

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АВИЦИНА А ИЗ *Enterococcus avium*

С. В. Баландин^{1,*}, Е. И. Финкина¹, Э. К.-А. Нурмухамедова¹,
А. А. Тагаев¹, Е. С. Умнякова², В. Н. Кокряков²,
академик РАН В. И. Швец³, Т. В. Овчинникова¹

Поступило 24.09.2018 г.

Авицин А — бактериоцин из грамположительной бактерии *Enterococcus avium*, обладающий высокой микробицидной активностью в отношении бактерий рода *Listeria*, которые вызывают у человека тяжёлое инфекционное заболевание — листериоз. Мы разработали биотехнологический способ получения авицина А и дали характеристику его структуры и биологической активности. Нами выдвинуто предположение о возможном механизме антимикробного действия авицина А.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, бактериоцины, педиоцин-подобные пептиды, листериоз.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524844491-494>

Поиск новых антибиотиков на протяжении многих лет остаётся одним из важнейших направлений прикладных исследований в биологии и медицине. Наряду с проблемой распространения антибиотикорезистентности требует решения проблема угнетения нормальной микрофлоры используемыми в клинике антимикробными средствами. В качестве прототипов для создания препаратов селективного действия в настоящее время рассматриваются бактериоцины — представители обширной группы соединений полипептидной природы, синтезируемых рибосомальным путём, секретируемых бактериями и проявляющих свою активность в низких концентрациях, преимущественно в отношении родственных продуцентов видов [1].

Авицин А был выделен ранее из супернатанта культуральной жидкости грамположительной бактерии *Enterococcus avium* [2]. Этот пептид является представителем класса Па бактериоцинов, характерной особенностью которых является отсутствие в структуре посттрансляционных

модификаций, за исключением одной или двух дисульфидных связей, а также наличие так называемого “педиоцинового бокса” — аминокислотной последовательности YGNG(V/L) в N-концевой части молекулы [3]. Авицин А состоит из 43 аминокислотных остатков, включая два остатка цистеина (TYYGNGVSCNKKGCSDWGKAISII GNNSAANLATGGAAGWKS), имеет молекулярную массу 4290,7 Да, является слабocationным ($pI_{расч} \sim 9,2$) и обладает выраженной антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий, в том числе патогенной для человека *Listeria monocytogenes*.

Целью настоящего исследования была разработка биотехнологического способа получения рекомбинантного авицина А, характеристика его структуры и биологической активности.

Рекомбинантный авицин А получали путём экспрессии в *E. coli* под контролем промотора бактериофага T7 по методике, сходной с описанной ранее [4]. Экспрессирующая плазмида pET-His8-TrxL-AvcA была создана путём лигирования фрагмента длиной 5253 п.н., полученного расщеплением плазмиды pET-31b(+) (“Novagen, Merck KGaA”, Германия) рестриктазами BglII и XhoI, с ПЦР-амплифицированной вставкой, содержащей промотор бактериофага T7, lac-оператор, сайт связывания рибосомы и участок, кодирующий гибридный белок. Последний содержал N-концевую октагистидиновую последовательность, белок-носитель тиоредоксин А

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук, Москва

² Институт экспериментальной медицины Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

³ Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова МИРЭА — Российского технологического университета, Москва

* E-mail: arenicin@mail.ru

с мутацией M37L, остаток метионина и последовательность зрелого авицина А (GenBank: ACZ36002.1). Клетки *E. coli* BL21 Star (DE3), трансформированные плазмидой pET-His8-TrxL-AvcA, выращивали при температуре 30°C на среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина и 20 мМ глюкозы, до ОП₆₀₀ ~0,7. Индукцию синтеза авицина А проводили изопропилтио-β-D-галактозидом в конечной концентрации 0,2 мМ, после чего клетки инкубировали при перемешивании в течение 4–5 ч при той же температуре.

Известно, что удовлетворительные выходы пептидов при экспрессии в *E. coli* достигаются в большинстве случаев лишь при включении их аминокислотной последовательности в состав гибридных конструкций, содержащих белок-носитель, нейтрализующий токсичность пептида и (или) защищающий его от действия протеиназ продуцента. Анализ фракций клеточного лизата с помощью SDS-электрофореза показал, что, несмотря на высокую растворимость природного тиоредоксина, большая часть (около 90%) полученного гибридного белка накапливалась в составе нерастворимой фракции клеточного белка. Отсутствие остатков метионина в аминокислотной последовательности авицина А позволило использовать реакцию расщепления бромцианом в кислой среде для получения целевого пептида. Примесь белка-носителя и остатки нерасщепленного гибридного белка после реакции удаляли с помощью повторной металлохелатной хроматографии. Финальную очистку рекомбинантного пептида осуществляли методом обращённо-фазовой ВЭЖХ. Гомогенность полученных препаратов

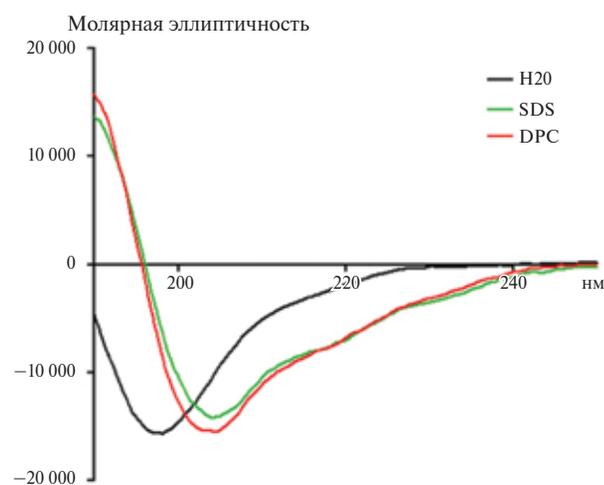


Рис. 1. КД-спектры авицина А (0,3 мМ) в водном растворе и мицеллярных детергентах (30 мМ). Измерение проводили при комнатной температуре с помощью спектрополяриметра J-810 (“JASCO Corp.”, Япония) в кювете с длиной оптического пути 0,01 см.

Таблица 1. Чувствительность тест-микроорганизмов к рекомбинантному авицину А

Тест-микроорганизмы	Чувствительность
Грамположительные бактерии	
<i>Bacillus cereus</i> 10702	–
<i>Bacillus megaterium</i> VKM B-392	+
<i>Bacillus subtilis</i> VKM B-886	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	++
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	+++
<i>Micrococcus luteus</i> A270	–
<i>Micrococcus luteus</i> VKM Ac-2229	+
<i>Mycobacterium phlei</i> VKM Ac-1291	+
<i>Rhodococcus sp.</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i> SG 511	–
<i>Staphylococcus aureus</i> 710A	–
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	–
<i>Staphylococcus aureus</i> 209p	+
Грамотрицательные бактерии	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25932	++
<i>Escherichia coli</i> C600	+
<i>Escherichia coli</i> M15	–
<i>Escherichia coli</i> ML-35p	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	–

Примечание. “–” — пептид не активен в концентрации ≥ 233 мкМ; “+” — пептид активен в концентрации ≥ 23,3 мкМ; “++” — в концентрации ≥ 14,6 мкМ; “+++” — в концентрации < 1,46 мкМ.

и идентичность рекомбинантного авицина А природному пептиду были подтверждены методами времяпролётной масс-спектрометрии МАЛДИ и автоматического N-концевого микросеквенирования по Эдману. Выход целевого пептида составил не менее 5 мг/л культуры.

Аминокислотная последовательность природного авицина А содержит два остатка цистеина, которые у педиоцин-подобных бактериоцинов образуют внутримолекулярную дисульфидную связь, стабилизирующую β-складчатую структуру в N-концевой части молекулы [5–7]. О наличии дисульфидной связи в рекомбинантном авицине А говорит отсутствие изменения молекулярной массы пептида, обработанного алкилирующим реагентом йодацетамидом. Согласно данным КД-спектроскопии, в водном растворе авицин А преимущественно не структурирован, однако помещение его в мицеллярные растворы детергентов — додецилсульфат натрия (SDS) и додецилфосфохолин (DPC) — приводит к значительному изменению КД-спектра, свидетельствующему о появлении в структуре пептида α-спиральных участков (рис. 1).

Антимикробная активность рекомбинантного авицина А в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий была исследована методом радиальной диффузии в агарозном геле (табл. 1). Наиболее высокую активность рекомбинантный авицин А проявил в отношении грамположительных бактерий *Listeria monocytogenes* и *Enterococcus faecalis* — типичных мишеней для бактериоцинов данного класса. Вместе с тем неожиданно высокой оказалась активность пептида в отношении грамотрицательной *E. coli* ATCC 25932. Определённая методом серийных разведений в жидкой питательной среде минимальная ингибирующая концентрация (МИК) авицина А в отношении штамма *L. monocytogenes* EGD, наиболее чувствительного к действию пептида, составила 3,3 нМ. Можно предположить, что по аналогии с исследованными ранее представителями бактериоцинов класса IIa авицин А в микромолярных концентрациях встраивается в липидный бислой мембран клеток-мишеней за счёт неспецифических электростатических и гидрофобных взаимодействий, при этом он приобретает упорядоченную конформацию и формирует поры, вызывая тем самым диссипацию электрохимических потенциалов и гибель клеток [8]. В наномолярных концентрациях пептид действует на ограниченный круг микроорганизмов, экспрессирующих специфическую молекулярную мишень. В роли последней может выступать мембранный транспортный комплекс маннозо-фосфотрансфераза (Man-PTS), как было показано ранее для ряда родственных пептидов [9].

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда 19–14–00326.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. Bacteriocins — a Viable Alternative to Antibiotics? // Nat. Rev. Microbiol. 2013. V. 11. № 2. P. 95–105.
2. Birri D.J., Brede D.A., Forberg T., Holo H., Nes I.F. Molecular and Genetic Characterization of a Novel Bacteriocin Locus in *Enterococcus avium* Isolates from Infants // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 2. P. 483–492.
3. Ríos Colombo N.S., Chalón M.C., Navarro S.A., Bel-lomio A. Pediocin-like Bacteriocins: New Perspectives on Mechanism of Action and Immunity // Curr. Genet. 2018. V. 64. № 2. P. 345–351.
4. Shenkarev Z.O., Panteleev P.V., Balandin S.V., Gizatul-lina A.K., Altukhov D.A., Finkina E.I., Kokryakov V.N., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. Recombinant Expression and Solution Structure of Antimicrobial Peptide Aurelin from Jellyfish *Aurelia aurita* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. V. 429. № 1/2. P. 63–69.
5. Fregeau Gallagher N.L., Sailer M., Niemczura W.P., Nakashima T.T., Stiles M.E., Vederas J.C. Three-Dimensional Structure of Leucocin A in Trifluoroethanol and Dodecylphosphocholine Micelles: Spatial Location of Residues Critical for Biological Activity in Type IIa Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria // Biochemistry. 1997. V. 36. № 49. P. 15062–15072.
6. Uteng M., Hauge H.H., Markwick P.R. L., Fimland G., Mantzilas D., Nissen-Meyer J., Muhle-Goll C. Three-Dimensional Structure in Lipid Micelles of the Pediocin-like Antimicrobial Peptide Sakacin P and a Sakacin P Variant That Is Structurally Stabilized by an Inserted C-Terminal Disulfide Bridge // Biochemistry. 2003. V. 42. № 39. P. 11417–11426.
7. Arbulu S., Lohans C.T., van Belkum M.J., Cintas L.M., Herranz C., Vederas J.C., Hernández P.E. Solution Structure of Enterocin HF, an Antilisterial Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* M3K31 // J. Agric. Food Chem. 2015. V. 63. № 49. P. 10689–10695.
8. Minahk C.J., Farías M.E., Sesma F., Morero R.D. Effect of Enterocin CRL35 on *Listeria monocytogenes* Cell Membrane // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 192. № 1. P. 79–83.
9. Kjos M., Nes I.F., Diep D.B. Class II One-Peptide Bacteriocins Target a Phylogenetically Defined Subgroup of Mannose Phosphotransferase Systems on Sensitive Cells // Microbiology. 2009. V. 155. Pt 9. P. 2949–2961.

**BIOTECHNOLOGICAL METHOD OF PREPARATION
AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ANTIMICROBIAL
PEPTIDE AVICIN A FROM *Enterococcus avium***

**S. V. Balandin, E. I. Finkina, E. K.-A. Nurmukhamedova, A. A. Tagaev,
E. S. Umnyakova, V. N. Kokryakov, Academician of the RAS V. I. Shvets, T. V. Ovchinnikova**

Received September 24, 2018

Avicin A is a bacteriocin from the gram-positive bacterium *Enterococcus avium*. It exhibits a high microbicidal activity against bacteria of the genus *Listeria*, a causative agent of the severe human infection listeriosis. We developed a biotechnological method for obtaining avicin A and characterized its structure and biological activity. We also proposed a possible mechanism of the antimicrobial action of avicin A.

Keywords: antimicrobial peptides, bacteriocins, pediocin-like peptides, listeriosis.