

УДК 577.112:27+615.28

Н. В. Совгир, В. А. Прокулевич

СЛИЯНИЕ ГЕНОВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЭСКУЛЕНТИНА ЛЯГУШКИ И АНТИСТАФИЛОКОККОВОГО ЭНДОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА К С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПРОТИВОМИКРОБНОГО БЕЛКА

Объектами изучения являются химерные гены и детерминируемые ими рекомбинантные антимикробные фьюжн-белки, включающие антимикробный пептид широкого спектра действия – эскулентин лягушки (*Rana esculenta* L., 1758) и СНАР-домен эндолизина стафилококкового бактериофага К семейства *Myoviridae*. Целью исследования являлось изучение экспрессии в клетках *E. coli* гибридных последовательностей ДНК, кодирующих химерные белки, в которых аминокислотная последовательность эскулентина находится либо на N-, либо на С-концах последовательности, соответствующей СНАР-домени антистафилококкового белка. Разработаны праймеры для слияния генов антимикробного пептида эскулентина и СНАР-домена эндолизина стафилококкового бактериофага К. Полученные гибридные гены клонированы в клетках бактерий *E. coli* и отсекужены. Установлено внутриклеточное накопление фьюжн-белка, в котором эскулентин находится на N-конце гибридной молекулы, при этом синтез белка в бактериях сопровождается снижением их жизнеспособности и частичным лизисом клеток-продуцентов. Область применения: биотехнология, молекулярная биология, фармацевтика.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, эскулентин, СНАР-домен эндолизина стафилококкового бактериофага К, фьюжн-белок, экспрессия, КОЕ (колониобразующая единица).

Введение. В связи с угрозой появления полирезистентных штаммов патогенных бактерий в результате повсеместного использования антибиотиков в медицине и ветеринарии актуальным является поиск новых антимикробных агентов. Такими агентами могут выступать антимикробные пептиды (АМП), которые весьма перспективны для получения на их основе принципиально новых лекарственных препаратов, так называемых «антибиотиков животного происхождения». Относясь к группе биопрепаратов широкого спектра действия (активны против грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов, некоторых оболочечных вирусов), они лишены многих недостатков, свойственных традиционно применяемым антибиотикам. К антимикробным пептидам практически не возникает резистентность у патогенов; они не вызывают иммунодепрессий и других функциональных расстройств у человека и животных; характеризуются высокой активностью при низких терапевтических концентрациях; не накапливаются в организме [1; 2]. Применение их не влияет на качество продуктов животноводства и не требует ограничений по мясу и молоку. Разработка подходов к получению антимикробных пептидов генно-инженерными способами важна не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения.

Некоторые особенности строения АМП, такие как небольшой размер, малая молекулярная масса и относительно высокий положительный заряд молекул при физиологическом значении pH, препятствуют получению пептидов традиционным биотехнологическим путем в результате прямого клонирования и последующей экспрессии соответствующих генов в клетках *E. coli*.

Совгир Наталья Владимировна, науч. сотрудник НИЛ биотехнологии каф. микробиологии БГУ (Беларусь).

Адрес для корреспонденции: пр. Независимости, 4, 200030, г. Минск, Беларусь; e-mail: sovgitmv@inbox.ru

Прокулевич Владимир Антонович, д-р биол. наук, проф., зав. каф. микробиологии БГУ (Беларусь).

Адрес для корреспонденции: пр. Независимости, 4, 200030, г. Минск, Беларусь; e-mail: prokulevich@mail.ru

Кроме того, катионные пептиды подвержены протеолитической деградации внутриклеточными пептидазами бактерий и обладают потенциальной токсичностью для клеток, в которых экспрессируются [3]. Получение гибридных генов, кодирующих фьюжн-белки, состоящие не только из АМП, но и других белков, обладающих антибактериальной активностью, перспективно для борьбы с полиинфекциями и расширяет возможности многоцелевого назначения биопрепаратов.

АМП Эскулентин-1b, выделенный М. Симмако (M. Simmaco) и сотрудниками [4] из кожных секретов *Rana esculenta* L., 1758 [5], в нативном виде не может быть получен в клетках *E. coli* ввиду его токсичности для бактерий и структурной нестабильности [6]. Однако реально получить целевой белок можно путем экспрессии гена, кодирующего АМП, сшитого с каким-либо геном, детерминирующим синтез белка-партнера [7]. В этом случае гибридный белок будет образовываться не в растворимой форме, а в виде телец включения, что должно защитить его от деградации под воздействием внутриклеточных пептидаз и снизить токсичность для клеток продуцента [8].

В данной работе в качестве белка-партнера эскулентина лягушки выступает СНАР- (cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidases) домен эндолизина стафилококкового бактериофага К, который обладает видоспецифической антистафилококковой активностью, является высоко катионным и эффективно экспрессируется в клетках *E. coli* с образованием телец включения [9].

Целью работы являлось получение и изучение особенностей экспрессии в клетках *E. coli* гибридных последовательностей ДНК, несущих в своем составе структурную часть гена Эскулентин-С и СНАР-домена, ориентированные друг относительно друга так, чтобы в кодируемых гибридными генами белках Эскулентин-С находился либо на N-, либо на С-концах гибридных белковых молекул.

Методы исследования

Бактериальные штаммы и плазмиды. Для клонирования рекомбинантных плазмид использовали штамм *E. coli* XL-1 Blue (F⁺ *proABlacZΔM15Tn10(Tc^r)/recA1 endA1gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac*) из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета Белорусского государственного университета (БГУ).

Для индуцибельной экспрессии клонированных гибридных генов в системе транскрипции бактериофага T7 использовали штаммы *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (F⁺ *ompT hsdS_B (r_Bm_B) dcm⁺Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]*) и *E. coli* BL21(DE3)pLysS (F⁺ *ompT hsdS_B (r_Bm_B) gal dcm λ(DE3) pLysS (Cm^r)*) [10] из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета БГУ.

Плазмиду pET-LysK165 (Kan^r) [9] использовали для амплификации гена СНАР-домена эндолизина стафилококкового бактериофага К. Плазмиду pET-24b(+) (Kan^r) из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета БГУ использовали в качестве вектора для клонирования и экспрессии гибридных генов.

Амплификация генов. Амплификацию проводили при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в смеси стандартного состава [10] с использованием программируемого термостата Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) и реактивов производства Thermo Scientific. В работе использовали праймеры производства Invitrogen и «Праймтех». Дизайн праймеров и их анализ осуществляли при помощи программы OligoAnalyzer 3.1 [11].

Генно-инженерные методы и ферменты. Выделение плазмидной ДНК и выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили наборами производства QIAGEN: QIAprep Spin Miniprep Kit и QIAquick Gel Extraction Kit соответственно. Рестриксию плазмидной ДНК и амплифицированных фрагментов ДНК, а также последующее лигирование осуществляли с использованием ферментов и буферных систем производства Thermo Scientific. Рекомбинантные плазмиды вводили в бактерии *E. coli* методом кальциевой трансформации. Электрофоретический анализ плазмидной ДНК и продуктов амплификации проводили согласно стандартным методикам [12].

Индукция экспрессии клонированных генов в составе вектора pET-24b(+). Ночную культуру бактерий 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 1,0 (λ 600 нм) в среду добавляли синтетический аналог лактозы – ИПТГ (изопропил- β -D-тиогактопиранозид) до конечной концентрации 0,5 ммоль/л. Измерения оптической плотности производили на спектрофотометре Cary 50 (Varian).

Построение кривых роста бактерий и определение титра клеток. Культивирование штаммов бактерий осуществляли в тех же условиях, что и индукцию, однако использовали колбы со 100 мл полноценного бульона LB. Через 90 мин после начала культивирования при оптической плотности 1,0 (λ 600 нм) культуры разделяли на две одинаковые порции и в одну из них добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,5 ммоль/л. Измерения оптической плотности проводили каждые полчаса на протяжении всего эксперимента с момента разведения ночной культуры. Количество жизнеспособных клеток определяли методом Коха путем высева суспензии микроорганизмов из ряда последовательных разведений в физиологическом растворе на LB-агар в чашках Петри, содержащий канамицин (30 мкг/мл) и хлорамфеникол (15 мкг/мл) [13].

На основе результатов измерений оптической плотности бактериальной культуры каждого штамма, проводившихся в трехкратной повторности, средствами стандартных программ табличного процессора Excel офисного пакета MS Office 2010 вычисляли среднее значение и стандартное отклонение. На основе результатов вычислений этих двух параметров строили графики.

ДСН-ПААГ-электрофорез клеточных белков. Электрофоретический анализ суммарных клеточных белков *E. coli* осуществляли в 16 % полиакриламидных гелях (ПААГ) в денатурирующих условиях с 0,1 % додецилсульфатом натрия (ДСН) 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 денситометрическим анализом цифровых изображений окрашенных ПААГ с использованием программы TotalLab 2.0 фирмы Nonlinear Dynamics Ltd.

Основная часть. Первые двадцать две аминокислоты неактивного предшественника антимикробного пептида широкого спектра действия – Эскулентина-1b являются сигнальной последовательностью, а следующие шестнадцать аминокислот – частью пропептида. В процессе биосинтеза в эпителиальных клетках лягушки и сигнальная последовательность, и пропептид отрезаются при «созревании» Эскулентина-1b и образуется активный антимикробный пептид, включающий 46 аминокислотных остатков (с 39 по 84 аминокислотную позицию предшественника), из которых для проявления антимикробной активности имеет значение последовательность только из 18 N-концевых аминокислот [16–18]. Эндолизин стафилококкового бактериофага K способен лизировать живые клетки стафилококков, обладающих мультирезистентной устойчивостью к антибиотикам. Белок включает три домена, из которых только N-концевой CNAP-домен длиной 165 аминокислотных остатков проявляет литическую активность и, следовательно, представляет собой активную функциональную единицу эндוליзина бактериофага K [19; 20].

Таким образом, для получения активного гибридного антимикробного белка путем экспрессии в бактериях необходимо убрать из состава структурных частей эукариотического и вирусного генов все перечисленные необязательные элементы (последовательности ДНК, кодирующие сигнальную, пропептидную части эскулентина и два нефункциональных домена эндוליзина K) и поставить их под регуляторные элементы *E. coli*. С использованием полимеразной цепной реакции проводили слияние соответствующих участков эукариотического и фагового генов.

На основе нуклеотидной последовательности гена Эскулентина-1b из базы данных GenBank [21] сконструировали пару праймеров, представленных в таблице 1, для синтеза гена, детерминирующего активную часть пептида. Ген, модифицированный для экспрессии в клетках *E. coli*, обозначили как *esc-C*, а кодируемый им белок как Эскулентин-С.

Таблица 1 – Характеристика праймеров для синтеза гена *esc-C*

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Длина, н	T _m отжига, °C	T _m шпилек, °C
EscFuC-1	gagcatatg ggcattttctccaaattggccgggaaaaagcttaaaaatt gctcataagcggcctcaagaatgtaggcaaggggtggc cta	93	51,4	42,8
EscFuC-2	gactgcag cta acattcaccttaatttacaacctgcaatgctatgccag tccgaccacgct cta gaccaacttctctgctac	86	51,4	41,5

Примечание: серым выделена область перекрывания праймеров; рамками выделены добавленные или замененные кодоны; **catatg** – сайт рестрикции для эндонуклеазы *Nde* I со стартовым кодоном **atg**.

Ген *esc-C* размером 138 пар нуклеотидов синтезировали с использованием данной пары праймеров посредством ПЦР при следующих параметрах: 94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 15 с, 50 °C – 15 с, 72 °C – 10 с (10 циклов); 72 °C – 1 мин (1 цикл).

Белок Эскулентин-С, детерминируемый синтезированным геном, является функциональным аналогом Эскулентина-1b, поскольку за исключением одной аминокислотной замены, оба пептида характеризуются одинаковыми первичными структурами, физико-химическим параметрами, в частности, они имеют расчетную молекулярную массу 5 кДа и одинаковые значения изоэлектрических точек (pI) – 9,6 [16].

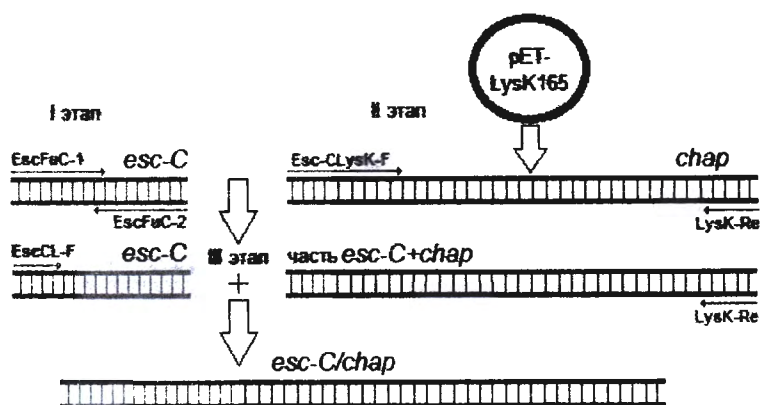
При помощи праймеров, характеристика которых представлена в таблице 2, получали химерные генетические последовательности с такой ориентацией генов, при которой кодируемые ими фьюжн-белки содержали АМП Эскулентин-С или на N-, или на C-конце СНАР-домена антистафилококкового белка. Ген, детерминирующий синтез СНАР-домена, обозначили как *chap*. Данный ген клонирован в составе плазмиды pET-LysK165, любезно предоставленной научным сотрудником НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ С.Г. Голенченко, за что мы выражаем ему искреннюю благодарность.

Таблица 2 – Характеристика праймеров для синтеза гибридных генов *esc-C/chap* и *chap/esc-C*

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Длина, н	T _m слева, °C	T _m справа, °C	T _m шпилек, °C
Концевые праймеры					
EscCL-F	gagcatatg ggcattttctccaaattg	27	–	53,0	35
EscC-Re	ggggaatt ctattta acattcacctttaattttacaacc	39	–	54,4	35,5
LysK-F	gcacatatg gctaaaaaccaggctg	25	–	56,1	27,7
LysK-Re	gagaattctattta agctttaaccgggatttcg	32	–	57,5	20,9
Праймеры для слияния генов					
EscCLysK-F	ataaagggtgaatg ctatg gctaaaaaccag	30	36,8	36,1	25,4
LysKEscCL-F	atcccggttaaagc ctatggc cattttctcc	30	46,5	45,4	44

Примечание: добавленные или замененные кодоны выделены рамками; **gag**, **ggg**, **gca**, **ga**, – навески, **catatg** – сайт рестрикции для эндонуклеазы *Nde* I со стартовым кодоном **atg**; **gaattc** – сайт рестрикции для эндонуклеазы *Eco* RI; **cta**, **tta** – стоп-кодоны.

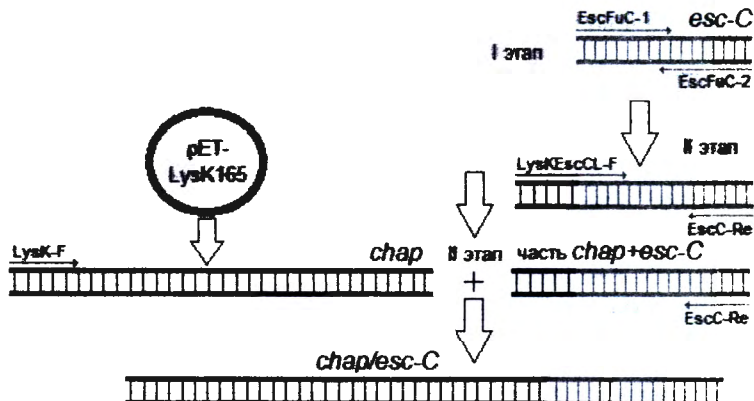
На рисунке 1 изображена схема получения гибридного гена *esc-C/chap*, кодирующего белок Эскулентин-С/СНАР-домен, в котором эскулентин находится на N-конце гибридной молекулы. Используя плазмиду pET-LysK165 в качестве матричной ДНК, в процессе ПЦР получали ген *chap* с участком гена *esc-C* на 5'-конце. Далее ПЦР-продукт смешивали с ранее полученным геном Эскулентина-С. За счет комплементарных участков гена *esc-C* фрагменты ДНК отжигались друг на друге, и в присутствии концевых праймеров амплифицировался целевой гибридный ген. Параметры циклов амплификации: 94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 55 °C – 30 с, 72 °C – 40 с (30 циклов); 72 °C – 7 мин (1 цикл).



Пояснения: EscFuC-1, EscCLysK-F; EscCL-F – прямые праймеры, EscFuC-2, LysK-Re – обратные праймеры.

Рисунок 1 – Схема получения гибридного гена *esc-C/chap*, кодирующего белок Эскулентин-С/СНАР-домен

При синтезе гибридного гена *chap/esc-C*, кодирующего белок СНАР-домен/Эскулентин-С, в котором Эскулентин-С находится на С-конце гибридной молекулы, сначала при помощи ПЦР получали последовательность гена *esc-C* с участком гена *chap* на 5'-конце, затем смешивали ПЦР-продукт и плазмиду pET-LysK165. За счет комплементарных участков гена *chap* ПЦР-продукт отжигался на плазмиде pET-LysK165, и при участии концевых праймеров амплифицировался целевой гибридный ген (рисунок 2). Параметры циклов амплификации: 94 °С – 5 мин (1 цикл); 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин 20 с (30 циклов); 72 °С – 7 мин (1 цикл).

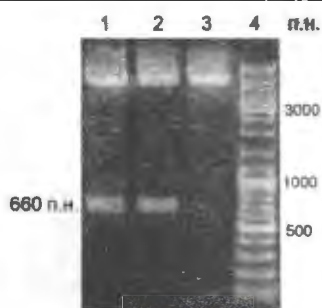


Пояснения: EscFuC-1, LysKEscCL-F, LysK-F – прямые праймеры; EscFuC-2, EscC-Re – обратные праймеры.

Рисунок 2 – Схема получения гибридного гена *chap/esc-C*, кодирующего белок СНАР-домен/Эскулентин-С

Синтезированные таким образом гибридные гены *esc-C/chap*, *chap/esc-C* размером 660 п.н. клонировали в составе вектора для экспрессии pET-24b(+) [22] по сайтам рестрикции *Nde* I и *Eco* RI. Рекombинантными плазмидами трансформировали клетки штамма *E. coli* XL-1 Blue. Отбор трансформантов проводили ПЦР-анализом. Далее из клонов, содержащих гены *esc-C/chap* и *chap/esc-C*, выделяли соответствующие плазмидные ДНК и подвергали их рестрикционному анализу, результаты которого представлены на рисунке 3.

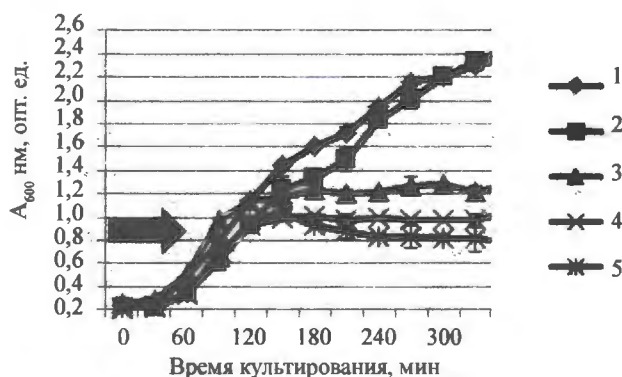
После секвенирования по методу Сэнгера клонированных гибридных генов, рекомбинантными плазмидами трансформировали клетки штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-R1PL, предназначенного для получения гетерологичных белков в бактериальных клетках.



Пояснения: 1 – плаزمида pET, содержащая ген *esc-C/chap*; 2 – плазмида pET, содержащая ген *chap/esc-C*; 3 – плазмида pET-24b(+), обработанная рестриктазами *Nde* I и *Eco* RI; 4 – маркер молекулярного веса Fermentas SM0333.

Рисунок 3 – Рестрикционный анализ рекомбинантных плазмид

В целях изучения особенностей биосинтеза эскулентина строили кривые роста на основе данных по оптической плотности культур бактерий *E. coli* в условиях индукции экспрессии генов. Отрицательным контролем в эксперименте выступал штамм-продуцент гибридного белка Эскулентин-С/СНАР-домен без индукции, положительным контролем – проиндуцированный штамм-продуцент СНАР-домена (рисунок 4). В результате эксперимента установлено, что неиндуцированная культура штамма-продуцента белка Эскулентин-С/СНАР-домен характеризуется стандартными параметрами роста (кривая 1). Клетки штамма, в которых накапливается СНАР-домен бактериофага К (кривая 2), продолжают накапливать биомассу практически в той же динамике, что и штамм без индукции. Однако в индуцированных культурах, плазмиды которых содержат гибридные гены, а также индуцированной культуре штамма-продуцента Эскулентина-1b параметры роста резко меняются.



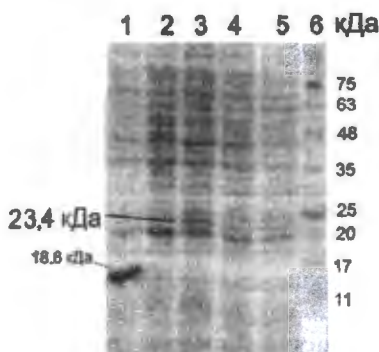
Пояснения: 1 – Эскулентин-С/СНАР-домен (без ИПТГ, отрицательный контроль); 2 – СНАР-домен (0,5 ммоль/л ИПТГ, положительный контроль); 3 – Эскулентин-1b (0,5 ммоль/л ИПТГ); 4 – СНАР-домен/Эскулентин-С (0,5 ммоль/л ИПТГ); 5 – Эскулентин-С/СНАР-домен (0,5 ммоль/л ИПТГ). Стрелкой обозначен момент добавления ИПТГ при $A_{600} \approx 1$.

Рисунок 4 – Влияние биосинтеза АМП Эскулентина на рост клеток-продуцентов

Практически сразу после добавления индуктора в культуру клеток штамма-продуцента Эскулентина-1b накопление биомассы останавливается (кривая 3). Интенсивность роста культуры, в клетках которой синтезируется белок СНАР-домен/Эскулентин-С, после добавления в среду ИПТГ также значительно не увеличивается (кривая 4), но при накоплении в клетках белка Эскулентин-С/СНАР-домен (кривая 5) уже через 2 ч после добавления индуктора наблюдается уменьшение числа клеток.

Через 4 ч после индукции электрофоретически анализировали суммарные клеточные белки исследуемых штаммов (рисунок 5). В собранных клетках индуцированных культур

обнаруживается белок в концентрации до 8 % от общего клеточного белка с молекулярной массой 23,4 кДа (дорожка 3), соответствующий по массе фьюжн-белку Эскулентин-С/СНАР-домен [16]. В то же время в значительно большем количестве (до 30 % от общего клеточного белка) синтезируется СНАР-домен массой 18,6 кДа (дорожка 1).

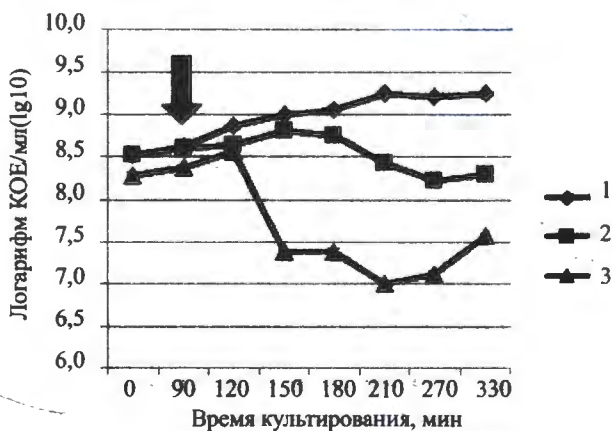


Пояснения: 1 – СНАР-домен (0,5 ммоль/л ИПТГ, положительный контроль); 2 – Эскулентин-С/СНАР-домен (без ИПТГ, отрицательный контроль); 3 – Эскулентин-С/СНАР-домен (0,5 ммоль/л ИПТГ); 4 – СНАР-домен/Эскулентин-С (0,5 ммоль/л ИПТГ); 5 – Эскулентин-1b (0,5 ммоль/л ИПТГ); 6 – белки-стандарты молекулярных масс Blue wide Range Protein Ladder (Cleaver Scientific Ltd).

Рисунок 5 – Электрофоретический анализ суммарных клеточных белков штаммов-продуцентов *E. coli* через 4 ч после индукции

В связи с выявлением нестандартных кривых роста штаммов-продуцентов гибридных белков целесообразно было определить количество жизнеспособных клеток чашечным методом Коха с целью подтверждения токсического эффекта, оказываемого эскулентином на бактериальные клетки. Контрольными точками являлись, соответственно, 0, 90, 120, 150, 180, 210, 270, 330 мин культивирования штаммов-продуцентов. В качестве положительного контроля проводили высеv клеток-продуцентов СНАР-домена. Результаты эксперимента представлены на рисунке 6.

На рисунке 6 видно, что число жизнеспособных клеток штамма-продуцента белка СНАР-домен/Эскулентин-С без индукции продолжает увеличиваться (кривая 1), штамма-продуцента белка эскулентина-1b постепенно уменьшается (кривая 2), а штамма-продуцента белка Эскулентин-С/СНАР-домен через 2 ч после начала индукции уменьшается с 10^8 /мл до 10^7 /мл (кривая 3), что подтверждает гибель клеток, в которых экспрессируется Эскулентин-С.



Пояснения: 1 – СНАР-домен (0,5 ммоль/л); 2 – Эскулентин-1b (0,5 ммоль/л ИПТГ); 3 – Эскулентин-С/СНАР-домен (0,5 ммоль/л ИПТГ). Стрелкой обозначен момент добавления ИПТГ при $A_{600} \approx 1$.

Рисунок 6 – Логарифмическая зависимость числа жизнеспособных клеток штаммов-продуцентов белков от времени культивирования

Важно подчеркнуть, что после индукции экспрессии генов, детерминирующих синтез Эскулентина-1b и химерных белков, проявляется токсическое воздействие пептида на клетки штаммов-продуцентов, которое выражается в бактериостатическом либо в бактериолитическом эффекте. При этом чем выше уровень экспрессии генов и уровень накопления соответствующих белковых продуктов, тем сильнее проявляется цитотоксическая активность эскулентина в отношении клеток-продуцентов. Выяснить, сохраняет ли СНАР-домен антистафилококковую активность в составе химерного белка, можно путем инкубирования клеточного лизата штамма-продуцента белка Эскулентин-С/СНАР-домен или хроматографически очищенного фьюжн-белка с живыми клетками *S. aureus* с целью выявления падения оптической плотности тест-культуры и уменьшения КОЕ, однако количество накапливаемого клетками белка Эскулентин-С/СНАР-домен для этого оказалось недостаточно. В качестве решения проблем, возникающих при получении эскулентина, целесообразно создание химерного белка, образующего тельца включения, в котором последовательность пептида будет пришта к более крупному белку, что позволит эскулентину «спрятаться» в процессе сворачивания химерного белка; либо к белку с высоким отрицательным зарядом молекулы для компенсации общего положительного заряда АМП.

Заключение. Таким образом, в клетках бактерий *E. coli* в составе стабильно наследуемого вектора клонированы гибридные гены, кодирующие фьюжн-белки, состоящие из функционального аналога АМП Эскулентина-1b – Эскулентина-С и СНАР-домена эндолизина стафилококкового бактериофага К. Синтез белка Эскулентин-С/СНАР-домен, в котором пептид находится на С-конце гибридной молекулы, не выявлен, но установлено накопление в бактериальных клетках белка СНАР-домен/Эскулентин-С, в котором пептид находится на N-конце гибридного белка. Однако при синтезе даже небольшого количества белка СНАР-домен/Эскулентин-С (до 8 % от общего клеточного белка) наблюдается гибель части популяции штамма-продуцента во время индукции экспрессии соответствующего гибридного гена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gennaro, R. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides / R. Gennaro, M. Zanetti // *Biopolymers*. – 2000. – Vol. 55, No. 1. – P. 31–49.
2. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores / L. Yang [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2001. – Vol. 81, No. 3. – P. 1475–1485.
3. Zorko, M. Production of Recombinant Antimicrobial Peptides in Bacteria / M. Zorko, R. Jerala // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 618. – P. 61–76.
4. Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta* / M. Simmaco [et al.] // *FEBS Letters*. – 1993. – Vol. 324, No. 3. – P. 159–161.
5. Fauna Europaea [Electronic resource]. – Berlin, Germany, 2000. – Mode of access : <http://www.faunaeur.org/>. – Date of access : 25.11.2014.
6. Совгир, Н. В. Клонирование и экспрессия гена антимикробного белка эскулентина-1b (*Rana esculenta*) в клетках бактерий *Escherichia coli* / Н. В. Совгир, В. А. Прокулевич // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2011. – Т. 6, ч. 1. – С. 70–75.
7. Expression and activity of cyclic and linear analogues of esculentin-1, an anti-microbial peptide from amphibian skin / D. Ponti [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 1999. – Vol. 263, No. 3. – P. 921–927.
8. Совгир, Н. В. Особенности экспрессии гибридных генов, созданных на основе последовательностей ДНК гена антимикробного пептида эскулентина лягушки и гена антивирусного белка бычьего альфа-интерферона / Н. В. Совгир, М. И. Потапович, В. А. Прокулевич // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2013. – Т. 8, ч. 1. – С. 207–215.
9. Голенченко, С. Г. Клонирование LYS-K и его СНАР домена в клетках *E. coli* / С. Г. Голенченко, В. А. Прокулевич // Биология – наука XXI века : сб. тезисов 17 Междунар. Пушкинской школы-конференции молодых ученых, Пушкино, 21–26 апр. 2013 г. / Пушкинский науч. центр РАН, Пушкинский гос. ун-т ; редкол.: А. И. Мирошников [и др.]. – Пушкино, 2013. – С. 329–330.
10. McPherson, M. J. PCR / M. J. McPherson, S. G. Moller. – Oxford : BIOS Scientific Publishers Ltd, 2000. – 276 p.
11. OligoAnalyzer tool [Electronic resource] // Integrated DNA Technologies, Inc. – Coralville, USA, 2005. – Mode of access : <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer/>. – Date of access : 10.05.2014.
12. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М. : Мир, 1984. – 480 с.

13. Лысак, В. В. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям, контроль самостоятельной работы студентов / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова. – Минск : БГУ, 2002. – 97 с.
14. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature (Lond.)*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
15. ProtParam tool [Electronic resource] // Swiss Institute of Bioinformatics. – Switzerland, 2014. – Mode of access : <http://web.expasy.org/protparam/>. – Date of access : 15.09.2015.
16. Antimicrobial peptides from skin secretion of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNA encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides / M. Simmaco [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, No. 16. – P. 11956–11961.
17. UniProt Knowledgebase (UniProtKB) [Electronic resource] // Universal Protein Resource. – 2002. – Mode of access : <http://www.uniprot.org/uniprot/>. – Date of access : 11.12.2014.
18. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: linking structure to function? / E. F. Haney [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1788, No. 8. – P. 1639–1655.
19. Potential of the Polyvalent Anti-*Staphylococcus* Bacteriophage K for Control of Antibiotic-Resistant *Staphylococci* from Hospitals / S. O'Flaherty [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71, No. 4. – P. 1836–1842.
20. Phage Lysin LysK can be truncated to its chap domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant *Staphylococci* / M. Horgan [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75, No. 3. – P. 872–874.
21. Nucleotide Database [Electronic resource] // National Center for Biotechnology Information. – USA, 2014. – Mode of access : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. – Date of access : 12.10.2014.
22. pET Manual system [Electronic resource] // Harvard Medical School. – Boston, USA, 2005. – Mode of access : http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf/. – Date of access : 02.06.2015.

Поступила в редакцию 30.12.15.

“Vesnik of Yanka Kupala State University of Grodno. Series 5. Economics. Sociology. Biology”

Vol. 6, No. 1, 2016, pp. 150–159

© Yanka Kupala State University of Grodno, 2016

Fusion of genes of coding for frog antimicrobial peptide esculentin and staphylococcal bacteriophage K endolysin of CHAP domain to produce the multifunctional antimicrobial protein

N. V. Sovgir¹, V. A. Prokulevich²

¹ *Belarusian State University (Belarus)*

Nezavisimosti Ave., 4, 220030, Minsk, Belarus; e-mail: sovgirmv@inbox.ru

² *Belarusian State University (Belarus)*

Nezavisimosti Ave., 4, 220030, Minsk, Belarus; e-mail: prokulevich@mail.ru

Abstract. Objects of the study are chimeric genes coding for recombinant antimicrobial fusion proteins, consisting of frog (*Rana esculenta* L., 1758) antimicrobial peptide esculentin with broad spectrum of activity and the Myoviridae family staphylococcal bacteriophage K endolysin of the CHAP domain. The aim of the study is to investigate the expression of hybrid DNA sequences encoding the chimeric proteins in *E. coli* cells. These proteins contain esculentin at the N-, or C-terminus of the CHAP domain of amino acid sequence. Primers to fuse of antimicrobial peptide esculentin and staphylococcal bacteriophage K endolysin of CHAP domain genes are developed. Two hybrid genes are cloned in *E. coli* cells and sequenced. The subsequent analysis of bacterial growth parameters and electrophoretic data for total cellular proteins of corresponding strains revealed, that the expression of hybrid genes leads to the intracellular accumulation of fusion protein with esculentin at the N-terminus. Synthesis of fusion proteins in bacteria is accompanied by a decrease in viability and partial lysis of the host-cells. Applications: biotechnology, molecular biology, pharmaceuticals.

Keywords: antimicrobial peptides, esculentin, staphylococcal bacteriophage K endolysin of CHAP domain, fusion protein, expression, CFU (colony forming unit).

References

1. Gennaro R., Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 2000, vol. 55, No. 1, pp. 31–49.
2. Yang L. [et al.]. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical Journal*, 2001, vol. 81, No. 3, pp. 1475–1485.
3. Zorko M., Jerala R. Production of Recombinant Antimicrobial Peptides in Bacteria. *Methods Mol. Biol.*, 2010, vol. 618, pp. 61–76.

4. Simmaco M. [et al.]. Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta*. *FEBS Letters*, 1993, vol. 324, No. 3, pp. 159-161.
5. Fauna Europaea. Berlin, Germany, 2000 [Electronic resource].
6. Sovgir N. V., Prokulevich V. A. Cloning and expression of antimicrobial peptide esculentin-1b gene (*Rana esculenta*) in *Escherichia coli* cells [Клонирование и экспрессия гена антимикробного пептида эскулентина-1b (*Rana esculenta*) в клетках бактерии *Escherichia coli*]. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya "Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekuliarnye osnovy funktsionirovaniia biosistem"*, 2011, vol. 6, No. 1, pp. 70-75.
7. Ponti D. [et al.]. Expression and activity of cyclic and linear analogues of esculentin-1, an anti-microbial peptide from amphibian skin. *European Journal of Biochemistry*, 1999, vol. 263, No. 3, pp. 921-927.
8. Sovgir N. V., Potapovich M. I., Prokulevich V. A. Expression features of hybrid genes based on DNA sequences of frog antimicrobial peptide esculentin gene and bovine antiviral protein interferon alpha gene [Osobennosti ekspressii gibridnykh genov, sozdannykh na osnove posledovatel'nostei DNK gena antimikrobnogo peptida eskulentina liagushki i gena antivirushnogo belka bych'ego al'fa-interferona]. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya "Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekuliarnye osnovy funktsionirovaniia biosistem"*, 2013, vol. 8, No. 1, pp. 207-215.
9. Golenchenko S. G., Prokulevich V. A. Cloning of LYS-K and its CHAP domain in *E. coli* cells [Клонирование LYS-K и его CHAP домена в клетках *E. coli*]. *Biologiya – nauka XXI veka : sbornik tezisov 17 Mezhdunar. Pushchinskoi shkoly-konferentsii molodykh uchenykh*, Pushchino, 21-26 apr. 2013 g. ; ed. board: A. I. Miroshnikov [et al.]. Pushchino, 2013, pp. 329-330.
10. McPherson M. J., Moller S. G. PCR. Oxford, 2000, 276 p.
11. OligoAnalyzer tool. Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, USA, 2005 [Electronic resource].
12. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Genetic engineering methods. Molecular cloning [Metody geneticheskoi inzhenerii. Molekul'iarnoe klonirovanie]. Moscow, 1984, 480 p.
13. Lysak V. V., Zheldakova R. A. Microbiology: guidelines for laboratory work, control of student's individual work [Mikrobiologiya: metodicheskie rekomendatsii k laboratornym zaniatiyam, kontrol' samostoiatei'noi raboty studentov]. Minsk, 2002, 97 p.
14. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lons.)*, 1970, vol. 227, pp. 680-685.
15. ProtParam tool. Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland, 2014 [Electronic resource].
16. Simmaco M. [et al.]. Antimicrobial peptides from skin secretion of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNA encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, No. 16, pp. 11956-11961.
17. UniProt Knowledgebase (UniProtKB). Universal Protein Resource, 2002 [Electronic resource].
18. Haney E. F. [et al.]. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: linking structure to function? *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, vol. 1788, No. 8, pp. 1639-1655.
19. O'Flaherty S. [et al.]. Potential of the Polyvalent Anti-Staphylococcus Bacteriophage K for Control of Antibiotic-Resistant Staphylococci from Hospitals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, vol. 71, No. 4, pp. 1836-1842.
20. Horgan M. [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, pp. 872-874.
21. Nucleotide Database. National Center for Biotechnology Information, USA, 2014 [Electronic resource].
22. pET Manual system. Harvard Medical School, Boston, USA, 2005 [Electronic resource].



Уважаемые авторы!

Более подробно требования к оформлению материалов, а также условия для
принятия материалов см. на сайте журнала

<http://vesnik.grsu.by>