку. Одним из примеров взаимодействия патогенного микроорганизма с эукариотической клеткой является взаимосвязь белков 14-3-3β клетки-хозяина и хламидийного белка IncG. Белки 14-3-3 принадлежат к семейству высококонсервативных фосфосерин-связывающих белков. При инфицировании клетки *C. trachomatis* большая часть белка 14-3-3 связывается с хламидийным включением, и, таким образом, нарушается взаимодействие данного белка с другими клеточными компонентами (Scidmore and Hackstadt, 2001). Помимо этого, адаптерный белок 14-3-3β может принимать участие в регуляции процесса активации апоптоза (BAD (Bcl2-ассоциированный агонист гибели клеток), взаимодействуя с 14-3-3β, оказывается связанным с хламидийным включением, что препятствует индукции апоптоза за счет выхода цитохрома C). Возможно, обнаруженное изменение количества белка 14-3-3ε при экспрессии гена *cit1a* в линии клеток может сказываться на развитии хламидийной инфекции.

Известно, что хламидии обладают уникальным антиапоптотическим механизмом. Было показано, что в клетках, инфицированных хламидиями, под воздействием

проапоптогенных факторов происходит ингибирование выхода митохондриального цитохрома С в цитоплазму, и, как следствие, не происходит дальнейшей активации каспазы (Fan *et al.*, 1998, Miyairi and Byrne, 2006). Таким образом, гены, кодирующие митохондриальные белки, могут опосредованно влиять на развитие хламидийной инфекции. Транскриптомный анализ клеток при экспрессии в них гена *cit1a* показал дифференциальную экспрессию некоторых митохондриальных генов: *atp5I* (кодирует субъединицу E АТФ-синтазы), *cox7b* (субъединицу VIIIb цитохром с-оксидазы), *hsd17b10* (гидроксистероид-дегидрогеназу).

Транскриптомный анализ клеток экспрессирующих ген *cit1a* показал различие в уровнях экспрессии генов *hist1h2bd*, *hist1h4h*, *hist2h4a*, кодирующих гистоны. Патогенный микроорганизм секретирует различные белки в эукариотическую клетку, тем или иным образом модулируя реализацию клеточных процессов. Так у *C. trachomatis* был идентифицирован ядерный эффекторный белок NUE, содержащий SET домен, вовлеченный в процесс укладки хроматина. В ядре NUE проявляет активность гистон-метилтрансферазы, модифицируя клеточные гистоны. Субстратами для данной метилтрансферазы являются гистоны H2B, H3 и H4 (Pennini *et al.*, 2010). Способность хламидий к модификации гистонов может привести к подавлению системы защитных механизмов клетки.

Возможная модель ингибирования развития *C. trachomatis* в клетках, экспрессирующих ген *cit1a* представлена на рисунке 11.

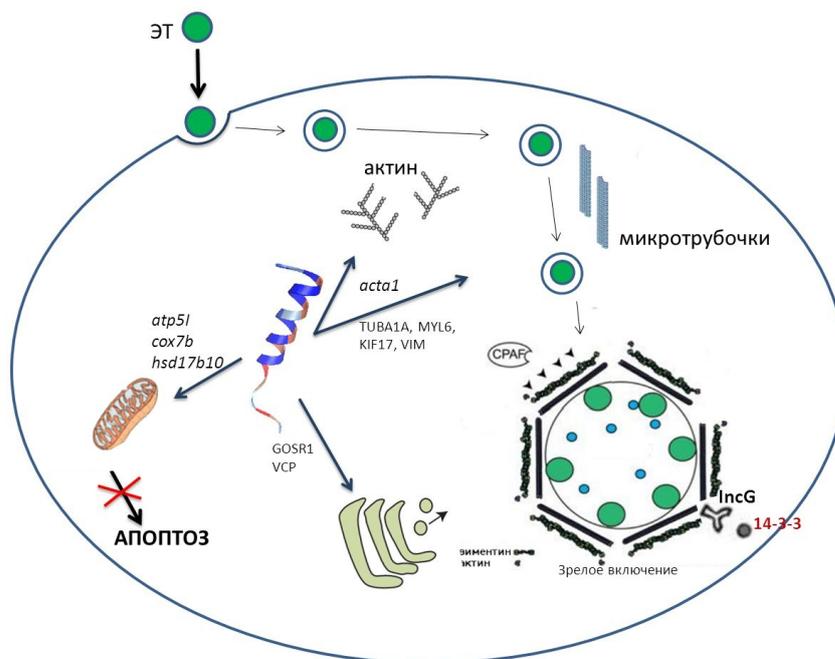


Рисунок 11. Возможная модель действия АМП при экспрессии кодирующих их генов в клетках линий эукариот на развитие хламидийной инфекции.

Заключение

Использование антибиотиков приводит к возникновению резистентных штаммов микроорганизмов. Одним из перспективных решений проблемы устойчивости патогенов может стать использование антимикробных пептидов.

Антимикробные пептиды - природные средства защиты организма, обнаруженные у растений, беспозвоночных, позвоночных животных, включая человека. Данные пептиды относятся к системе врожденного иммунитета. Свою активность АМП проявляют в отношении бактерий, грибов, вирусов. Такой широкий спектр антимикробной активности обусловлен механизмом действия АМП: связываясь с мембраной клетки, АМП образуют канал, или пору, что приводит к выходу содержимого клетки наружу и последующей ее гибели.

В сравнении с антибиотиками применение АМП имеет ряд преимуществ: более широкий спектр антибактериального действия; формирование резистентности практически невозможно из-за особенностей механизма действия АМП; действие при более низких концентрациях. АМП активно изучались последние десятилетия, что привело к разработке многочисленных аналогов пептидов с измененными биологическими свойствами. Но применение химически синтезированных АМП ограничено из-за токсичности продукта по отношению к эукариотическим организмам, а также дороговизны их производства. В настоящей работе описывается подход, позволяющий решить этот недостаток терапевтического использования АМП. Проблема токсичности устранена путем регуляции экспрессии кодирующих АМП генов в эукариотической клетке. Мы использовали тетрациклин-зависимую систему регуляции экспрессии генов. Нами была сконструирована серия плазмидных векторов, где экспрессия генов находится под контролем двух идентичных минимальных промоторов цитомегаловируса человека, между которыми расположен тетрациклин-зависимый элемент (TRE).

В качестве объекта исследования нами были выбраны АМП из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaevi*. Это уникальные по своему составу и свойствам АМП. Среди пептидов из яда *L. tarabaevi* особенно выделяется цито-инсектотоксин СІТ1а, его размер 69 а.о., заряд составляет +14. Были сконструированы плазмидные векторы, экспрессирующие гены латарцинов и цито-инсектотоксина СІТ1а из яда *Lachesana tarabaevi* под контролем тетрациклин-зависимого промотора цитомегаловируса человека. Мы показали, что использование полученных конструкций при трансфекции линии клеток НЕК293 не вызывает токсического эффекта.

Нами было показано, что при экспрессии генов АМП из яда паука наблюдалось подавление *C. trachomatis*. Наибольшая антихламидийная активность выявлена при экспрессии гена цито-инсектотоксина СІТ1а.

До настоящего времени было не до конца известно, как именно происходит ингибирование развития хламидийной инфекции в клетке при экспрессии в ней генов АМП. Для выяснения этого вопроса был выполнен транскриптомный и протеомный анализы линии клеток, экспрессирующей ген цито-инсектотоксина СІТ1а. Нам удалось выявить изменение уровней транскрипции и трансляции ряда генов и белков, продукты которых вовлечены в функционирование актинового цитоскелета и аппарата Гольджи. Это может существенным образом сказываться на внутриклеточном перемещении хламидий, а также потреблении ими сфингомиелина, что, возможно, приводит к снижению способности хламидий проникать в клетку, остановке ее развития внутри эукариотической клетки и развитию абберантных включений.

Ранее не было известно, на какой именно стадии развития патогена реализуется антихламидийное действие пептидов. Нами было исследовано влияние экспрессии гена цито-инсектотоксина СІТ1а на развитие *C. trachomatis* на стадии заражения, раннюю и среднюю фазу инфекции. В результате нами было показано, что при экспрессии генов АМП на ранней стадии инфекционного процесса происходит наиболее эффективное подавление *C. trachomatis*.

Таким образом, в настоящей работе мы впервые продемонстрировали антихламидийную активность пептидов из яда паука *Lachesana tarabaevi*, изучив возможные механизмы подавления развития инфекции *C. trachomatis* при экспрессии генов АМП в линии клеток НЕК293, а также показали, что наиболее эффективное подавление развития хламидий происходит на ранней стадии жизненного цикла патогена.

ВЫВОДЫ

1. Химически синтезированные пептиды из яда паука *Lachesana tarabaevi* латарцины Ltc1, Ltc5 и цито-инсектотоксин СІТ1а обладают антимикробной активностью в отношении элементарных телец *C. trachomatis*, тогда как латарцины Ltc2, Ltc3a - нет.
2. Экспрессия генов, кодирующих латарцины и цито-инсектотоксин СІТ1а, в клетках линии НЕК293 вызывает подавление развития хламидийных включений с эффективностью подавления инфекции 60-85 %.
3. При индукции экспрессии гена, кодирующего цито-инсектотоксин СІТ1а, наиболее эффективное подавление развития *C. trachomatis* в клетках линии НЕК293 происходит на стадии образования незрелого включения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Полина Н.Ф., Лазарев В.Н. Генетическая терапия инфекционных заболеваний. Генотерапевтические агенты и невирусные системы доставки генетического материала. // Обзор. Эфферентная и физико-химическая медицина, 2011. №1. стр. 11-20.
2. Lazarev VN, Polina NF, Shkarupeta MM, Kostrjukova ES, Vassilevski AA, Kozlov SA, Grishin EV, Govorun VM. Spider venom peptides for gene therapy of Chlamydia infection. // Antimicrob Agents Chemother. 2011 Nov; 55(11):5367-9.
3. Polina NF, Shkarupeta MM, Popenko AS, Vassilevski AA, Kozlov SA, Grishin EV, Lazarev VN, Govorun VM. Cyto-Insectotoxin 1a from Lachesana tarabaei Spider Venom Inhibits Chlamydia trachomatis Infection. // Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2012, Volume 4, Issue 3, pp 208-216.
4. Lazarev VN, Shkarupeta MM, Polina NF, Kostrjukova ES, Vassilevski AA, Kozlov SA, Grishin EV, Govorun VM. Antimicrobial peptide from spider venom inhibits Chlamydia trachomatis infection at an early stage. // Arch Microbiol. 2013 Mar;195(3):173-9.
5. Podgorny OV, Polina NF, Babenko VV, Karpova IY, Kostryukova ES, Govorun VM, Lazarev VN. Isolation of single Chlamydia-infected cells using laser microdissection. // J Microbiol Methods. 2015 Feb; 109:123-8.
6. Lazarev VN, Polina NF, Shkarupeta MM, Zolotova TA, Vassilevski AA, Kozlov SA, Grishin EV, Govorun VM. Arthropod venom peptides for gene therapy of intracellular bacterial infections. // 1st Oxford World Symposium on Venoms «VENOMS2012», 2012, 18-20 September, St Hilda College Oxford, UK, p.29-30.
7. V.N. Lazarev, M.M. Shkarupeta, N.F. Polina, E.S. Kostrjukova, S.A. Levitskii, S.A. Kozlov, A.A. Vassilevski, E.V. Grishin, V.M. Govorun. Chlamydia trachomatis growth inhibition in a HEK293 cell line induced by expression of antimicrobial peptides genes from the venom of the spider Lachesana tarabaei. // A Current Opinion in Cell Biology Conference. "Cellular Host-Pathogen Interactions", 2010, September 5-8, Amsterdam, The Netherlands, p.10.
8. Полина Н.Ф., Кострюкова Е.С., Василевский А.А. Влияние экспрессии гена цитоинсектотоксина СИТ1а в культуре клеток НЕК293 на развитие С. Trachomatis. // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012», 9 — 13 апреля 2012 года, стр.191.
9. Полина Н.Ф., Кострюкова Е.С., Шкарупета М.М., Василевский А.А., Козлов С.А., Лазарев В.Н. ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ПРОФИЛЯ ЛИНИИ КЛЕТОК НЕК293 ПРИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ЦИТОИНСЕКТОТОКСИНА СИТ1а // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине III международная научно-практическая конференция г. Казань 2012, 22-24 ноября, стр.129.

Список сокращений

АМП – антимикробные пептиды

а.о. – аминокислотный остаток

ЛОС - липоолигосахариды

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

ОТ-ПЦР – обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЭТ - элементарное тельце

Дох – доксициклин

FITC - изотиоцианат флуоресцеина