

На правах рукописи

Метелев Михаил Васильевич

**Структура и видоспецифичность действия гомолога микроцина В из
*Pseudomonas syringae***

специальность 03.01.07 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2013

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Научный руководитель:

Северинов Константин Викторович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Четверина Елена Владимировна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук

Говорун Вадим Маркович, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор, заместитель директора ФГУ НИИ физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук.

Защита диссертации состоится _____ 2013 года в ____ на заседании Диссертационного совета Д 002.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан _____ 2013 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Распространение лекарственной устойчивости среди патогенных штаммов различных микроорганизмов значительно сужает спектр доступных антибиотиков, в связи с этим поиск и изучение новых антибиотиков является крайне актуальной задачей.

Данная работа посвящена исследованию гомолога ингибитора ДНК-гиразы микроцина В из *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* B076. Микроцин В – пептидный антибиотик, продуцируемый штаммами *E. coli*, – является оружием в конкурентной борьбе за выживание между близкородственными видами микроорганизмов. Мишенью микроцина В является ДНК-гираза (топоизомераза типа IIa) – фермент, ответственный за поддержание отрицательной сверхспирализации ДНК бактерий. Известно, что микроцин В стабилизирует двухцепочечный разрыв в ДНК, образующийся во время работы ДНК-гиразы, накопление двухцепочечных разрывов приводит к нарушению процесса репликации и индукции SOS ответа. К сожалению, детальный механизм действия микроцина В и его сайт связывания с ДНК-гиразой в настоящий момент не известны. Изучение механизма ингибирования ДНК-топоизомераз важно для понимания того, как функционируют эти ферменты, а также для разработки новых лекарственных препаратов. В настоящее время антибиотики из группы фторхинолонов, мишенью которых является ДНК-гираза, успешно применяются в клинической практике. Широкое использование фторхинолонов в немалой степени связано с пониманием механизма действия этих антибиотиков.

Микроцин В является рибосомально-синтезируемым пост-трансляционно-модифицируемым пептидом и относится к группе тиазол-оксазол модифицированных микроцинов (ТОММ). Биоинформатические и биохимические данные последних лет свидетельствуют о широкой распространенности ТОММ в природе, и многие из этих соединений представляют интерес с точки зрения разработки новых лекарственных препаратов. Поиск и исследование биологической активности неизученных ТОММ является важной научной задачей.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение гомолога микроцина В из *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* B076.

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

1. Получить и очистить гомолог микроцина В из *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* B076;

2. Определить его химическую структуру (характер циклизации);
3. Исследовать антибактериальную активность полученного вещества;
4. Выявить и проанализировать опероны бактерий рода *Pseudomonas*, гомологичные *mcb* оперону *P. syringae*.

Научная новизна и практическая значимость работы

В работе были обнаружены опероны, гомологичные *mcb* оперону *E. coli*, в геномах нескольких патоваров растительных патогенов *Pseudomonas syringae*. Было показано, что при гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* с оперона *mcb Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* B076 производится два варианта *P. syringae* микроцина (*Ps*-МсВ). Было выявлено, что микроцин из *E. coli* (*Ec*-МсВ) и *Ps*-МсВ обладают разной специфичностью действия. *Ec*-МсВ не активен в отношении бактерий рода *Pseudomonas*, в то время как *Ps*-МсВ является эффективным ингибитором роста таких бактерий. Важно отметить, что *Ps*-МсВ способен ингибировать рост патогенного для человека штамма *P. aeruginosa* PAO1. Также было показано, что специфичность действия микроцинов не зависит от специфичности взаимодействия с ДНК-гиразой и, по-видимому, определяется эффективностью транспорта внутрь клетки. Было продемонстрировано, что три немодифицированные аминокислоты в центральной области микроцина *Ps*-МсВ отвечают за специфичность действия в отношении штаммов рода *Pseudomonas*. Полученные результаты открывают новые возможности для конструирования пептидов, подобных микроцину В *E. coli*, но с измененным спектром действия.

В геномах различных бактерий рода *Pseudomonas* были идентифицированы опероны, гомологичные оперону *mcb E. coli*. Показано, что эти опероны кодируют вещества, способные ингибировать рост бактерий, но действие которых отлично от действия микроцина В *E. coli* и *P. syringae*. Дальнейшее изучение этих веществ перспективно с точки зрения поиска новых антибиотиков.

Публикации и апробация работы

По результатам диссертационной работы было опубликовано 4 печатные работы, в том числе 1 статья в международном рецензируемом журнале и 3 тезиса конференций. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: 1) «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», 14-17 ноября, 2011, Москва, Россия; 2) «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», 22-24 ноября, 2012, Казань, Россия (международная конференция); 3) Конгресс Федераций

европейских биохимических обществ 2013 «Биологические механизмы», 6-11 июля, 2013, Санкт-Петербург, Россия (международная конференция).

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов работы, заключения, выводов, благодарностей и списка использованной литературы. Работа изложена на 96 страницах машинописного текста, включая 29 рисунков и 2 таблицы. Список цитируемых литературных источников включает 121 наименование.

II. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Микроцин В – антибиотик пептидной природы, синтезируемый некоторыми штаммами *E. coli*. Клетки *E. coli*, которые продуцируют микроцин В, содержат оперон из 7 генов (*mcbABCDEFG*). Ген *mcbA* кодирует пептид-предшественник, гены *mcbB*, *mcbC* и *mcbD* кодируют субъединицы ферментативного комплекса ВCD. Гены *mcbE* и *mcbF* ответственны за транспорт созревшего микроцина из клетки. Последний ген *mcbG* кодирует белок, который необходим для защиты от действия антибиотика внутриклеточной мишени микроцина – ДНК-гиразы продуцирующих микроцин клеток. Пептид-предшественник микроцина В имеет длину 69 аминокислот, из которых 26 N-концевых остатков составляют лидерную последовательность, а оставшиеся 43 аминокислоты образуют модифицируемый пептид. Ферментативный комплекс McbBCD специфически узнает лидерную последовательность, а затем вносит тиазольные и оксазольные гетероциклы в пептид McbA. Модификации подвергаются остатки серинов и цистеинов, которым предшествует глицин. Основная форма микроцина В, которая экспортируется из клетки, содержит 4 оксазольных и 4 тиазольных гетероцикла. Помимо одиночных гетероциклов в последовательности микроцина В есть оксазол-тиазольный и тиазол-оксазольный бис-гетероциклы, образующиеся в результате модификации трипептидов GlySerCys и GlyCysSer (сайты А и Б на рис. 1). В последовательности пептида-предшественника есть еще один трипептид GlyCysSer (сайт С на рис. 1), однако, производимый микроцин, как правило, содержит в этом

месте не бис-гетероцикл, а либо отдельный тиазольный гетероцикл, либо тиазольный гетероцикл и сложноэфирную связь, соединяющую аминокислотные остатки 51 и 52.

До последнего времени, микроцин В из *E. coli* оставался единственным представителем ТОММ, ингибирующим ДНК-гиразу.

Идентификация *mcb* оперонов *P. syringae*

В базе данных NCBI nr при помощи программы BLASTp был проведен поиск (со стандартными параметрами) аминокислотных последовательностей схожих с последовательностью белка McbB (P23184), компонента синтетазы микроцина В. Был обнаружен ряд последовательностей с высоким уровнем сходства (значение e-value менее 10^{-41}). Найденные последовательности были обнаружены в геномах растительных патогенов *Pseudomonas syringae* патоваров *glycinea* и *aesculi*.

Анализ областей генома в окрестностях обнаруженных последовательностей выявил наличие полного набора генов, гомологичных генам оперона микроцина В *E. coli* (рис. 1), в том числе и ген, кодирующий предположительный пептид-предшественник. Предсказанный пептид-предшественник McbA из *P. syringae* содержит аналогичный пептиду McbA из *E. coli* набор GlySer и GlyCys дипептидов, а так же трипептиды GlySerCys и GlyCysSer в сайтах А и В, соответственно. На месте сайта С, в котором *E. coli* McbA содержит трипептид GlyCysSer, в последовательности *P. syringae* McbA находятся аминокислоты GlyCysGly. Как следствие, в этом сайте может образовываться только один тиазольный гетероцикл.

Последовательности пептидов-предшественников, закодированные в различных патоварах, идентичны за исключением позиции 60, в которой у патоваров *glycinea* находится треонин, а у патовара *aesculi* – пролин. Оперон *mcb* встречается не во всех штаммах *P. syringae*: штаммы *P. syringae* pv. *tomato* str. DC3000, pv. *syringae* str. B728a и pv. *phaseolicola* str. 1448A не содержат этого оперона.

Исследование продукции вещества, подобного микроцину В, штаммом *P. syringae* pv. *glycinea* B076

Для штамма *P. syringae* pv. *glycinea* B076, содержащего оперон, гомологичный оперону *mcb* *E. coli*, была проанализирована способность производить вещество, подобное микроцину В. Анализируемые клетки выращивались на чашках с агаризованной средой при различных условиях (богатая среда LB, минимальные среды M9 и 925, pH 5-7.5, температура - от 4 до 30 °C, время роста - от 24 до 100 часов). Поверх чашек с выросшими клетками *P. syringae* pv. *glycinea* B076 высевался газон тестируемых бактерий - *E. coli* BL21 (DE3) и DH5α и *P. syringae* B728, DC3000 и 1448a – и чашки инкубировали в течение 24 часов.

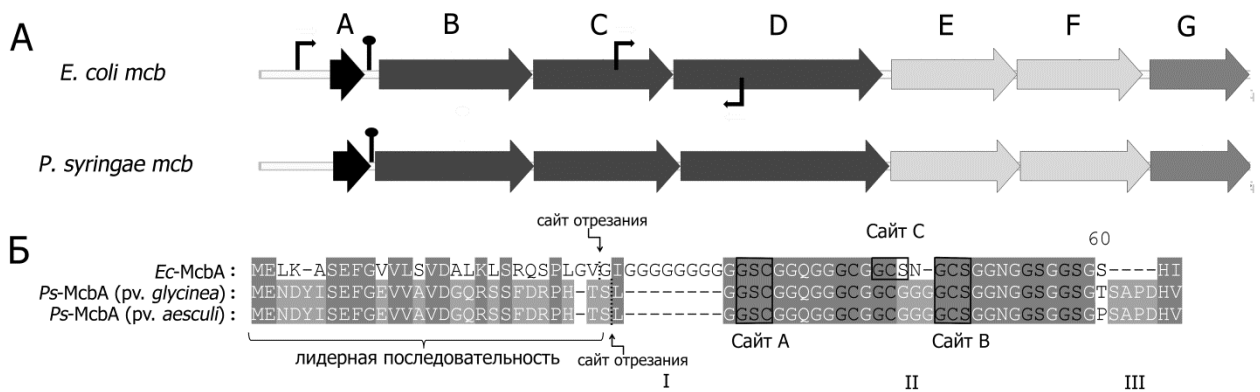


Рис. 1. А. Схемы оперонов *mcbABCDEFG* *E. coli* и *P. syringae*. Гены *mcbBCD* кодируют синтетазу микроцина В; гены *mcbEF* кодируют компоненты транспортера микроцина В; ген *mcbG* кодирует пентапептидный белок, необходимый для устойчивости к микроцину В. Б. Аминокислотное выравнивание продуктов генов *mcbA* из *E. coli* и *P. syringae* патоваров *glycinea* и *aesculi*. Черными буквами обозначены ди- и трипептиды, которые могут участвовать в гетероциклизации. Трипептиды, которые могут участвовать в образовании слитых бис-гетероциклов (сайты А и В), выделены рамкой; сайт С *Ec-McbA* также выделен рамкой. Отмечены место отрезания лидерной последовательности *Ec-McbA* и предположительное место отрезания *P. syringae McbA*. Пептиды-предшественники штаммов *P. syringae* отличаются по 60-й аминокислоте. Римскими цифрами обозначены основные места отличия последовательностей *Ec-McbA* и *Ps-McbA*.

Ни при одном из тестированных условий нам не удалось обнаружить зоны ингибирования роста вокруг клеток штамма *P. syringae* pv. *glycinea* B076. Как и ожидалось, использованный в качестве положительного контроля штамм *E. coli*, продуцирующий микроцин В, ингибировал рост клеток *E. coli* BL21 (DE3) и DH5 α . Интересно, что продуцирующие микроцин В клетки *E. coli* не оказывали эффекта на рост *P. syringae*, которые, очевидно, не чувствительны к микроцину В (см. также ниже). Помимо тестов на биологическую активность были предприняты попытки детектировать продукцию вещества, подобного микроцину В, клетками *P. syringae* pv. *glycinea* B076 методами масс-спектрометрии. Было проведено тестирование экстрактов образцов агаризованной среды, взятых непосредственно вблизи растущих клеток *P. syringae* pv. *glycinea* B076, а также самих клеток на наличие вещества в диапазоне масс от 1000 до 5000 Да (поскольку невозможно точно предсказать массу созревшего вещества, не зная сайта отрезания лидерной последовательности от модифицируемого пептида, если таковой имеется). Клетки *E. coli*, производящие микроцин В, помимо полностью созревшего вещества, содержащего 8

гетероциклов, секретируют наружу продукты с 7 и 6 гетероциклами. Поскольку образование гетероциклов приводит к снижению массы модифицируемого пептида на 20 Да, для масс-спектров препаратов микроцина В *E. coli* характерны серии пиков, отличающихся друг от друга по массе на 20 Да. Анализ масс-спектров клеток *P. syringae* pv. *glycinea* B076 или образцов агаризованной среды, взятых непосредственно поблизости от растущих клеток, не выявил таких характерных серий пиков в указанном диапазоне масс. Несмотря на то, что нам не удалось детектировать продукцию микроцин В-подобного вещества клетками *P. syringae* pv. *glycinea* B076, нами было обнаружено, что гены оперона *mcb* транскрибируются на уровне, сравнимом с уровнем транскрипции важного гена «домашнего хозяйства» *gyrA*.

Гетерологическая продукция *P. syringae* микроцина В в клетках *E. coli*

Поскольку при тестированных условиях роста нам не удалось обнаружить продукцию вещества, подобного микроцину В, была предпринята попытка гетерологической экспрессии *mcb* оперона *P. syringae* в клетках *E. coli*. Полный оперон (*mcbABCDEFG*) был заклонирован в экспрессионный вектор под контроль регулируемого промотора *araBAD*, таким образом, что старт-кодон первого гена оперона (*mcbA*) располагался на оптимальном расстоянии от консенсусной последовательности Шайна-Дальгарно, расположенной в векторе. Клетки *E. coli* BL21(DE3), содержащие вектор с *mcb* опероном, были индуцированы арабинозой для активации транскрипции *mcb* оперона. Для выделения продуцируемых пептидов использовалась процедура, аналогичная выделению микроцина В *E. coli*: клетки, продуцирующие микроцин, лизировались в уксусной кислоте, затем лизат клеток подвергался первичной очистке на C18 картридже, финальной стадией очистки являлась обратнофазная ВЭЖХ [Sinha Roy et. al., 1999]. В качестве контроля использовались клетки *E. coli* BL21 (DE3), содержащие вектор без вставки. На хроматограмме, приведенной на рисунке 2, показаны результаты обратнофазной ВЭЖХ образца из клеток, содержащих плазмиду с *mcb* опероном *P. syringae*.

Масс-спектрометрический анализ выявил, что более ранний хроматографический пик (время элюции 13,5 минут) содержит масс-ион со значением $m/z=2302,8$ [МН+], а так же минорный +20 Да масс-ион со значением $m/z=2322,8$ [МН+]. В более позднем хроматографическом пике был обнаружен мажорный масс-ион со значением $m/z=2822,0$ [МН+] и два минорных масс-иона со значениями $m/z=2842,0$ [МН+] и $2862,0$ [МН+], соответствующие продуктам недоциклизации.

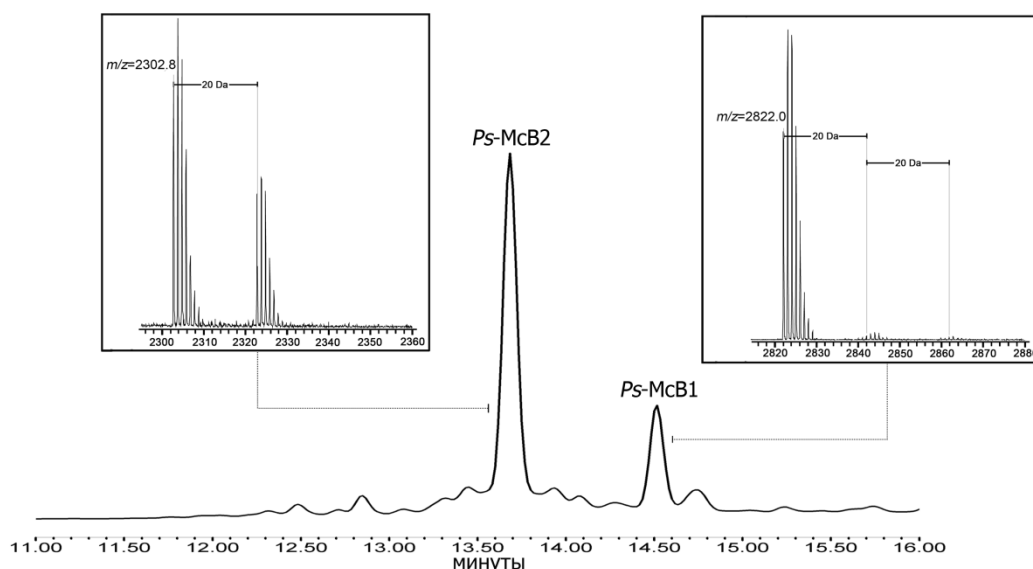
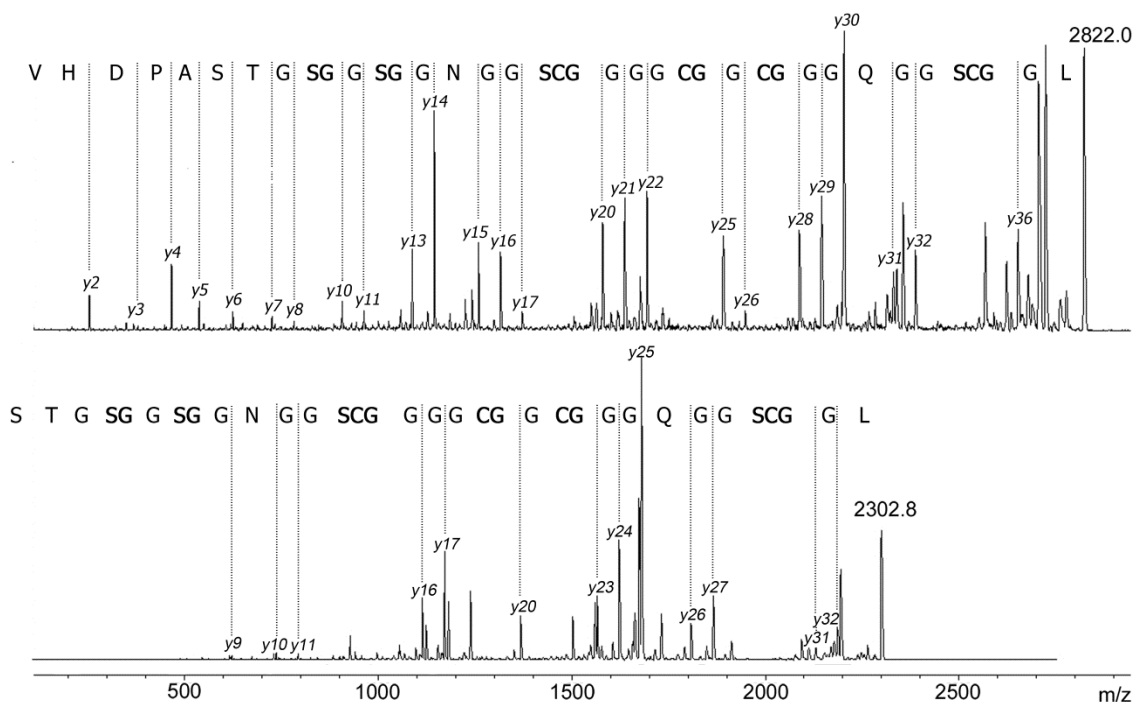


Рис. 2. ВЭЖХ профиль финальной стадии очистки веществ, продуцируемых при гетерологической экспрессии в *E. coli* оперона *mcb* *P. syringae*. Два пика, обозначенные как *Ps*-*McB*1 и *Ps*-*McB*2, отсутствуют в контрольном образце (материале из клеток, содержащих вектор без вставки). В рамках изображены фрагменты MALDI-MS масс-спектров, снятых с материала, полученного при сборе каждой из фракций. Для мажорных масс-ионов, а также для минорных масс-ионов, соответствующих недоциклизованным продуктам реакции гетероциклизации (+20 Да), приведены значения m/z .

МС/МС спектры фрагментации масс-ионов со значениями $m/z=2302,8$ и $2822,0$ приведены на рис. 3А. Анализ спектров фрагментации был произведен с использованием сервиса Mascot MS/MS Ion Search. Представленные на рисунке 3Б структурные формулы пост-трансляционно модифицированных и процессированных *McbA* *P. syringae* согласуются с результатами анализа МС/МС спектров фрагментации. Обе формы модифицированного микроцина *P. syringae*, найденные в двух хроматографических пиках, содержат восемь гетероциклов (4 одиночных тиазольных и оксазольных гетероцикла и два слитых бис-гетероцикла), имеют идентичный N-конец (соответствует Leu^{29} *P. syringae* *McbA*), который возникает после отрезания лидерной последовательности от модифицируемой части, содержащей гетероциклы. Два вещества отличаются только С-концевыми частями. Вещество, обнаруженное в минорном хроматографическом пике, имеет С-конец, соответствующий С-концу предсказанного *P. syringae* *McbA*, данная форма микроцина ниже будет обозначаться как *Ps*-*McB*1. Вещество, обнаруженное в мажорном хроматографическом пике, ниже будет обозначаться как *Ps*-*McB*2, укорочено с С-конца и его последней аминокислотой является Ser^{61} . Далее микроцин В, продуцируемый *E. coli*, будет

обозначаться как *Ec*-Mcb. Ранее было отмечено, что пептид-предшественник McbA штамма *P. syringae* pv. *aesculi* str. NCPPB 3681 содержит пролин в позиции 60, в то время как в штаммах pv. *glycinea* в этой позиции присутствует треонин. На основе экспрессионного вектора, содержащего *mcb* оперон из *P. syringae* pv. *glycinea*, была создана конструкция, в которой в ген *mcbA* была введена мутация, приводящая к аминокислотной замене Thr⁶⁰ на пролин. Клетки *E. coli*, экспрессирующие такой вариант оперона, производят две формы микроцина полностью аналогичные *Ps*-Mcb1 и *Ps*-Mcb2.

А



Б

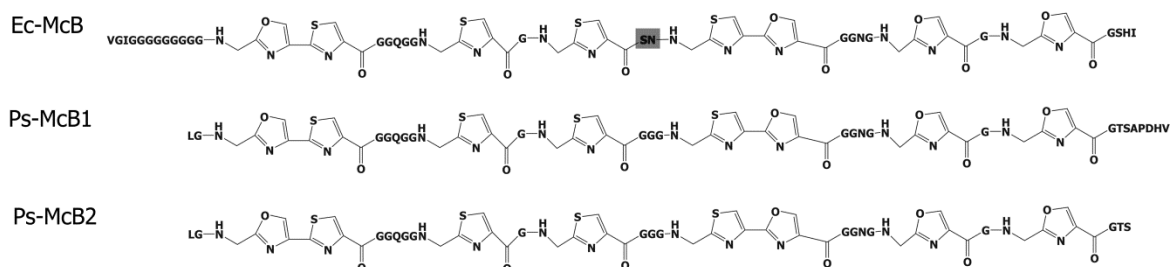


Рис. 3. А. MS/MS спектры фрагментации *Ps*-Mcb1 (сверху) и *Ps*-Mcb2 (снизу). В спектрах присутствуют серии *b*- и *y*-ионов (обозначены только *y*-ионы). *Y*-ионы, соответствующие местам образования тиазольных и оксазольных гетероциклов, отсутствуют (эти связи устойчивы к фрагментации). Б. Структура *Ec*-Mcb и структуры *Ps*-Mcb1 и *Ps*-Mcb2, соответствующие результатам MS/MS анализа.

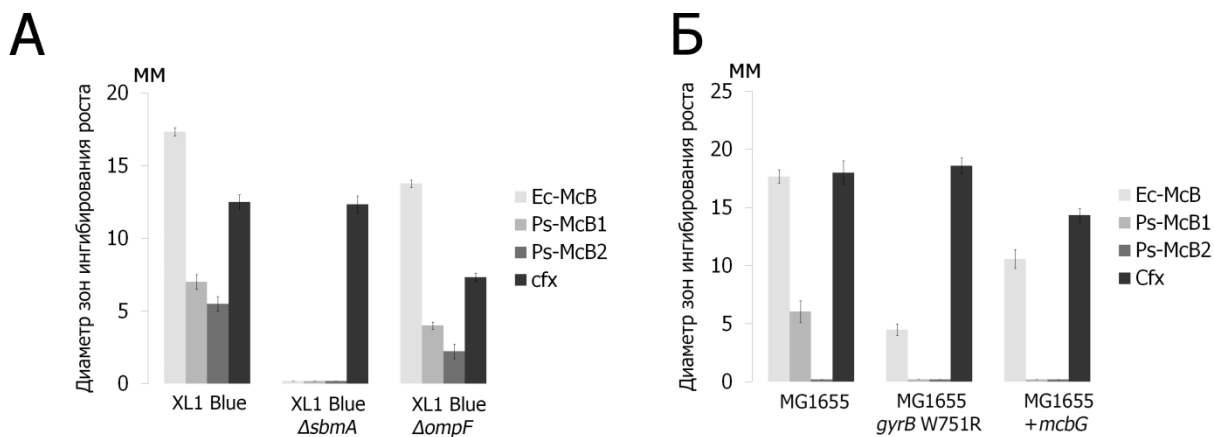


Рис. 4. **А.** 2 мкл раствора, содержащего 50 мкМ концентрации *Ec*-McB, *Ps*-McB1, *Ps*-McB2 или 20 мкМ концентрацию ципрофлоксацина (cfx), было нанесено на поверхность газона клеток *E. coli* XL1 Blue дикого типа или изогенных штаммов, содержащих делецию генов *sbmA* или *ompF*. Диаметр зон ингибирования роста (в мм) измерялся после инкубации при комнатной температуре в течение 16 часов. **Б.** 2 мкл раствора, содержащего 200 мкМ концентрацию *Ec*-McB, *Ps*-McB1, *Ps*-McB2 или 20 мкМ концентрацию ципрофлоксацина, было нанесено на поверхность газона клеток *E. coli* MG1655 дикого типа, производного штамма, несущего мутацию в гене *gyrB* (W751R), или штамма дикого типа, содержащего плазмиду, экспрессирующую ген *mcbG* *E. coli*.

***Ps*-McB1 и *Ps*-McB2 ингибируют рост клеток *E. coli* и действуют на ДНК-гиразу**

Ps-McB1 и *Ps*-McB2 были очищены при помощи ВЭЖХ. С использованием стандартного микробиологического теста (ингибирование роста газона клеток в мягком агаре) была проверена биологическая активность данных веществ в отношении штаммов *E. coli* BL21 (DE3), XL1 Blue и MG1655. *Ps*-McB1 ингибирует рост тестируемых штаммов *E. coli*, однако его активность заметно ниже *Ec*-McB (рис. 4, 6). Несмотря на то, что при концентрациях, используемых в эксперименте, *Ps*-McB2 не ингибирует рост штамма MG1655 (K12 штамм), такой вариант микроцина ингибирует рост *E. coli* BL21 (DE3) и XL1 Blue (также штамм K12). Причина различной чувствительности штаммов *E. coli* к *Ps*-McB (и к *Ec*-McB) в настоящее время неизвестна.

Ec-McB и *Ps*-McB не активны в отношении штамма XL1 Blue, содержащего делецию гена *sbmA*, кодирующего расположенный на внутренней мембране транспортер, который необходим для транспорта *Ec*-McB внутрь клетки (рис. 4A) [Lavina et. al., 1986]. Порин OmpF, расположенный на внешней мембране клеток *E. coli*, участвует в проникновении *Ec*-McB внутрь клетки. Делеция гена *ompF* снижает чувствительность штамма XL1 Blue к обоим микроцинам (*Ec*-McB и *Ps*-McB) и влияет на эффективность действия ципрофлоксацина,

использовавшегося в качестве контроля. Таким образом, можно утверждать, что транспорт *Ec*-MсВ и *Ps*-MсВ в *E. coli* происходит одним и тем же путем.

Ps-MсВ1 не ингибирует рост клеток MG1655, содержащих мутацию в гене, кодирующем В субъединицу ДНК-гиразы (замена W751R, приводящая к устойчивости к *Ec*-MсВ) (рис. 4Б). Экспрессия плазмидной копии гена *mcbG* (закодированного в *mcb* опероне *E. coli* или *P. syringae*) в клетках MG1655 значительно снижает чувствительность к *Ec*-MсВ и делает их полностью устойчивыми к *Ps*-MсВ1 (при тех концентрациях, которые использовались в эксперименте). Эти результаты указывают на то, что внутриклеточной мишенью *Ps*-MсВ, так же как и *Ec*-MсВ, является ДНК-гираза *E. coli*.

Для ответа на вопрос, способен ли *Ps*-MсВ индуцировать SOS ответ в *E. coli*, на основе вектора, использовавшегося для гетерологической экспрессии оперона *mcb* *P. syringae*, были созданы две генетические конструкции. Первая конструкция представляет собой *mcb* оперон *P. syringae*, в котором делегирован ген *mcbG* (кодирует пентапептидный белок, необходимый для защиты ДНК-гиразы от *Ec*-MсВ), во второй конструкции помимо гена *mcbG* делегированы гены *mcbEF*, гомологи которых кодируют транспортер для экспорта *Ec*-MсВ. Плазмидные вектора, содержащие полноразмерный оперон и варианты без генов аутоиммуности, использовались для трансформации клеток репортерного штамма *E. coli* CSH50 *sfiA::lacZ*, в котором экспрессия гена *lacZ* контролируется LexA-зависимым *sfiA* промотором. При индукции SOS ответа в результате накопления двухцепочечных разрывов такие клетки на агаризованной индикаторной среде McConkey образуют окрашенные в фиолетовый цвет колонии. В присутствии арабинозы (индуктора экспрессии *mcb* оперона), клетки CSH50 *sfiA::lacZ*, несущие на плазмиде полноразмерный *P. syringae* *mcb* оперон, образуют колонии белого цвета. Клетки с плазмидой, несущей оперон с генами *mcbABCDEF*, образуют колонии розового цвета, а клетки с плазмидой, несущей оперон с генами *mcbABCD*, формируют колонии фиолетового цвета (рис. 5А). В отсутствие индуктора клетки, несущие все три плазмиды, образовывали колонии белого цвета. Сходные результаты были получены и с клетками CSH50 *sfiA::lacZ*, трансформированными плазмидами на основе *mcb* оперона *E. coli*. Данные результаты указывают на то, что *mcb* оперон *P. syringae* ответственен за продукцию вещества, которое способно индуцировать SOS ответ в клетках *E. coli*, в условиях, когда нарушен экспорт этого вещества из клетки (транспортеры MсbEF) или отсутствует пентапептидный белок MсbG, способный защищать ДНК-гиразу от действия микроцина В.

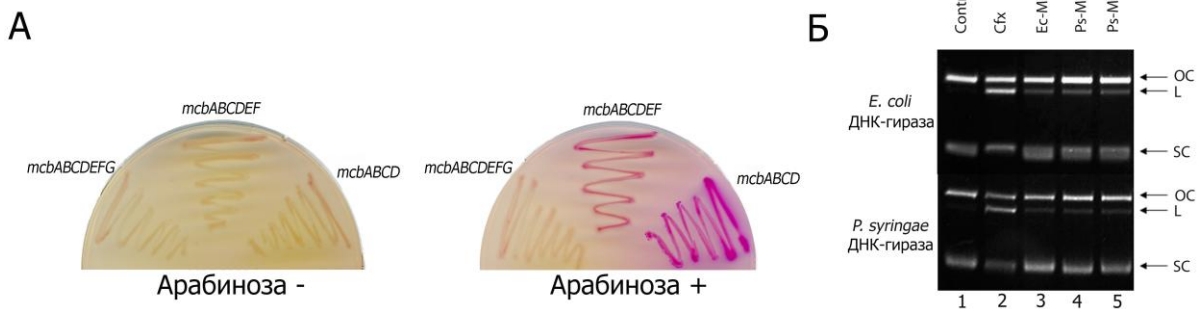


Рис. 5. А. Штамм *E. coli* CSH50 *sfiA::lacZ*, трансформированный плазмидами, экспрессирующими указанные гены оперона *P. syringae mcb*, на чашках с индикаторной средой MacConkey agar. Клетки инкубировались на 30 °С в отсутствие (слева) или в присутствии (справа) индуктора экспрессии – арабинозы. **Б.** Плазмида pUC19 инкубировалась с ДНК-гиразой из *E. coli* (сверху) или *P. syringae* (снизу) в отсутствие (дорожка 1) или в присутствии указанных ингибиторов (дорожки 2-5). Продукты реакции разделялись при помощи электрофореза в агарозном геле, содержащем бромистый этидий. “OC” – релаксированная ДНК, “L” – линейная форма ДНК, “SC” – суперскрученная ДНК.

Также, были исследованы эффекты *Ps-MsB1* и *Ps-McB2* на катализируемую ДНК-гиразой реакцию суперскручивания ДНК *in vitro*. При инкубации ДНК-гиразы с релаксированной плазмидной ДНК в присутствии ингибиторов, таких как цiproфлоксацин или микроцин В, происходит стабилизация промежуточного каталитического комплекса гиразы-ДНК, что приводит к накоплению линейной формы плазмиды. Накопление линейной формы ДНК может быть детектировано с помощью электрофореза в агарозном геле. Нами была протестирована активность вариантов микроцина в отношении рекомбинантных ДНК-гираз из *E. coli* и *P. syringae*. В качестве положительного контроля использовали цiproфлоксацин. Было показано, что инкубация ДНК-гиразы с релаксированной плазмидой в присутствии 30 мкМ *Ec-McB* приводит к накоплению линейной формы плазмиды (рис. 5Б, дорожка 3). Интересно, что *Ec-McB* ингибировал как ДНК-гиразу, выделенную из *E. coli*, так и из *P. syringae*. Инкубация ДНК-гиразы с релаксированной плазмидной ДНК в присутствии 30 мкМ цiproфлоксацина приводит к накоплению значительно больших количеств линейной формы ДНК (рис. 5Б, дорожка 2), что согласуется с ранее опубликованными данными, показывающими, что антибиотики из группы фторхинолонов являются более эффективными ингибиторами ДНК-гиразы *E. coli*, чем *Ec-McB* [Heddle et al., 2001]. Инкубация обоих вариантов *Ps-McB* с ДНК-гиразой как из *E. coli*, так и из *P. syringae*, приводила к накоплению одинаковых количеств линейной ДНК плазмиды. Количества

линейной ДНК, образованные в присутствии *Ps*-McB1 и *Ps*-McB2 были эквивалентны количествам, образовавшимся в реакциях, содержащих *Ec*-McB (рис. 5Б, сравнение дорожек 4 и 5 с дорожкой 3). Таким образом, можно заключить, что оба варианта *Ps*-McB ингибируют ДНК-гиразу *in vitro* и уровень ингибирования соответствует уровню ингибирования *Ec*-McB.

Видоспецифичность действия *Ps*-McB и *Ec*-McB

Четыре штамма *P. syringae*, один из которых содержал оперон *mcb* (*P. syringae* pv. *glycinea* B076), а три - не содержали его (pv. *tomato* DC3000, pv. *syringae* B728a и pv. *phaseolicola* 1448a), а также штамм *P. aeruginosa* PAO1, были протестированы на чувствительность к *Ps*-McB1, *Ps*-McB2, *Ec*-McB и ципрофлоксацину (тестировалось ингибирование роста газона клеток в мягком агаре). В качестве контроля использовались клетки *E. coli* BL21 (DE3). Ципрофлоксацин ингибировал рост всех тестируемых бактерий. *Ec*-McB ингибировал рост *E. coli*, но был неактивен в отношении всех тестируемых бактерий рода *Pseudomonas*. Оба варианта *Ps*-McB ингибировали рост *P. aeruginosa* и штаммов *P. syringae*, в которых не содержался *mcb* оперон, и были активны в отношении штамма BL21 (DE3), однако активность была значительно ниже по сравнению с *Ec*-McB. Таким образом, можно заключить, что, несмотря на то, что варианты *Ps*-McB являются менее эффективными антибиотиками в отношении штаммов *E. coli* по сравнению с *Ec*-McB, в отличие от последнего, они являются эффективными ингибиторами роста бактерий рода *Pseudomonas*. Штамм *P. syringae* pv. *glycinea* B076 был не чувствителен к обеим формам *Ps*-McB, что указывает на то, что в нем образуется достаточное количество продуктов генов *mcbEFG* для обеспечения резистентности.

На рисунке 6А представлены результаты сравнения активности *Ec*-McB, *Ps*-McB1 и *Ps*-McB2 в отношении *E. coli* BL21 (DE3) и *P. aeruginosa* PAO1.

Сравнение химических структур *Ec*-McB и *Ps*-McB1 показывает, что они различаются в трех районах (рис. 6Б). Во-первых, *Ec*-McB содержит N-концевой пептид VGIG(G)₉ перед первым слитым бис-гетероциклом сайта А, а *Ps*-McB1 и *Ps*-McB2 содержат в этом месте дипептид LG. Во-вторых, *Ec*-McB содержит дипептид SN между тиазольным гетероциклом и вторым слитым бис-гетероциклом сайта В, в то время как оба варианта *Ps*-McB содержат в этом месте трипептид GGG. Наконец, на С-конце *Ec*-McB находится аминокислотная последовательность GSHI, в то время как на С-конце *Ps*-McB1 и *Ps*-McB2 находятся последовательности GTSAPDHSV и GTS, соответственно. Мы предположили, что одно из этих отличий или их комбинация может отвечать за наблюдаемую видоспецифичность

действия вариантов микроцина. Для того чтобы определить ключевое место, ответственное за специфичность действия, на основе плазмид, содержащих *mcb* опероны *E. coli* и *P. syringae*, были созданы шесть конструкций с химерными *mcbA* генами. Созданные химерные варианты схематически изображены на рисунке 6Б. На основе плазмиды, содержащей *mcb* оперон *E. coli*, были созданы три конструкции, кодирующие варианты *Ec-McbA*, содержащие 1) VG дипептид вместо N- концевой последовательности VGIG(G)₉, 2) GGG вместо SN в центральной области пептида, 3) C-концевую аминокислотную последовательность GTSAPDHV вместо GSHI. На основе плазмиды содержащей *mcb* оперон *P. syringae* были созданы три конструкции, кодирующие варианты *Ps-McbA*, содержащие 1) N-концевую последовательность VGIG(G)₉ перед первым образующимся бис-гетероциклом вместо дипептида LG, 2) SN дипептид вместо трипептида GGG в центральной области пептида и 3) C-концевую последовательность GSHI вместо GTSAPDHV.

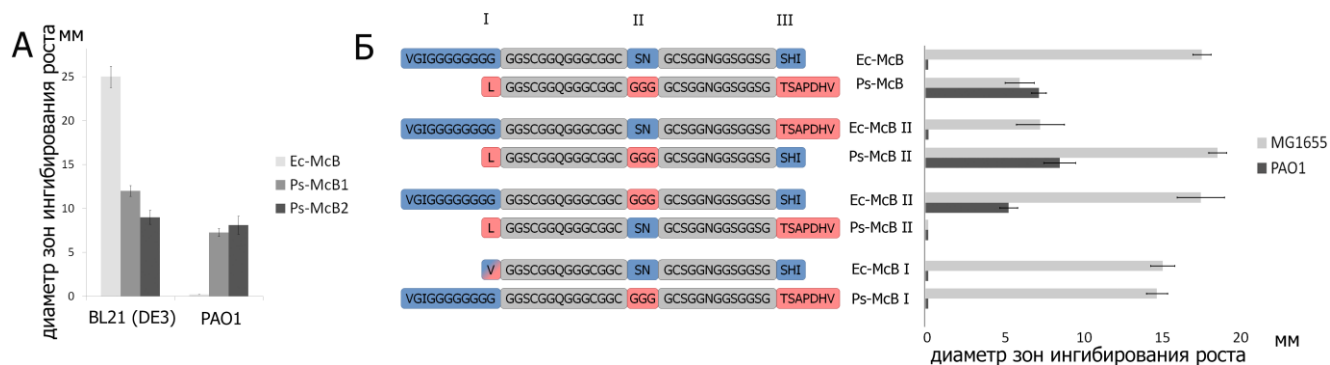


Рис. 6. Специфичность действия *Ps-McB* и *Ec-McB*. А. 2 мкл раствора, содержащего 200 мкМ концентрации *Ec-McB*, *Ps-McB1* или *Ps-McB2* было нанесено на газон клеток *E. coli* BL21(DE3) или *P. aeruginosa* PAO1. Клетки инкубировались в течение 16 часов при комнатной температуре, после чего измерялся диаметр зон ингибирования роста (в мм). Б. Природные и химерные варианты микроцинов изображены слева. Вещества отличаются наборами фрагментов, обозначенных как I, II и III, которые различны у *Ec-McB* и *Ps-McB*. Все вещества, содержащие полный набор гетероциклов (молекулярные массы указаны в центре), были очищены и по 2 мкл раствора, содержащего 200 мкМ концентрацию соответствующего пептида, нанесено на газоны клеток *E. coli* MG1655 и *P. aeruginosa* PAO1. Приведены диаметры зон ингибирования роста (в мм) после инкубации.

Все плазмиды, кодирующие химерные конструкции, были трансформированы в клетки *E. coli* и продуцированные варианты микроцинов были очищены с использованием стандартной методики очистки, разработанной для *Ec*-McB [*Sinha Roy et. al., 1999*]. Структура образующихся веществ была подтверждена при помощи масс-спектрометрического анализа. Оказалось, что все вещества содержали полный набор тиазольных и оксазольных гетероциклов. При экспрессии химерного варианта, созданного на основе *Ec*-McB и содержащего С-концевую последовательность GTSAPDHSV из *Ps*-McBA, продуцировалась только одна форма микроцина (С-концевой пептид APDHSV не отрезался).

Для всех полученных вариантов микроцина была протестирована их способность ингибировать рост клеток на газонах в мягком агаре (рис. 6Б). Тестирование проводилось на штаммах *P. aeruginosa* PAO1 и *E. coli* MG1655. Вещество с заменой С-концевых аминокислот *Ec*-McB на соответствующие аминокислоты *Ps*-McB1 (на рисунке обозначено, как «*Ec*-McBIII»), было менее активно в отношении тестируемых клеток *E. coli*, чем *Ec*-McB, а активности в отношении *P. aeruginosa* PAO1 не наблюдалось. Напротив, замена С-концевых аминокислот *Ps*-McB1 на аминокислоты *Ec*-McB (*Ps*-McBIII) привела к увеличению активности в отношении *E. coli* по сравнению с *Ps*-McB1 (наблюдаемая активность эквивалентна таковой для *Ec*-McB). Полученные результаты говорят в пользу того, что С-концевые аминокислоты в значительной степени влияют на активность в отношении штаммов *E. coli*, однако не определяют видоспецифичность действия в отношении *Pseudomonas*. Вариант *Ec*-McB, содержащий VG дипептид вместо N-концевой последовательности VGIG(G)₉ (*Ec*-McBI), по своей активности был практически неотличим от *Ec*-McB (хорошо действует на MG1655 и не действует PAO1). Таким образом, можно заключить, что N-концевая глицин-богатая последовательность *Ec*-McB несущественна для биологической активности. Отсутствие активности этого вещества в отношении *Pseudomonas* говорит о том, что N-концевая последовательность не является детерминантой видоспецифичности действия исследуемых микроцинов. Интересно, что модифицированный вариант *Ps*-McB, содержащий N-концевые аминокислоты VGIG(G)₉ (*Ps*-McBI), становится активнее в отношении клеток *E. coli*, чем немодифицированный *Ps*-McB, однако теряет активность в отношении *Pseudomonas*. Полученный результат свидетельствует о том, что удлиненный N-конец блокирует способность *Ps*-McB ингибировать *Pseudomonas*. Возможно, причина кроется в том, что такая последовательность ингибирует транспорт вещества внутрь клеток *Pseudomonas*, либо маскирует последовательность, необходимую для узнавания этими транспортерами. Вариант *Ps*-McB, содержащий дипептид SN вместо трипептида GGG (*Ps*-McBII) в центральной области пептида, оказался неактивен в отношении и *E. coli*

MG1655 и *P. aeruginosa* (однако, данный вариант микроцина ингибирует рост более чувствительных к микроцину В клеток *E. coli* BL21(DE3), данные не приведены). Наиболее важным результатом является то, что вариант *Ec*-McB, содержащий в центральной области три глицина вместо SN (*Ec*-McBII), сохраняет способность ингибировать рост клеток *E. coli* MG1655 и приобретает способность ингибировать *P. aeruginosa*. Таким образом, мы делаем вывод, что наличие центрального трипептида GGG является необходимым и достаточным условием для биологической активности против бактерий рода *Pseudomonas*.

Исследование продукции вещества, подобного микроцину В, закодированного в *put* опероне *Pseudomonas putida* KT2440

В геноме почвенной бактерии *Pseudomonas putida* KT2440 ранее был обнаружен оперон (далее обозначается как оперон *put*), родственный *mcbABCDEFG* оперону синтеза микроцина В *E. coli*. В *put* опероне присутствуют гомологи всех генов *mcb* за исключением гена *mcbG*. Было сделано предположение, что оперон *put* может обеспечивать синтез вещества, подобного микроцину В *E. coli*, но активного в отношении почвенных бактерий, конкурирующих с *P. putida* KT2440. Ген *putA* кодирует предполагаемый пептид-предшественник, содержащий характерные GlyCys и GlySer дипептиды, которые при модификации белками синтетазного комплекса BCD могут быть конвертированы в тиазольные и оксазольные гетероциклы (рис. 7А). Однако взаимное расположение аминокислотных остатков, которые могут участвовать в гетероциклизации, заметно отличается от последовательности гетероциклов в микроцинах из *E. coli* и *P. syringae*. Так, например, отсутствуют трипептиды GlyCysSer и GlySerCys, которые могли бы быть конвертированы в слитые бис-гетероциклы. На настоящий момент, так же как и в случае со штаммом *P. syringae* pv. *glycinea* B076, обнаружить продукцию штаммом *P. putida* KT2440 вещества, подобного микроцину В, не удалось. Была предпринята попытка гетерологической экспрессии *put* оперона в клетках *E. coli*. Полный *put* оперон был клонирован в экспрессионный вектор под контроль промотора *araBAD*. Клетки *E. coli*, содержащие такой вектор способны продуцировать микроцин-подобное вещество. Очистка продуцирующихся пептидов проводилась согласно процедуре, основанной на процедуре выделения микроцина В приводившейся выше. При хроматографии материала, полученного из клеток, содержащих плазмиду с *put* опероном, идентифицируются несколько пиков (рис. 7Б, 20 минута элюции), отсутствующих в контрольном образце (материал, полученный из клеток, содержащих плазмиду без вставки).

присутствующих в последовательности пептида-предшественника PutA, за исключением второго дипептида Gly²⁹Ser³⁰. Помимо этого, модифицированный PutA отрезается как с N-конца (первой аминокислотой в зрелом пептиде является Met²⁰), так и с C-конца (последняя аминокислота зрелого пептида – Gly⁶¹). Далее такой модифицированный пептид будет обозначаться как *Pp*-McB.

Биологическая активность *Pp*-McB

Для тестирования биологической активности *Pp*-McB был очищен при помощи ВЭЖХ. Штаммы *E. coli* BL21 (DE3) и DH5 α , *P. syringae* pv. *tomato* str. DC3000, pv. *syringae* str. B728a и pv. *phaseolicola* str. 1448A, *P. putida* KT2440 (содержащий оперон *put*), и *Pseudomonas putida* ATCC 12633 (полностью отсекуенный, не содержащий ни одного гена оперона *put*) были протестированы на чувствительность к *Pp*-McB. *Pp*-McB не ингибировал рост ни одного из тестируемых штаммов. Поскольку нам не удалось найти штамм бактерий, чувствительных к *Pp*-McB, мы протестировали, токсичен ли образующийся *Pp*-McB для клеток-продуцентов, в условиях нарушения экспорта, т.е. при делеции генов транспортеров PutEF. Оказалось, что экспрессия укороченной версии оперона (*putABCD*) приводит к ингибированию роста клеток (рис. 8А). Ингибирования роста клеток, экспрессировавших полноразмерный *put* оперон, не наблюдалось. Полученный результат свидетельствует о том, что производящийся и накапливающийся внутри клеток *Pp*-McB (или продукт его распада) является токсичным. Таким образом, можно предположить, что *Pp*-McB может обладать антибактериальной активностью. Отсутствие ингибирования роста при добавлении экзогенного *Pp*-McB может быть связано с тем, что это вещество не транспортируется внутрь клеток *E. coli*. Для доказательства этого утверждения требуются дополнительные эксперименты.

В *in vitro* эксперименте было протестировано, ингибирует ли *Pp*-McB реакцию суперскручивания, катализируемую ДНК-гиразой (рис. 8Б). В контрольных экспериментах использовались ципрофлоксацин, *Ec*-McB и *Ps*-McB. Инкубация ДНК-гиразы с плазмидной ДНК в присутствии *Pp*-McB не приводила к образованию линейной формы плазмидной ДНК. Как и ожидалось, линейная форма плазмидной ДНК накапливалась в реакциях, содержащих ципрофлоксацин, *Ec*-McB и *Ps*-McB. Таким образом, можно утверждать, что *Pp*-McB не является ингибитором ДНК-гиразы. То, что в *put* опероне отсутствует гомолог гена *mcB*, и то, что в последовательности зрелого пептида отсутствуют слитые бис-гетероциклы, также указывает на то, что ДНК-гираза не является мишенью *Pp*-McB.

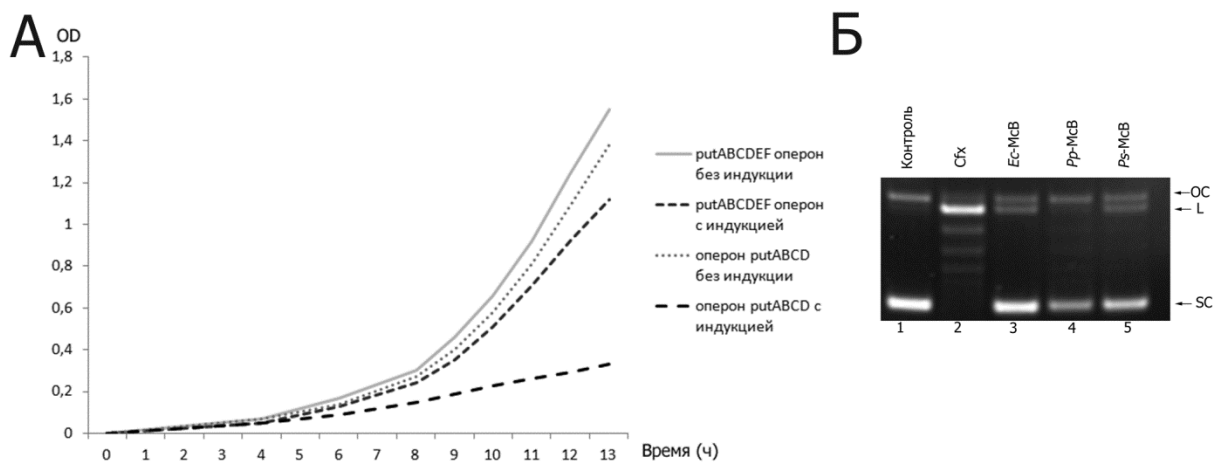


Рис. 8. А. Продукция *Pp*-McB внутри клеток *E. coli* ингибирует рост, если нарушен транспорт синтезируемого вещества из клетки (в результате делеции генов *putEF*). Б. Плазмида pUC19 инкубировалась с ДНК-гиразой из *E. coli* в отсутствие (дорожка 1) или в присутствии указанных ингибиторов (дорожки 2-5) в концентрации 30 мкМ. Продукты реакции разделялись при помощи электрофореза в агарозном геле, содержащем бромистый этидий. “OC” – релаксированная ДНК, “L” – линейная форма ДНК, “SC” – суперскрученная ДНК.

Идентификация гомологичных оперонов

При помощи программ BLASTp и tBLASTn по базам данных NCBI nr и NCBI wgs был проведен поиск последовательностей, сходных с аминокислотной последовательностью PutV. Было обнаружено 14 последовательностей, обладающих высоким уровнем сходства (значение $e\text{-value} < 10^{-14}$), которые не обнаруживались при аналогичном поиске с использованием последовательности McbV *E. coli*. Все обнаруженные последовательности находятся в бактериях рода *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. tolaasii*, *P. putida*, *P. plecoglossicida*, *P. taiwanensis*). Был проведен анализ областей генома в окрестностях найденных последовательностей. Во всех случаях был обнаружен полноразмерный оперон, содержащий 6 генов (*ABCDEF*). На рисунке 9 приведено множественное выравнивание предположительных пептидов-предшественников. Из выравнивания видно, что все последовательности содержат консервативный участок, содержащий GlyCys и GlySer дипептиды, которые могут участвовать в образовании гетероциклов, и переменные участки на С- и N-конце. Взаимное расположение аминокислотных остатков, которые могут участвовать в гетероциклизации (дипептиды GlyCys и GlySer), близко у всех пептидов-предшественников.

```

      *           20           *           40           *           60           *
NZ_AKJF01000095: MKNNELGKILFNFRSDYGSSTNPQVAGSGGGGGCCGCGSGGCGGGGGCGSGSGGPGGCGGGGGTGGGSGTGGSKGT : 75
NZ_AKJG01000073: MKNNELGKVLNFRNSVGSNPNPQVAGSGGGAGGCGSGGCGGGGGCGSGSGGNGGCGGAGGTGGGSGTGGCRM : 75
AE015451: MENQYGISVME-LASDTHCDMEAEFFGGSGSAGGCGSGGCGGGGGCGSGSGS-GGSGGNNGIN-NDPVTL--- : 69
CP005976: MENQYGIRLME-LASDTNCDMEAEFFGGSGSAGGCGSGGCGGGGGCGSGSGS-GGSGGNNGIN-NEPVIS--- : 69
ASJX01000033: MENQYGISLME-LSSDTNCDMEAEFFGGSGSAGGCGSGGCGGGGGCGSGSGS-GGSGGNNGIDSNDTVAL--- : 70
AUCE01000054: MENQYGISILE-LTSHNECDMDSEYFGGSGGAGGCGSGGCGGGGGCGSGSGS-GGSGG-HAIN-NDDSAN--- : 68
AJJP01000092: MNIDQKLGKIL-ISTNNPEISNMEFFGGSGGAGGCGSGGCGGGGGCGSGSGS-GGSG-NNGISELEPSS---- : 68
NZ_AKJS01000157: MKDENMIDMLLSFKSEFGENSTPQIAGSGGGAGGCGSGGCGGGGGCGSGSGS-EGSGG-NAVTRHIDGSSTEQ : 73
NZ_AJMR01000059: MNNNHFIETIEFYQFDHGPAADVPLAFGGSGGAGGCGSGGCGGGGGCGSGSGC-GGCGG-NHTEDE----- : 66
NZ_AJXH01000004: MNNEEFGEFVSEFESEEGFNYPYAGNAGASGSGGCGGCGSGGCGGGGGCGSGSGC-----HNSIMEPPSAVE--- : 66
ASJX01000033: MNNEEFGEFVSEFESEEGFNYPYAGNAGASGSGGCGGCGSGGCGGGGGCGSGSGC-----HNSIMEPPSAVE--- : 66
AHZN01000058: MNNEAFGEFVSEFESEEGFNYPYAGNAGASGSGGCGGCGSGGCGGGGGCGSGSGC-----HNSIEPPPADE--- : 66
NZ_AMZG01000017: MNIEEFGEFVSEFESEYGFNYPVDNAGSGSGGCGGCGSGGCGGGGGCGSGSGC-----HNSIAEHPPADE--- : 66
YP_006324846: MKKSEYGEVITDEFDNDYGFNYPYAGNAGASGSGGCGGCGSGGCGGGGGCGSGSGS-GG-CGHNSIEEQALAKE--- : 70
      M           6           G SG GCGSGGCGGGGGCG SGSGG           n

```

Рис. 9. Множественное выравнивание предположительных пептидов-предшественников, закодированных в оперонах, гомологичных *put* оперону *Pseudomonas putida* KT2440.

Таким образом, мы показали, что в бактериях рода *Pseudomonas* существует большое разнообразие оперонов, подобных *put* оперону, которые, возможно, кодируют антибактериальные вещества, активные в отношении конкурирующих с этими бактериями организмов. Мы предполагаем, что переменные С- и N-концевые участки могут играть роль в обеспечении видоспецифичности действия таких микроцинов, в то время как центральный модифицированный фрагмент формирует пространственную структуру необходимую для ингибирования внутриклеточной мишени.

Заключение

В данной работе мы охарактеризовали подобное микроцину В вещество, гены биосинтеза которого имеются у ряда штаммов *Pseudomonas syringae*. Несмотря на то, что гены *mcb* оперона транскрибируются в протестированном нами штамме *P. syringae* pv. *glycinea* B076, мы не обнаружили продукции веществ, подобных микроцину В. Однако при гетерологической экспрессии *mcb* оперона из *P. syringae* pv. *glycinea* B076 в клетках *E. coli* наблюдалась продукция двух вариантов *Ps*-MсВ, которые содержали полный набор тиазольных и оксазольных гетероциклов.

В процессе созревания микроцина В *E. coli* после образования характерного числа гетероциклов продукты генов *tldD* и *tldE* (которые, по-видимому, кодируют протеазу) отрезают лидерную последовательность. Возможно, что при гетерологической экспрессии отрезание лидерной последовательности *Ps*-MсВ также происходит под действием TldD/E *E. coli*. Гены *tldD* и *tldE* консервативны среди бактерий и архей, и в том числе присутствуют в геноме *P. syringae*. Возможно, что TldD/E также участвуют в созревании *Ps*-MсВ в

природном штамме, однако, поскольку специфичность данного типа протеаз на настоящий момент не изучена, возможно, что в природном штамме продуцируемое вещество может отличаться от полученного нами при гетерологической экспрессии. В независимости от этого, полученные нами варианты *Ps*-McB обладают антибактериальной активностью в отношении штаммов *P. syringae*, не содержащих *mcb* оперона, а также в отношении патогенного для человека штамма *P. aeruginosa*. Интересно, что штамм *P. syringae* pv. *glycinea* B076, содержащий оперон *mcb*, устойчив к *Ps*-McB, что свидетельствует о присутствии в клетках достаточного количества продуктов генов *mcbEFG*, обеспечивающих резистентность клеток.

Интересно, что оба полученных варианта *Ps*-McB и *Ec*-McB одинаково ингибировали ДНК-гиразу как *E. coli*, так и *P. syringae in vitro*. Однако эти вещества обладали видоспецифичностью действия в отношении штаммов *E. coli* и *Pseudomonas in vivo*. *Ps*-McB, не смотря на то, что проникает в клетки *E. coli* тем же путем, что и *Ec*-McB (через порин OmpF и транспортер SbmA), менее активен по сравнению с последним, возможно, из-за сниженной эффективности проникновения в клетку. *Ec*-McB, в отличие от вариантов *Ps*-McB, не активен в отношении бактерий рода *Pseudomonas*. Нами было показано, что за специфичность действия в отношении *Pseudomonas* отвечает находящийся в центральной области трипептид GGG, в то время как С-концевые аминокислоты оказываются важными для действия на *E. coli* (варианты McB, содержащие С-концевой трипептид SHI были наиболее эффективны). Поскольку на ДНК-гиразу *Ec*-McB и *Ps*-McB действуют одинаково, можно предположить, что специфичность действия определяется эффективностью проникновения в клетку. В геномах бактерий рода *Pseudomonas* нет гена, гомологичного *sbmA*, который в *E. coli* кодирует транспортер внутренней мембраны и, как было показано, является необходимым для проникновения микроцинов в клетку. Отсутствие различного гомологичного гена затрудняет биоинформатический анализ, поэтому для нахождения транспортера, через который *Ps*-McB проникает в клетки *Pseudomonas*, требуются дополнительные генетические эксперименты.

В данной работе также было обнаружено, что в ряде геномов бактерий рода *Pseudomonas* закодирован оперон, подобный оперону микроцина В, в котором отсутствует гомолог гена *mcbG*, продукт которого связывается с внутриклеточной мишенью – ДНК-гиразой – и обеспечивает автоимунность. Такие опероны были обнаружены в полностью и частично отсекуенных геномах *P. putida* KT2440, *P. fluorescens* A506 (CP003041), *P. fluorescens* NZ052(NZ_AJXH00000000), *P. fluorescens* BS2 (NZ_AMZG00000000), *P. pseudoalcaligenes* KF707 (AJMR01000000), *P. tolaasii* NCPPB 2192 (AJXK01000000) и в

генах ряда других представителей рода *Pseudomonas*. При гетерологической экспрессии *put* оперона *P. putida* КТ2440 в клетках *E. coli* нами было получено вещество *Pp*-МсВ, содержащее 8 тиазольных и оксазольных гетероциклов. Мы предполагаем, что *Pp*-МсВ может обладать антибактериальной активностью в отношении бактерий, конкурирующих с *P. putida* КТ2440 в природных условиях. На это косвенно указывает то, что *Pp*-МсВ ингибирует рост продуцирующих его клеток, если нарушена система экспорта. К сожалению, на настоящий момент нам не удалось обнаружить бактерий, чувствительных к такому веществу. В эксперименте *in vitro* было показано, что *Pp*-МсВ не ингибирует ДНК-гиразу. Биоинформатический анализ пептидов-предшественников, закодированных в оперонах подобных *put* оперону, показывает, что все пептиды имеют характерную последовательность гетероциклизуемых остатков, отличную от последовательности микроцина В. Мы предполагаем, что закодированные в таких оперонах вещества могут образовывать еще не изученный подкласс антибактериальных пептидов, специфичность действия которых определяется варибельными участками на С- и N-конце, в то время как жесткий остов, образуемый набором гетероциклов, необходим для связывания и ингибирования внутриклеточной мишени, природа которой остается в настоящее время неизвестной.

III. ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что в ряде штаммов *P. syringae* закодированы опероны, гомологичные *mcb* оперону *E. coli*.
2. При гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* оперона *mcb* *P. syringae* производится два варианта *P. syringae* микроцина (*Ps*-МсВ).
3. *Ps*-МсВ является ингибитором ДНК-гиразы.
4. *Ps*-МсВ менее активен в отношении бактерий *E. coli* по сравнению с микроцином В из *E. coli*, однако, в отличие от последнего, ингибирует рост бактерий рода *Pseudomonas*. Наблюдаемая видоспецифичность не связана с различием в действии на мишень антибиотиков – ДНК-гиразу. Три немодифицированные аминокислоты в центральной области пептида *Ps*-МсВ отвечают за ингибирование роста бактерий рода *Pseudomonas*.

5. *Ps*-МсВ проникает в клетки *E. coli* через те же транспортеры, что и микроцин В из *E. coli*. Эффективность действия микроцинов на *E. coli* в значительной степени зависит от С-концевых немодифицированных аминокислот.
6. В геномах различных бактерий рода *Pseudomonas* были обнаружены *mcb*-подобные опероны, в которых в отличие от *mcb* оперона *P. syringae* отсутствует ген, кодирующий белок с пентапептидными повторами. Показано, что с одного из таких *mcb*-подобных оперонов, закодированного в геноме *Pseudomonas putida* КТ2440, синтезируется токсичное для клетки вещество, которое не является ингибитором ДНК-гиразы.

IV. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных журналах:

1. **Metelev M.**, Serebryakova M., Ghilarov D., Zhao Y., Severinov K. Structure of Microcin B-Like Compounds Produced by *Pseudomonas syringae* and Species Specificity of Their Antibacterial Action. *Journal Bacteriology*. 2013. **195**, 4129-4137.

Материалы конференций:

1. **М. В. Метелев.** Изучение взаимодействия ДНК-гиразы *E.coli* и белков, содержащих пентапептидные повторы. Сборник тезисов «X чтений памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», конкурс молодых ученых. 2011. Том 2, стр. 46.
2. **М. В. Метелев,** Д. А. Гиляров, М. В. Серебрякова, Ю. Пискунова, К. В. Северинов. Исследование структуры и видоспецифичности действия гомолога ингибитора ДНК-гиразы микроцина В из *Pseudomonase syringae* pv. *glycinea* B076. Сборник тезисов III международной конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». 2012. Стр. 80.
3. **М. Metelev,** D. Ghilarov, M. Serebryakova and K. Severinov. Microcin-B-like compounds produced by *Pseudomonas syringae*: structure and species-specificity of antibacterial action. Abstracts of the 38th FEBS Congress. 2013. P. 493.