

УДК 577.112:27+615.28

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ХИМЕРНОГО ГЕНА АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЛЯГУШКИ И ЭНДОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА К В БАКТЕРИЯХ *ESCHERICHIA COLI*

Н. В. СОВГИР¹⁾, С. Г. ГОЛЕНЧЕНКО¹⁾, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Исследовалось клонирование и изучались особенности экспрессии в клетках *E. coli* химерного гена, состоящего из генов антимикробного пептида лягушки (*Rana esculenta* L., 1758) эскулентина и эндолизина бактериофага К семейства Myoviridae. Разработаны праймеры для слияния генов эскулентина и эндолизина стафилококкового бактериофага К для получения химерного белка с гистидиновой меткой на С-конце. Гибридный ген клонирован в клетках бактерий *E. coli* и секвенирован. В результате индукции экспрессии гена установлено внутриклеточное накопление химерного белка эскулентин-С/эндолизин КHis, который синтезируется в клетках *E. coli* преимущественно в нерастворимой форме, однако часть белковых молекул остается растворимой и проявляет литическую активность против живых клеток *Staphylococcus aureus*. Области применения: биотехнология, молекулярная биология, фармацевтика.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; эскулентин; эндолизин стафилококкового бактериофага К; фьюжн-белок; антистафилококковая активность; КОЕ.

EXPRESSION FEATURES OF HYBRID GENE OF FROG ANTIMICROBIAL PEPTIDE AND STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGE K ENDOLYSIN IN BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

N. V. SOVGIR^a, S. G. GOLENCHENKO^a, U. A. PRAKULEVICH^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: sovgirnv@inbox.ru

The aim of this study was cloning and expression analysis of hybrid gene consisted of frog (*Rana esculenta* L., 1758) antimicrobial peptide esculentin gene and the Myoviridae family staphylococcal bacteriophage K endolysin gene in *E. coli* cells. Primers to fuse esculentin and staphylococcal bacteriophage K endolysin genes were designed to obtain the chimeric protein with His-tag at the C-terminus. The hybrid gene was cloned in *E. coli* cells and sequenced. The subsequent analysis

Образец цитирования:

Совгир Н. В., Голенченко С. Г., Прокулевич В. А. Особенности экспрессии химерного гена антимикробного пептида лягушки и эндолизина бактериофага К в бактериях *Escherichia coli* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 62–70.

For citation:

Sovgir N. V., Golenchenko S. G., Prakulevich U. A. Expression features of hybrid gene of frog antimicrobial peptide and staphylococcal bacteriophage K endolysin in bacteria *Escherichia coli*. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 62–70 (in Russ.).

Авторы:

Наталья Владимировна Совгир – ассистент кафедры микробиологии биологического факультета.
Сергей Георгиевич Голенченко – научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета.
Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета.

Authors:

Natalia Sovgir, assistant at the department of microbiology, faculty of biology.
sovgirnv@inbox.ru
Sergey Golenchenko, researcher at the department of microbiology, faculty of biology.
golenchenko@inbox.ru
Uladzimir Prakulevich, doctor of science (biology), full professor; head at the department of microbiology, faculty of biology.
prakulevich@mail.ru

of gene expression revealed the intracellular accumulation of fusion protein esculentin-C/endolysin KHis. Recombinant protein accumulated in *E. coli* cells predominantly in the insoluble form, but some of protein molecules remained soluble and exhibited antistaphylococcal activity. Applications: biotechnology, molecular biology, pharmaceuticals.

Key words: antimicrobial peptides; esculentin; staphylococcal bacteriophage K endolysin; fusion protein; antistaphylococcal activity; CFU (colony forming unit).

Введение

Проблема широкого распространения множественно резистентных штаммов патогенных бактерий остается крайне актуальной для медицины и ветеринарии [1]. Новый класс антибактериальных агентов – антимикробные пептиды (АМП) рассматриваются многими исследователями как потенциальный прорыв в решении данной проблемы [2]. Одними из самых активных АМП являются пептиды группы эскулентинов, выделенные из кожных секретов прудовой лягушки (*Rana esculenta* L., 1758), в частности, эскулентин-1b и его полный функциональный аналог эскулентин-С. Эскулентин-С – это короткий катионный мембранотропный пептид, антимикробное действие которого заключается в нарушении целостности бактериальных мембран. Благодаря низкой специфичности механизма действия эскулентин-С эффективен в отношении широкого спектра инфекционных агентов, включая грамотрицательные и грамположительные бактерии [2–4].

Основное препятствие для широкого применения эскулентинов – сложность их получения: методы выделения из природного источника и химический синтез обеспечивают лишь аналитические количества целевого пептида, а биологический синтез сталкивается с проблемой токсичности продукта для бактерии-продуцента [4; 5]. Между тем существует подход к биотехнологическому синтезу эскулентина в составе рекомбинантных фьюжн-белков. Белок-партнер в таких конструкциях должен обратимо инактивировать эскулентин (например, способствуя образованию нерастворимых агрегатов), в результате чего решается проблема токсичности для продуцента. После накопления достаточного количества продукта АМП может быть реактивирован путем рефолдинга, отщепления от партнера или иным способом.

В настоящей работе белком-партнером эскулентина-С выступал эндолизин стафилококкового бактериофага К – эндолизин К, что обусловлено рядом причин. Во-первых, эндолизин К хорошо экспрессируется в клетках *E. coli*, где накапливается в виде телец включения. Во-вторых, он достаточно крупный (495 а. о.) для того, чтобы экранировать эскулентин в тельцах включения, но в то же время эффективно поддается рефолдингу, что позволяет получить активный продукт в препаративных количествах. В-третьих, данный белок обладает мощнейшим и специфическим литическим действием против живых клеток *Staphylococcus aureus*, что дает возможность использовать его в качестве репортерной метки, позволяющей выявлять пикомолярные количества целевого фьюжн-продукта, если он находится в активной форме [6; 7]. Более того, при отсутствии интерференции активностей эскулентина-С и эндолизина К химерный белок можно будет использовать *tale quale* без дополнительных этапов отрезания и очистки эскулентина. Цель настоящей работы – получение и исследование экспрессии в клетках *E. coli* гибридного белка эскулентин-С/эндолизин KHis, который несет на С-конце гистидиновую метку для металл-хелатной хроматографии.

Материалы и методы исследования

Бактериальные штаммы. Для клонирования рекомбинантных плазмид использовали штамм *E. coli* XL-1Blue (F' *proAB lacI^qlacZΔM15 Tn10(Tc^r)/recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac*) из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ. Для индуцибельной экспрессии генов в системе экспрессии бактериофага Т7 [8] применяли штамм *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (F⁻ *ompT hsdS(r_B m_B)dcm + Tet^r gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam^r]* [*argU ileY leuW Strep/Spec^r*]) из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета БГУ. Штамм *S. aureus* 141 из коллекции научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ использовали при определении антистафилококковой активности белка турбидиметрическим методом.

Плазмиды и гены. Ранее сконструированные плазмиды pET-Esc-C [5] и pET-LD3K1 [6], выступающие в качестве матриц в полимеразной цепной реакции (ПЦР), включают кодирующие области генов антимикробного пептида эскулентина-С (141 п. о.) и полноразмерного эндолизина бактериофага К (1485 п. о.) соответственно с модифицированными для усиления экспрессии в клетках бактерий *E. coli* синонимическими кодонами. Гены *esc-C* и *lysK* клонированы по сайтам рестрикции *Nde* I и *Eco* RI. Плазмиду pET-24b(+) (*Novagen*, Великобритания) использовали в качестве вектора для клонирования гибридного гена.

Амплификация генов. Амплификацию проводили при помощи ПЦР в смеси стандартного состава [9] с использованием программируемого термостата Veriti 96 Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, Великобритания) и реактивов компании *Thermo Scientific* (Литва). В работе использовали праймеры производства фирм *Invitrogen* (США) и *Прайммех* (Беларусь). Дизайн праймеров и их анализ осуществляли при помощи программы *OligoAnalyzer 3.1* [10]. Режим ПЦР с праймерами EscCLysK-F и LysK_R_His: 94 °С – 5 мин; 94 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 3 мин (30 циклов); 72 °С – 7 мин. Режим ПЦР с праймерами EscCL-F и LysK_R_His: 94 °С – 5 мин; 94 °С – 30 с, 62 °С – 30 с, 72 °С – 3 мин (30 циклов); 72 °С – 7 мин.

Генно-инженерные методы и ферменты. Для клонирования использовали ферменты и буферные системы компании *Thermo Scientific*, коммерческие наборы фирмы *QIAGEN* (Германия). Кальциевую трансформацию бактерий *E. coli* и электрофоретический анализ ДНК проводили согласно стандартным методикам [11].

Индукция экспрессии клонированного гена в составе вектора pET-24b(+). Индукцию проводили согласно предложенному производителем плазмид серии pET протоколу [12]. Ночную культуру бактерий *E. coli* разводили в 20 раз и культивировали в колбах с 10 мл полноценного бульона LB, содержащего канамицин (30 мкг/мл) и хлорамфеникол (15 мкг/мл), при 37 °С с аэрацией и перемешиванием (180 об/мин). При оптической плотности ≈ 1 ($A = 600$ нм) в среду добавляли синтетический аналог лактозы – ИПТГ (изопропил- β -D-тиогалактопиранозид) до конечной концентрации 0,5 ммоль/л. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Cary 50 (*Varian*, США).

Построение кривых роста бактерий и определение титра клеток чашечным методом Коха. Ночную культуру бактерий *E. coli* разводили в 20 раз в 100 мл полноценного бульона LB. Спустя 90 мин культивирования при оптической плотности $\approx 0,8$ ($A = 600$ нм) культуры разделяли на две одинаковые порции, и в одну из них добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,5 ммоль/л. Оптическую плотность измеряли каждые полчаса на протяжении всего эксперимента с момента разведения ночной культуры. На основе результатов измерений оптической плотности бактериальной культуры в трехкратной повторности вычисляли среднее значение и стандартное отклонение для построения графиков.

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли методом Коха согласно [13] путем высева суспензии микроорганизмов из ряда последовательных разведений в физиологическом растворе на LB-агар, содержащий канамицин (30 мкг/мл) и хлорамфеникол (15 мкг/мл). На основе результатов подсчета КОЕ в трехкратной повторности вычисляли среднее значение и стандартное отклонение для построения графиков.

Разрушение бактериальных клеток. Клетки разрушали набором реактивов B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent (*Thermo Scientific*, США) согласно инструкции производителя. Лизаты анализировали электрофоретически.

Электрофоретический анализ клеточных белков *E. coli* осуществляли в 16 % полиакриламидных гелях (ПААГ) в денатурирующих условиях по методу Laemmli [14]. Гели окрашивали в растворе Кумасси синего R-250. Аминокислотные последовательности белков анализировали по алгоритму, реализованному в программе *ProtParam* Швейцарского института биоинформатики [15]. Процентное содержание экспрессируемых белков определяли денситометрически, для этого пробы, полученные в результате нескольких (не менее трех) экспериментов по индукции, выравнивали по оптической плотности перед внесением в ПААГ, после электрофореза и окраски гели оцифровывали, а изображения анализировали с использованием программы *TotalLab 2.0* фирмы *Nonlinear Dynamics Ltd.* (Великобритания).

Антистафилококковую активность выявляли в супернатанте лизата клеток, индуцированных при температуре, способствующей повышению растворимости белков (19 °С), по отношению к живым клеткам *S. aureus* 141 турбидиметрическим методом согласно [7]. В качестве отрицательного контроля суспензию клеток штамма *S. aureus* 141 ($A_{600} \approx 0,4$) инкубировали с буфером (CaCl_2 (10 ммоль/л), трис-НСI (50 ммоль/л), pH 7,5), на основе которого готовили бактериальную суспензию. Положительным контролем являлась инкубация суспензии клеток штамма *S. aureus* 141 с супернатантом, содержащим эндолизин К. Результаты анализировали на основе графиков изменения оптической плотности бактериальной суспензии ($A = 600$ нм). Измерения оптической плотности производили на спектрофотометре Cary 50 (*Varian*).

Результаты исследований и их обсуждение

Получение гибридной генетической конструкции *esc-C/lysKHis* на основе генов эскулентина-С (*esc-C*) и полноразмерного эндолизина К (*lysK*) проводили в процессе двух последовательных ПЦР согласно схеме, представленной на рис. 1. Свойства использованных праймеров приведены в таблице.

Характеристика праймеров для синтеза гибридного гена *esc-C/lysKHis*

Primers for hybrid gene *esc-C/lysKHis* synthesis

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'–3'	T_m , °C*	Особенности и дополнительные функциональные участки
Праймер для слияния генов			
EscCLysK-F	attaaaggtgaatgtatggctaacaaccag	42,2/49,3	Комплементарен к 5'-концу гена <i>lysK</i> и к 3'-концу гена <i>esc-C</i>
Прямой праймер к гену <i>esc-C</i>			
EscCL-F	gag catatg gggcattttctcctaattg	59,2	Сайт для рестриктазы <i>Nde</i> I: catatg
Обратный праймер к гену <i>lysK</i>			
LysK_R_His	atgctc gagttgaaaacaccccaagca	59,0	Сайт для рестриктазы <i>Xho</i> I: ctcgag

*Указана T_m (температура плавления праймера) только для участков комплементарности. Жирным шрифтом выделены сайты рестрикции.

* T_m (primer melting temperature) indicated only for complementary parts. Restriction sites are highlighted in bold.

В результате первой реакции (рис. 1, ПЦР 1) с помощью праймеров EscCLysK-F и LysK_R_His на матрице pET-LD3K1 синтезировали фрагмент ДНК, содержащий полноразмерный ген *lysK* с небольшим (15 п. н.) участком гена *esc-C* на 5'-конце. Помимо этого, с помощью праймера LysK_R_His стоп-кодон в конце кодирующей части гена *lysK* заменен на сайт рестрикции *Xho* I, что необходимо для получения белкового продукта с гистидиновой меткой. Продукт первой ПЦР использовали в качестве субстрата для второй (см. рис. 1, ПЦР 2), где он выступал одновременно в роли праймера и матрицы: участок гена *esc-C* на 5'-конце первого продукта образовывал зону комплементарности с 3'-концом гена *esc-C*, благодаря чему происходил синтез гибридной последовательности *esc-C/lysKHis*, затем с помощью праймеров EscCL-F и LysK_R_His данную последовательность амплифицировали (см. рис. 1).

Полученную таким образом химерную последовательность по сайтам рестрикции *Nde* I и *Xho* I вводили в состав вектора pET-24b(+) и клонировали в клетках бактерий *E. coli* XL-1Blue. Наличие целевых вставок во всех клонах проверяли рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру.

Следует отметить, что при клонировании по сайтам *Nde* I и *Xho* I в вектор pET-24b(+) химерный ген *esc-C/lysKHis* становится в одну рамку считывания с последовательностью на плазмиде, детерминирующей синтез пептида из шести «плазмидных» остатков гистидина. В результате экспрессирующийся с данной матрицы белковый продукт несет гистидиновую метку на С-конце. Формированию такой метки на С-конце эндолизина К препятствует тандем стоп-кодонов на 3'-конце последовательности гена *lysK*.

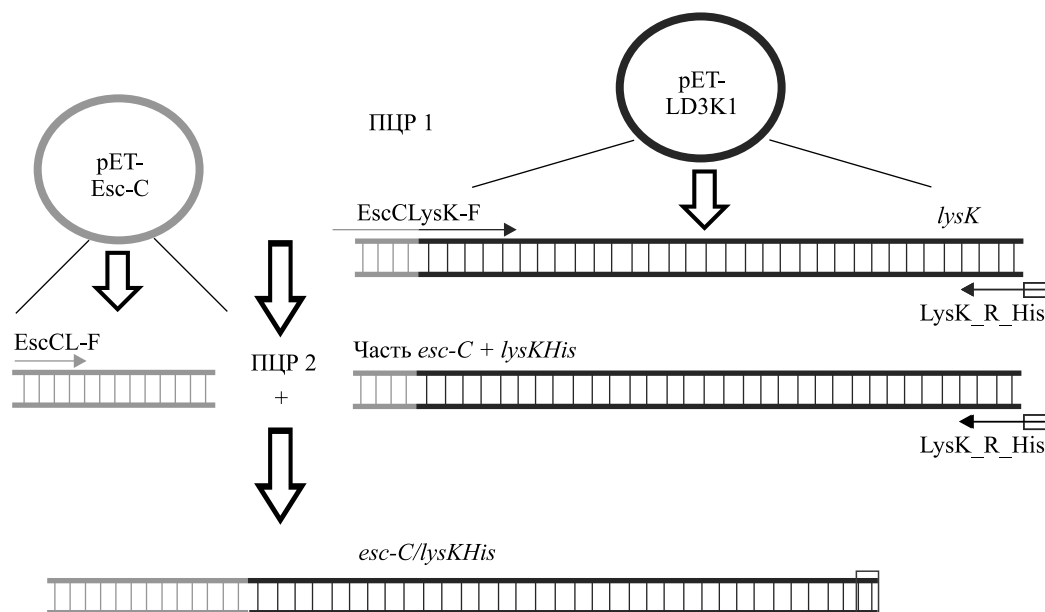


Рис. 1. Схема получения гибридного гена *esc-C/lysKHis*:
EscCLysK-F, EscCL-F – прямые праймеры; LysK_R_His – обратный праймер

Fig. 1. Scheme of hybrid gene *esc-C/lysKHis* synthesis:
EscCLysK-F, EscCL-F – forward primers; LysK_R_His – reverse primer

Рекомбинантной плазмидой, содержащей химерный ген *esc-C/lysKHis*, трансформировали клетки бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Клетки клонов, в которых наличие целевых генов было подтверждено ПЦР, выращивали в течение 4 ч в присутствии ИПТГ для индукции экспрессии, после чего лизаты клеток исследовали электрофоретически.

Результаты электрофоретического анализа суммарных клеточных белков одного из проверенных клонов после индукции представлены на рис. 2. В качестве контролей выступают клетки, несущие собственно ген эндолизина К (см. рис. 2, дорожка 1), выращенные в тех же условиях, а также клетки с химерным геном, выращенные без индуктора (см. рис. 2, дорожка 3). Белковый продукт, соответствующий по массе эскулентину-С (4,8 кДа), в бактериальных клетках не выявляется (см. рис. 2, дорожка 5), что согласуется с утверждением других авторов о невозможности получения индивидуального эскулентина-С путем биосинтеза в клетках *E. coli* [4]. В клетках, наследующих плазмиду с химерным геном *esc-C/lysKHis*, после индукции накапливается белок, соответствующий по массе ожидаемому фьюжн-продукту эскулентин-С/эндолизин КHis: 60,5 кДа (см. рис. 2, дорожка 2).

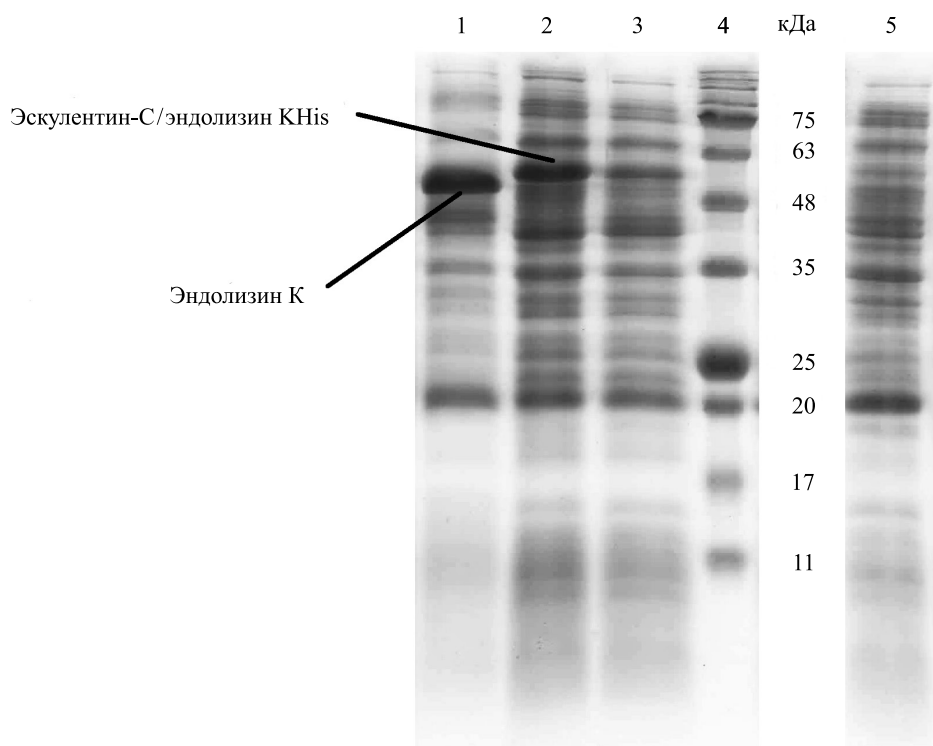


Рис. 2. Электрофоретический анализ суммарных клеточных белков рекомбинантных штаммов *E. coli* через 4 ч после индукции:
1 – эндолизин К (0,5 ммоль/л ИПТГ); 2 – эскулентин-С/эндолизин КHis (0,5 ммоль/л ИПТГ);
3 – эскулентин-С/эндолизин КHis (без ИПТГ, отрицательный контроль); 4 – белки-стандарты молекулярных масс (кДа) Blue wide Range Protein Ladder (Cleaver Scientific Ltd., Великобритания);
5 – эскулентин-С (0,5 ммоль/л ИПТГ)

Fig. 2. Electrophoretic data for total cellular proteins of *E. coli* recombinant strains after 4 h induction:
1 – endolysin K (0.5 mmol/l IPTG); 2 – esculentin-C/endolysin KHis (0.5 mmol/l IPTG);
3 – esculentin-C/endolysin KHis (w/o IPTG, negative control); 4 – Blue wide Range Protein Ladder (Cleaver Scientific Ltd., United Kingdom); 5 – esculentin-C (0.5 mmol/l IPTG)

По данным денситометрического анализа, содержание химерного белка эскулентин-С/эндолизин КHis в клетках продуцента спустя 4 ч после индукции составляет в среднем 16 % ($\pm 0,27$) общего белка клетки, а интактного эндолизина К достигает 25 %.

Эндолизин К является строго специфическим белком и проявляет лизирующую бактерицидную активность только против бактерий *S. aureus*. Индукция синтеза этого белка в клетках *E. coli* не влияет на динамику роста бактерий и накопление биомассы (рис. 3, 1). Однако индукция синтеза химерного белка, так же как и эскулентина-С, проявляющего антимикробную активность широкого спектра, в том числе в отношении грамотрицательных бактерий, уже через 30 мин после добавления индуктора полностью останавливает накопление биомассы клеток-продуцентов (см. рис. 3, 3 и 4).

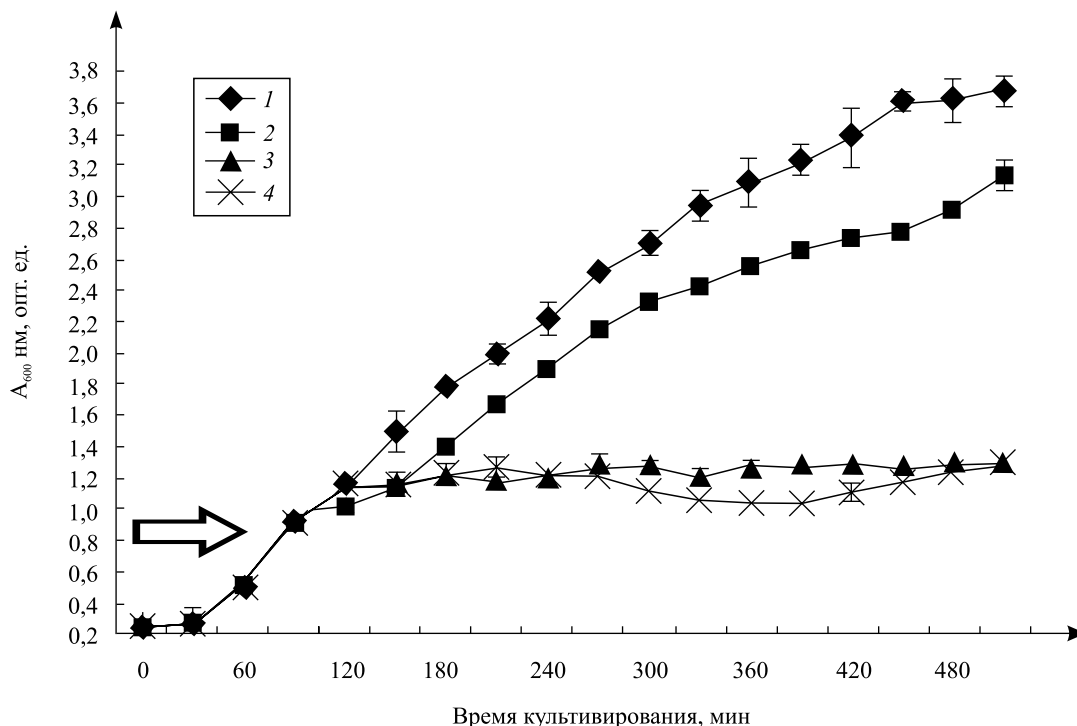


Рис. 3. Изменение оптической плотности культур рекомбинантных штаммов *E. coli* в условиях индукции: 1 – эндолизин К (0,5 ммоль/л ИПТГ); 2 – эскулентин-С/эндолизин КHis (без ИПТГ, отрицательный контроль); 3 – эскулентин-С (0,5 ммоль/л ИПТГ); 4 – эскулентин-С/эндолизин КHis (0,5 ммоль/л ИПТГ). Стрелкой обозначен момент добавления индуктора (0,5 ммоль/л ИПТГ) при $A_{600} \approx 0,8$

Fig. 3. Optical density dynamics of *E. coli* recombinant strains under induction conditions: 1 – endolysin K (0.5 mmol/l IPTG), 2 – esculentin-C/endolysin KHis (w/o IPTG, negative control), 3 – esculentin-C (0.5 mmol/l IPTG), 4 – esculentin-C/endolysin KHis (0.5 mmol/l IPTG). Induction time (0.5 mmol/l IPTG) at $A_{600} \approx 0,8$ is indicated by the arrow

Прекращение в условиях индукции накопления биомассы клетками, несущими гены как интактного эскулентина-С, так и химерного белка, сопровождается остановкой роста количества КОЕ (рис. 4, 2 и 3). При этом жизнеспособность бактериальных клеток падает незначительно и восстанавливается после высева бактерий на плотные питательные среды, не содержащие индуктор (ИПТГ), что свидетельствует о бактериостатическом характере наблюдаемого эффекта. Некоторая потеря жизнеспособности индуцированных клеток наблюдается после 5–7 ч культивирования в состоянии индукции на фоне бактериостатического эффекта и, скорее всего, связана с переходом в фазу естественного отмирания (автолиза) неделящихся клеток.

Таким образом, из приведенных данных можно сделать вывод о том, что экспрессия гена антистафилококкового эндолизина К в бактериях *E. coli* происходит с высокой эффективностью (целевой белок составляет до 25 % общего внутриклеточного белка) и накапливаемый белок не влияет на жизнеспособность клеток продуцента. Индукция синтеза антимикробного пептида эскулентина-С в тех же бактериях вызывает бактериостатический эффект, который длится на протяжении всего периода индукции. При этом клетки сохраняют жизнеспособность, их деление восстанавливается при прекращении экспрессии гетерологичного гена в бактериях после высева на питательную среду, не содержащую индуктор. Точно так же ведет себя и химерный белок, т. е. эффект экспрессии эскулентина не меняется при слиянии этого короткого пептида с крупным полноразмерным белком – эндолизином К.

Функциональная целостность эндолизина К в составе фьюжн-белка эскулентин-С/эндолизин КHis также сохраняется, о чем свидетельствуют данные по высокой антистафилококковой активности супернатантов индуцированных культур клеток – продуцентов эндолизина К (рис. 5, 1) и химерного белка (см. рис. 5, 2), в то время как в контроле оптическая плотность суспензии бактерий *S. aureus* 141 не меняется (см. рис. 5, 3).

Результаты экспериментов по выявлению антистафилококковой активности белка эскулентин-С/эндолизин КHis подтверждают в функциональном тесте, что в клетках-продуцентах синтезируется именно гетерологичный рекомбинантный фьюжн-белок, детерминируемый сконструированным химерным геном, а не близкий ему по массе какой-либо белок *E. coli*.

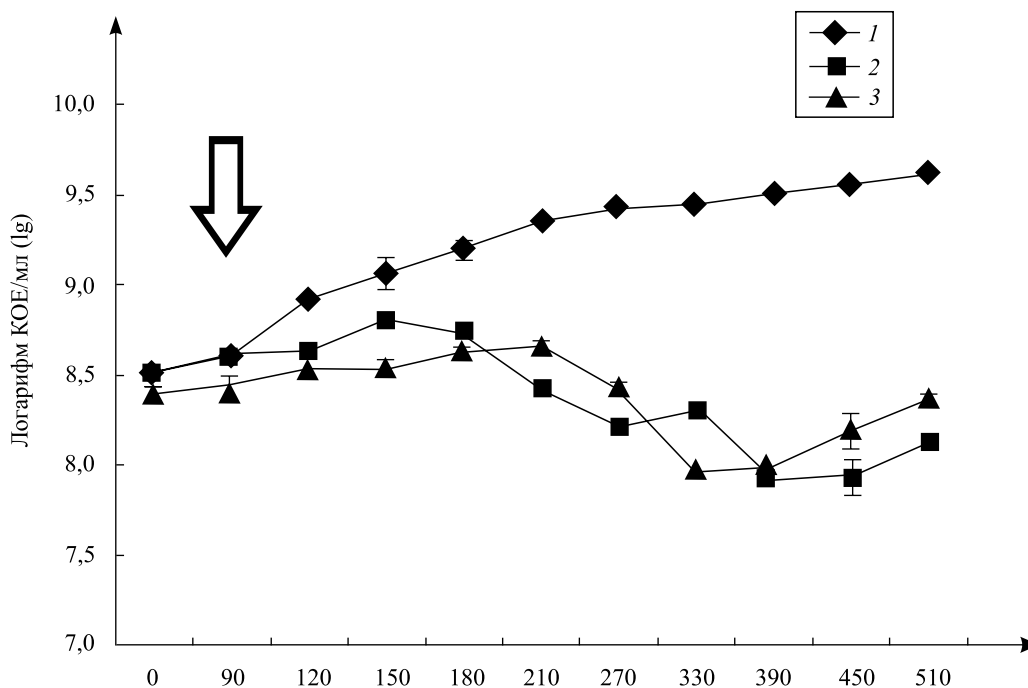


Рис. 4. Жизнеспособность клеток рекомбинантных штаммов *E. coli* в условиях индукции:
1 – эндוליзин К; 2 – эскулентин-С; 3 – эскулентин-С/эндOLIзин КHis.
Стрелкой обозначен момент добавления индуктора (ИПТГ 0,5 ммоль/л) при $A_{600} \approx 0,8$

Fig. 4. The viability of *E. coli* recombinant strains under induction conditions:
1 – endolysin K; 2 – esculentin-C; 3 – esculentin-C/endolysin KHis.
Induction time (0.5 m mol/l IPTG) at $A_{600} \approx 0,8$ is indicated by the arrow

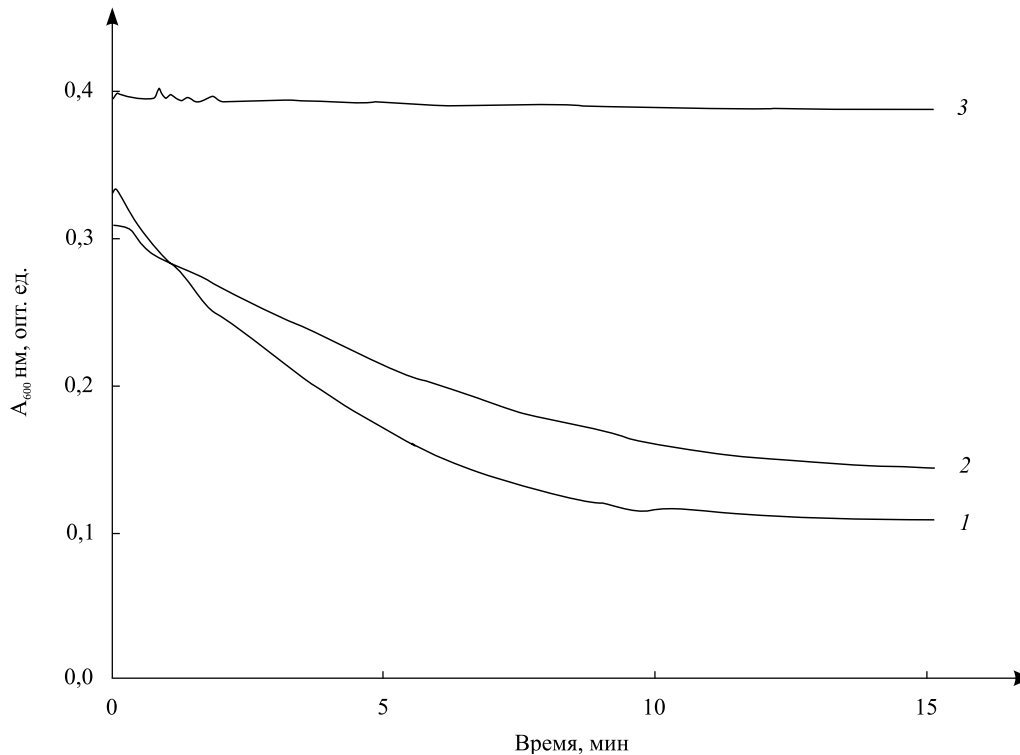
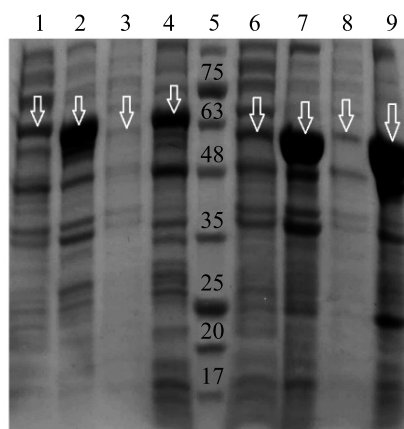


Рис. 5. График изменения оптической плотности суспензии живых клеток штамма *S. aureus* 141:
1 – инкубация с супернатантом, содержащим эндOLIзин К; 2 – инкубация с супернатантом,
содержащим эскулентин-С/эндOLIзин КHis; 3 – инкубация с буфером (отрицательный контроль)
Fig. 5. Optical density dynamics of *S. aureus* 141 live cells suspension: 1 – incubation with supernatant
containing endolysin K; 2 – incubation with supernatant containing esculentin-C/endolysin KHis;
3 – incubation with buffer (negative control)

Антистафилококковая активность супернатантов индуцированных культур указывает на возможность экспрессии генов с правильным фолдингом получаемых белков в процессе биосинтеза. Однако обычно при сверхэкспрессии рекомбинантных белков в *E. coli*, которая наблюдается в исследуемой системе (от 12 до 25 % – целевые белки), избыточное количество белка переходит в неактивную нерастворимую форму, образуя внутри клеток так называемые тельца включения [16].

В целях определения возможных форм состояния фьюжн-белка эскулентин-С/эндолизин КHis проводили индукцию экспрессии кодирующего его гена при температурах 19 и 37 °С, затем клетки разрушали, центрифугировали, а супернатант и осадок подвергали электрофоретическому анализу (рис. 6). В качестве контроля использовали лизат клеток, экспрессирующих интактный эндолизин К.

Белки эскулентин-С/эндолизин КHis и эндолизин К в клетках *E. coli*, как видно на рис. 6, в основном накапливаются в нерастворимой форме при температуре культивирования как 19 °С, так и 37 °С (см. рис. 6, дорожки 2; 4 и 7; 9 соответственно). Одновременно оба белка также присутствуют в растворимой фракции лизата, но в гораздо меньших количествах (см. рис. 6, дорожки 1; 3 и 6; 8 соответственно).



кДа

Рис. 6. Электрофоретический анализ белков клеточных лизатов бактерий *E. coli* после индукции:

1 – эскулентин-С/эндолизин КHis (супернатант, 19 °С); 2 – эскулентин-С/эндолизин КHis (осадок, 19 °С); 3 – эскулентин-С/эндолизин КHis (супернатант, 37 °С); 4 – эскулентин-С/эндолизин КHis (осадок, 37 °С); 5 – белки-стандарты молекулярных масс (кДа) Blue wide Range Protein Ladder (Clever Scientific Ltd., Великобритания); 6 – эндолизин К (супернатант, 19 °С); 7 – эндолизин К (осадок, 19 °С); 8 – эндолизин К (супернатант, 37 °С); 9 – эндолизин К (осадок, 37 °С). Белки эскулентин-С/эндолизин КHis и эндолизин К указаны стрелками

Fig. 6. Electrophoretic data for proteins of *E. coli* cell lysates after induction:

1 – esculentin-C/endolysin KHis (supernatant, 19 °C); 2 – esculentin-C/endolysin KHis (sediment, 19 °C); 3 – esculentin-C/endolysin KHis (supernatant, 37 °C); 4 – esculentin-C/endolysin KHis (sediment, 37 °C); 5 – Blue wide Range Protein Ladder (Clever Scientific Ltd., United Kingdom); 6 – endolysin K (supernatant, 19 °C); 7 – endolysin K (sediment, 19 °C); 8 – endolysin K (supernatant, 37 °C); 9 – endolysin K (sediment, 37 °C). Esculentin-C/endolysin KHis and endolysin K proteins are indicated by the arrows

Заключение

Таким образом, в клетках бактерий *E. coli* в составе стабильно наследуемого вектора клонирован гибридный ген, детерминирующий синтез фьюжн-белка эскулентин-С/эндолизин КHis. Несмотря на то что синтез химерного белка сопровождается бактериостатическим действием на культуру продуцента, химерный белок эффективно накапливается в клетках продуцента преимущественно в нерастворимой форме. Установленные антистафилококковый и бактериостатический против *E. coli* эффекты химерного белка свидетельствуют о том, что в молекуле сохраняются активности, присущие как эскулентину, так и эндолизину К, выступающим в качестве фьюжн-партнеров в созданной конструкции.

Библиографические ссылки

1. Anthony A. A., Adekunle C. F., Gulshan S., et al. Antibiotic resistant superbugs: assessment of the interrelationship of occurrence in clinical settings and environmental niches // *Molecules*. 2017. Vol. 22, № 1. P. 29–45.
2. Cappiello F., Di Grazia A., Segev-Zarko L. A., et al. Esculentin-1a-derived peptides promote clearance of *Pseudomonas aeruginosa* internalized in bronchial cells of cystic fibrosis patients and lung cell migration: biochemical properties and a plausible mode of action // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. Vol. 60, № 12. P. 7252–7262.

3. Ouardien S., Brul S., Zaat S. A. J. Antimicrobial activity of cationic antimicrobial peptides against gram-positives: current progress made in understanding the mode of action and the response of bacteria // *Front. Cell Dev. Biol.* 2016. Vol. 4, № 111. P. 1–16.
4. Ponti D., Mignogna G., Mangoni M. L., et al. Expression and activity of cyclic and linear analogues of esculentin-1, an antimicrobial peptide from amphibian skin // *Eur. J. of Biochem.* 1999. Vol. 263, № 3. P. 921–927.
5. Совгир Н. В., Прокулевич В. А. Клонирование и экспрессия гена антимикробного белка эскулентина-1b (*Rana esculenta*) в клетках бактерий *Escherichia coli* // Тр. БГУ. Сер. : Биол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. 2011. Т. 8 : в 2 ч. Ч. 1. С. 70–75.
6. Голенченко С. Г., Прокулевич В. А. Синтез и экспрессия гена лизирующего фермента стафилококкового бактериофага К в клетках *E. coli* // Тр. БГУ. Сер. : Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. 2012. Т. 7, ч. 1. С. 199–204.
7. Horgan M., O'Flynn G., Garry J., et al. Phage lysin LysK can be truncated to its chap domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant Staphylococci // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75, № 3. P. 872–874.
8. Studier F. W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // *J. Mol. Biol.* 1986. Vol. 189. P. 113–130.
9. McPherson M. J., Moller S. G. PCR. Oxford, 2000.
10. OligoAnalyzer tool [Electronic resource]. URL: <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer> (date of access: 15.02.2015).
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984.
12. pET Manual system [Electronic resource]. 2005. URL: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf/ (date of access: 02.06.2015).
13. Лысак В. В., Желдакова Р. А. Микробиология : метод. рекомендации к лаборатор. занятиям, контроль самостоят. работы студентов. Минск, 2002.
14. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Vol. 227. P. 680–685.
15. ProtParam tool [Electronic resource] // Swiss Institute of Bioinformatics. 2014. URL: <http://web.expasy.org/protparam/> (date of access: 17.02.2016).
16. Singh S. M., Panda A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins // *J. Biosci. Bioeng.* 2005. Vol. 99, № 4. P. 303–310.

References

- 1 Anthony A. A., Adekunle C. F., Gulshan S., et al. Antibiotic Resistant Superbugs: Assessment of the Interrelationship of Occurrence in Clinical Settings and Environmental Niches. *Molecules.* 2017. Vol. 22, No. 1. P. 29–45.
2. Cappiello F., Di Grazia A., Segev-Zarko L. A., et al. Esculentin-1a-derived peptides promote clearance of *Pseudomonas aeruginosa* Internalized in bronchial cells of cystic fibrosis patients and lung cell migration: biochemical properties and a plausible mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. Vol. 60, No. 12. P. 7252–7262.
3. Ouardien S., Brul S., Zaat S. A. J. Antimicrobial Activity of cationic antimicrobial peptides against gram-positives: current progress made in understanding the mode of action and the response of bacteria. *Front. Cell Dev. Biol.* 2016. Vol. 4, No. 111. P. 1–16.
4. Ponti D., Mignogna G., Mangoni M. L., et al. Expression and activity of cyclic and linear analogues of esculentin-1, an antimicrobial peptide from amphibian skin. *Eur. J. Biochem.* 1999. Vol. 263, No. 3. P. 921–927.
5. Совгир Н. В., Прокулевич В. А. Cloning and expression of antimicrobial peptide esculentin-1b gene (*Rana esculenta*) in *Escherichia coli* cells. *Tr. BGU. Ser. : Fiziol., biokhim. i molek. osnovy funkt. biosist.* 2011. Vol. 8 : in 2 parts. Part 1. P. 70–75 (in Russ.).
6. Golenchenko S. G., Prokulevich V. A. Synthesis and expression of staphylococcal phage lysin gene in *E. coli*. *Tr. BGU. Ser. : Fiziol., biokhim. i molek. osnovy funkt. biosist.* 2012. Vol. 7, No. 1. P. 199–204 (in Russ.).
7. Horgan M., O'Flynn G., Garry J., et al. Phage Lysin LysK can be truncated to its chap domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant Staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75, No. 3. P. 872–874.
8. Studier F. W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 1986. Vol. 189. P. 113–130.
9. McPherson M. J., Moller S. G. PCR. Oxford, 2000.
10. OligoAnalyzer tool [Electronic resource]. URL: <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer> (date of access: 15.02.2015).
11. Maniatis T., Fritch E., Sembruk Dzh. Metody geneticheskoi inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie [Genetic engineering methods. Molecular cloning]. Moscow, 1984 (in Russ.).
12. pET Manual system [Electronic resource]. 2005. URL: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf/ (date of access: 02.06.2015).
13. Лысак В. В., Желдакова Р. А. Микробиологија: метод. рекомендација к лаборатор. занятијам, контрол' самост. рабoты студeнтoв [Microbiology: guidelines for laboratory work, control of student's individual work]. Minsk, 2002 (in Russ.).
14. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. Vol. 227. P. 680–685.
15. ProtParam tool [Electronic resource]. *Swiss Inst. Bioinform.* 2014. URL: <http://web.expasy.org/protparam/> (date of access: 17.02.2016).
16. Singh S. M., Panda A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 2005. Vol. 99, No. 4. P. 303–310.

Статья поступила в редакцию 28.12.2016.
Received by editorial board 28.12.2016.