

На правах рукописи

**КАЗАКОВ Теймур Спартакович**

**Молекулярный механизм антимикробного  
действия микроцина С**

03.00.26 – молекулярная генетика

03.00.03 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2008

Работа выполнена в Институте белка РАН (Пушино) и в Институте им. Ваксмана Университета Ратгерс (Waksman Institute, Rutgers University, USA).

Научные руководители:

доктор биологических наук  
доктор биологических наук

К.В. Северинов  
В.А. Колб

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор  
кандидат химических наук

А.С. Миронов  
Т.С. Зацепин

Ведущая организация:

Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2008 г. в \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Диссертационном совете Д 002.037.01 Института биологии гена РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2008 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
канд. фарм. наук

Л.С. Грабовская

## Общая характеристика работы

**Актуальность темы.** Для успешного выживания в условиях конкуренции с другими организмами бактерии выработали ряд приспособлений, одним из которых является продукция антимикробных веществ. Антимикробные вещества, производимые бактериями, делятся на синтезируемые ферментативно и на кодируемые генами и синтезируемые на рибосомах. Микроцины – антимикробные вещества, закодированные в геноме бактерий и синтезируемые путем трансляции на рибосомах. Микроцины являются важным компонентом экологии микроорганизмов и многообещающим классом антибиотических веществ. Среди разнообразия этих антибиотиков особое место занимают микроцины, имеющие цитоплазматические мишени в поражаемых клетках. Такие микроцины имеют крайне необычные структуры и ингибируют рост чувствительных клеток, проникая в цитоплазму и действуя на внутриклеточные мишени, такие как ДНК-гираза, ДНК-зависимая РНК-полимераза и аспартил-тРНК-синтетаза.

Микроцин С (МсС) – антибактериальный нуклеотид-гептапептид, продуцируемый некоторыми штаммами *E. coli*. МсС действует на многие грам-отрицательные, а так же, в отличие от других микроцинов, на грам-положительные бактерии.

Гены, необходимые для продукции микроцина С, расположены на плазмиде природного происхождения (плазида рУНАВ, использованная в работе, – производное такой плазмиды). Гены *mcsA*, *mcsB*, *mcsD* и *mcsE* участвуют в продукции МсС, а *mcsC* и *mcsE* – в экспорте микроцина из клетки и иммунности к нему. Все вместе они образуют один оперон, первым в котором расположен ген *mcsA*, 21 нуклеотидная пара которого кодирует пептидную часть МсС. Таким образом, *mcsA* является самым коротким из известных генов. В процессе синтеза микроцина С гептапептид, продукт гена *mcsA*, подвергается значительным изменениям, механизм осуществления которых до конца неясен. С-концевой аспарагин МссА дезаминируется, превращаясь в аспарагиновую кислоту, к которой присоединяется остаток АМФ (через фосфоамидатную связь). Остаток АМФ также модифицирован путем присоединения пропиламина к фосфатной группе. Как реализует свои антибактериальные свойства эта химерная структура, оставалось неясным. В настоящей работе мы показали, что микроцин С относится по своему

принципу действия к интереснейшей группе антибиотиков – троянских коней. Принципиальное отличие таких антибиотиков состоит в том, что в интактном состоянии они не являются ингибиторами какого-либо клеточного процесса. Клетка-мишень сама транспортирует их в цитоплазму, где подвергает модификации (процессингу), например, гидролизуя какие-то связи в молекуле антибиотика. Этот ряд действий со стороны клетки-мишени высвобождает активную часть антибиотика, которая ингибирует свою внутриклеточную мишень. Таким образом клетка-мишень сама делает всё, чтобы себя убить.

**Цель работы и задачи исследования.** Целью настоящей работы было изучение механизма действия микроцина С. В задачи данного исследования входило:

1. Идентифицировать внутриклеточную мишень микроцина С.
2. Идентифицировать внутриклеточные ферменты, процессирующие антибиотик.
3. Провести структурно-функциональный анализ пептидной части микроцина С.

**Научная новизна и практическая ценность.** Изучение микроцинов интересно само по себе, так как они отличаются необычными и непохожими между собой структурами, образующимися в результате посттрансляционных модификаций. Кроме того, изучение механизмов действия микроцинов способствует получению сведений о работе и структуре их мишеней – ключевых ферментов в жизнедеятельности бактерий. Троянский конь как модель действия антибиотика становится более актуальной по причине развития устойчивости у патогенных микроорганизмов к стандартным антибактериальным веществам. С практической точки зрения микроцины и их более активные производные, полученные искусственным путем, могут найти применение как при лечении бактериальных инфекций (микроцины активны против ряда патогенных микроорганизмов), так и в роли консервантов в пищевой промышленности. В случае микроцина С, появляется возможность изучать не только белки его транспорта, мишень (аспартил-тРНК-синтетазу), но и ферменты, которые осуществляют его процессинг. В настоящей работе мы идентифицировали все ответственные за процессинг белки – пептидазы и деформилазу. Возможность внесения изменений в микроциновый ген, кодирующий пептидную часть антибиотика, позволяет изучать механизм деградации олигопептидов в клетке.

**Апробация данной работы.** Казаков Т.С. опубликовал результаты работы в 5 статьях. Также результаты были представлены на 2 конференциях.

**Структура и объём работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 100 страницах машинописного текста и содержит 40 рисунков. Библиография включает в себя 110 названий.

### **Результаты работы**

Диссертационная работа подразделяется на три различных по своей тематике, но логически связанных исследования. Первая, и основная, часть работы – определение механизма действия и поиск внутриклеточной мишени нового антибиотика микроцина С. Второе исследование посвящено поиску клеточных ферментов, ответственных за процессирование микроцина. Третья часть работы сводится к структурно-функциональному анализу антибиотика.

#### **Микроцин С действует по принципу троянского кося**

Ранее было показано (Guijarro *et al*, 1995), что микроцин С (рис. 1) в концентрации 10  $\mu\text{M}$  подавляет на 50% бесклеточную сопряжённую систему транскрипции-трансляции на основе экстракта из клеток *E.coli*. Однако нам не удалось получить такой же результат при воспроизведении этого эксперимента. Использованный в работе метод измерения количества синтезированного белка по его ферментативной активности отличался более высокой чувствительностью: антибиотик добавляли в систему транскрипции-трансляции гена светлячковой люциферазы. Даже в течении 60-ти минутной работы бесклеточной системы значительного снижения ферментативной активности люциферазы по сравнению с контролем без антибиотика обнаружено не было. Guijarro и соавторы наблюдали подавление белкового синтеза в течении 30 минут.

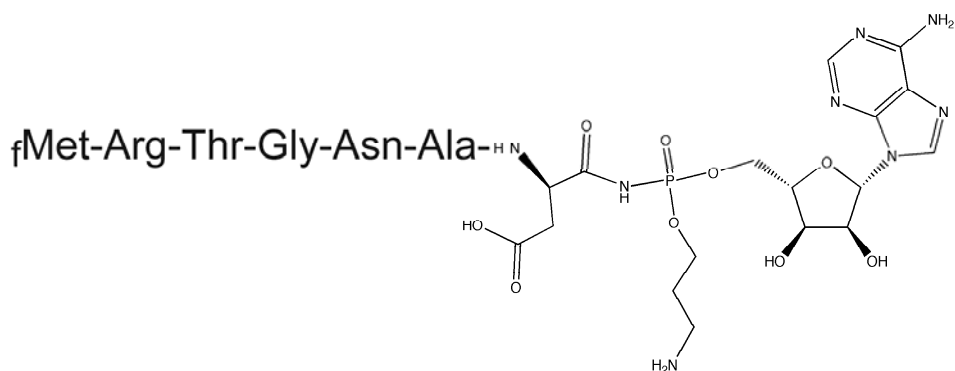


Рисунок 1. Структура интактного микроцина С.

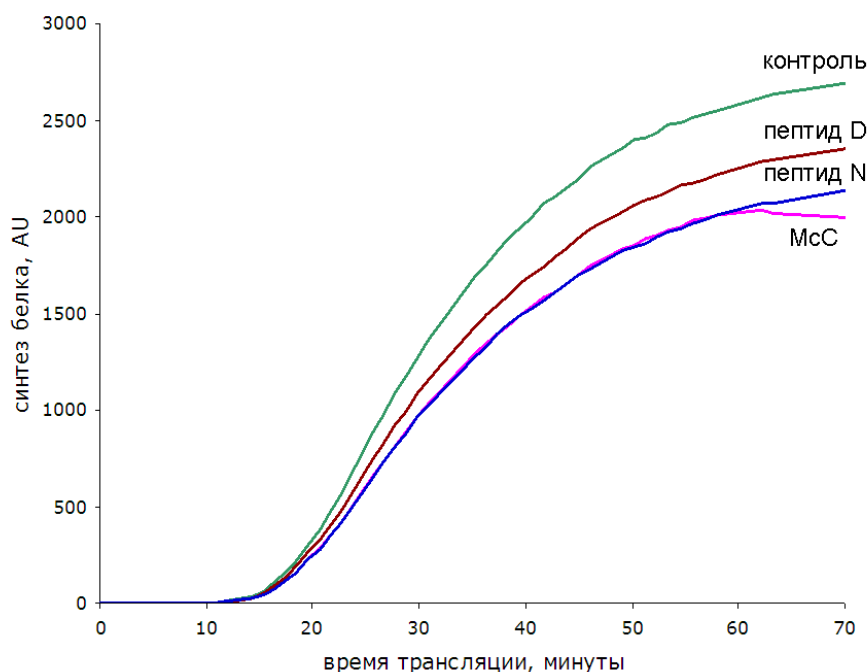
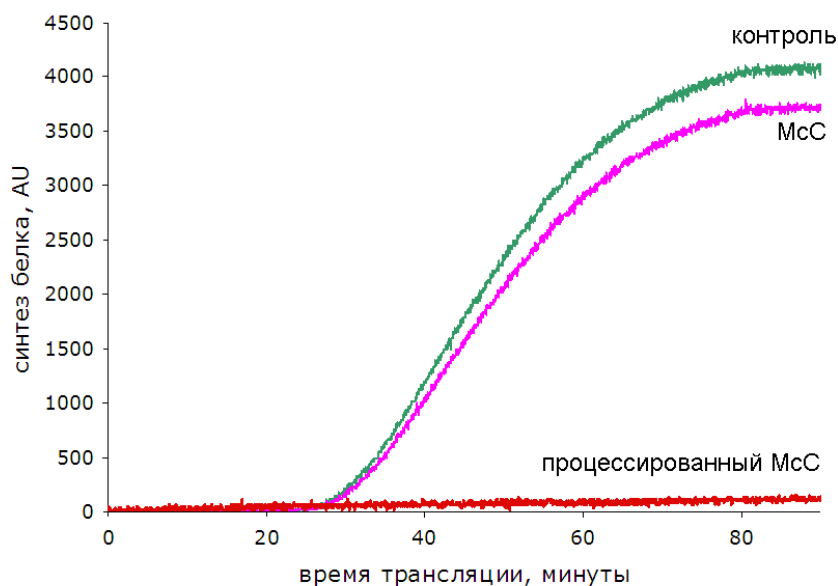


Рисунок 2. Действие интактного микроцина С и гептапептидов на синтез белка в бесклеточной системе транскрипции-трансляции. Система транскрипции-трансляции на основе S30 экстракта из *E.coli* содержала плазмиду рТ7luc, несущую ген светлячковой люциферазы и РНК-полимеразу фага Т7. Количество синтезированного белка в системе определяли непрерывно в реальном времени по свечению синтезируемой люциферазы (система трансляции содержала все субстраты люциферазы). В реакционные смеси были добавлены: буферный раствор (контроль), микроцин С, гептапептид MRTGNAD (пептид D), гептапептид MRTGNAN (пептид N). Ни одно из перечисленных веществ не подавляет синтез люциферазы.

Более того, они выдвинули гипотезу, в соответствии с которой активной частью микроцина является гептапептид MRTGNAD, а нуклеозид монофосфат играет в антибиотике транспортную роль. При этом на специфическую активность микроцина *in vitro* не влияет наличие нуклеотидной части. Мы проверили эту гипотезу,

синтезировав два олигопептида – MRTGNAD (пептид D), соответствующий интактному микроцину С, и MRTGNAN (пептид N), продукт микроцинового гена *mcsA*. Результат проверки их действия на систему транскрипции-трансляции можно видеть на рис. 2: как интактный микроцин, так и оба типа гептапептидов не оказали действия на синтез люциферазы *in vitro*.



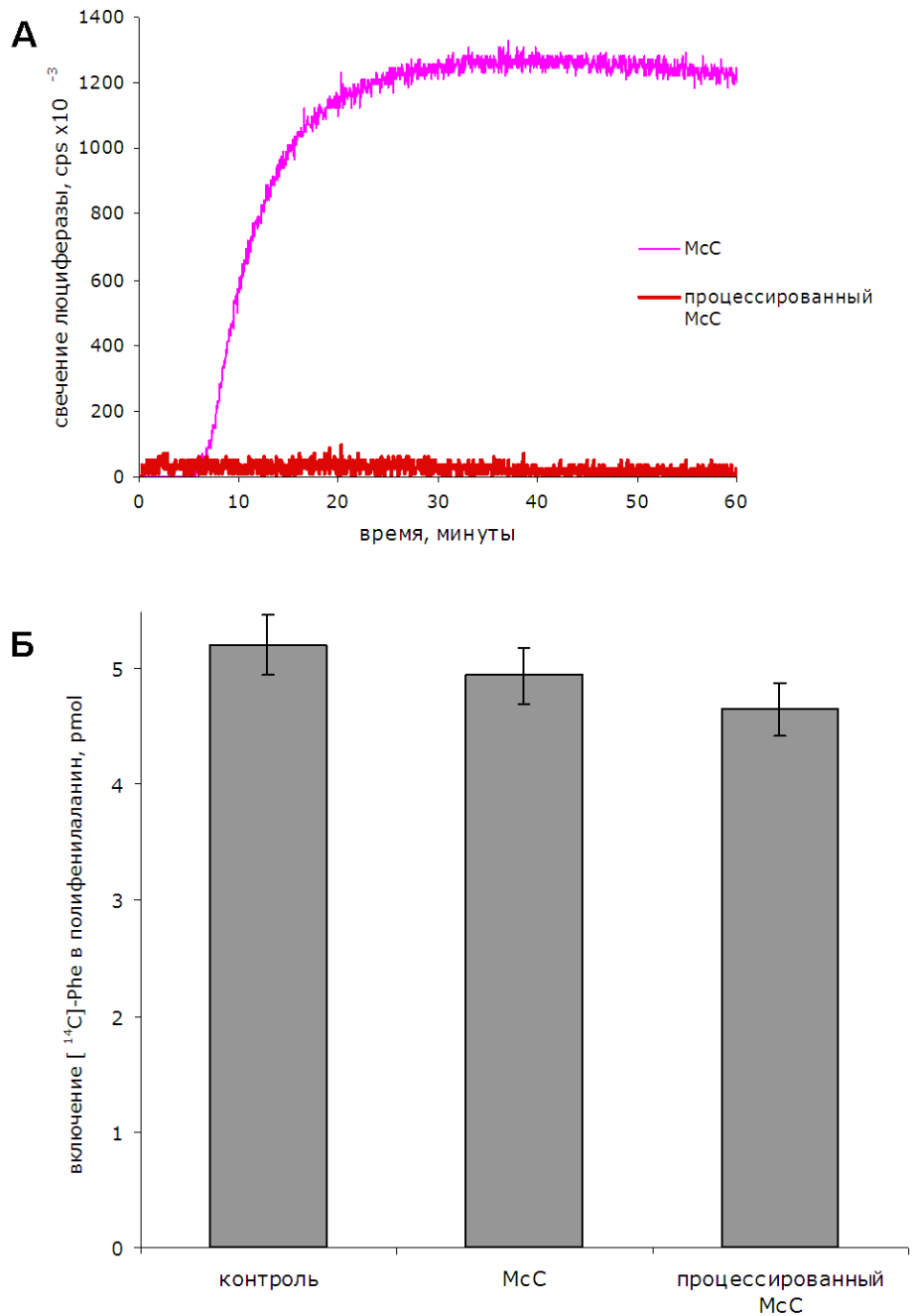
**Рисунок 3. Действие процессированного микроцина на синтез белка в бесклеточной системе транскрипции-трансляции.** В бесклеточную систему (см. подпись к рис. 2). добавляли буферный раствор (контроль), интактный или процессированный микроцин. Видно, что процессированный антибиотик полностью подавляет синтез люциферазы в бесклеточной системе. Смесь, в которой проводили процессинг микроцина, не оказывает действия на систему синтеза белка; процессированный микроцин не оказывает действия на ферментативную активность люциферазы (данные этих контролей не приведены).

Мы предположили, что отсутствие действия микроцина С на систему белкового синтеза *in vitro* говорит о наличии стадии процессинга антибиотика, необходимой для высвобождения его активной формы. Для проверки этой гипотезы микроцин С инкубировали с грубым нефракционированным клеточным экстрактом из клеток *E.coli* в течении нескольких часов. В результате такой инкубации антибиотик потерял способность действовать на клетки, но стал сильным ингибитором бесклеточной системы синтеза белка (рис. 3). Такой микроцин мы назвали «процессированный микроцин С».

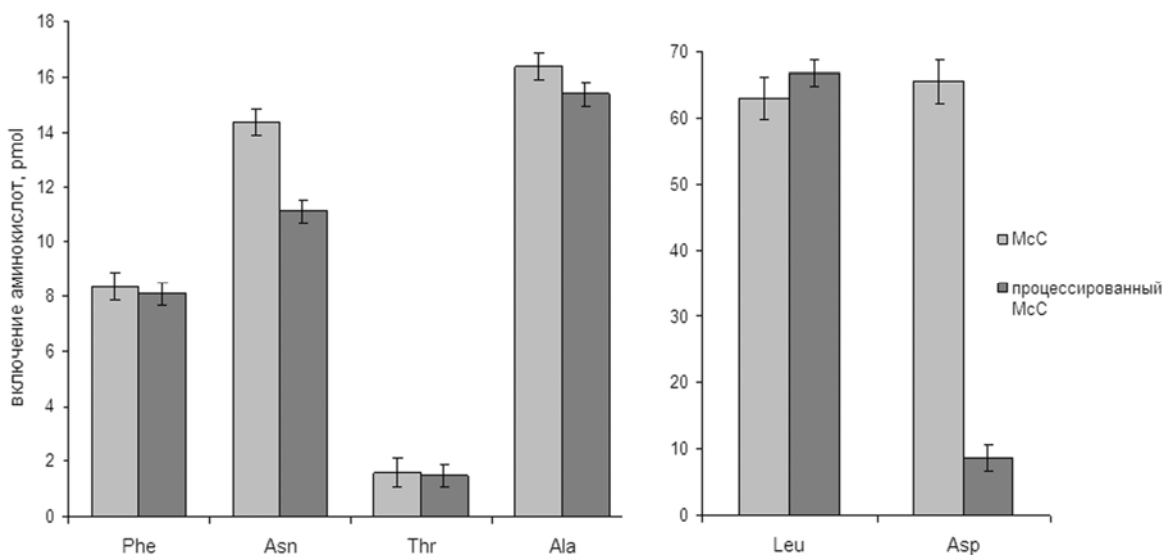
Далее было показано, что именно стадия трансляции мРНК в ходе синтеза белка подавляется процессированным МсС (рис. 4а). Оставалось непонятным, почему в бесклеточной системе транскрипции-трансляции не происходит процессирования микроцина, поскольку система содержит экстракт тех же клеток, что и в опытах по превращению интактного микроцина в активную форму. Причиной может служить низкая концентрация необходимых ферментов: концентрация экстракта для процессирования превышала в несколько раз концентрацию такого же экстракта в системе синтеза белка.

Для ответа на вопрос, что же является мишенью микроцина С, было проверено действие процессированного МсС на трансляцию полиуридилевой кислоты, поли(У). Результатом такой трансляции является синтез полимеров фенилаланина. При этом количество синтезированного продукта не зависит от присутствия антибиотика в системе трансляции (рис. 4б). Это прямо указывает на отсутствие ингибирования микроцином факторов элонгации трансляции, таких функций рибосомы, как кодон-зависимое связывание тРНК<sup>Phe</sup>, транспептидация и транслокация, а также аминоацилирование тРНК<sup>Phe</sup>. Из этого следует, что предполагаемой мишенью антибиотика могут быть факторы инициации или терминации трансляции, либо тРНК-синтазы (ARS), отличные от PheRS. Последнее предположение было проверено, поскольку в его пользу свидетельствовала химическая структура микроцина С, напоминающая модифицированный аминоациладенилат, а именно аспартиладенилат (см. рис. 1). Действительно, оказалось, что реакция аминоацилирования тРНК аспаратом подавляется, в то время как реакции с участием других аминокислот – нет. Рис. 5 иллюстрирует этот результат. При этом в присутствии не подвергнутого процессированию МсС, как и в контроле без антибиотика (данные не показаны, результат совпадает с интактным МсС), реакция присоединения аспартата к тРНК не подавляется. Требовалось найти доказательства того, что аспартил-тРНК-синтаза (AspRS) является единственной мишенью процессированного микроцина С. Убедительным доказательством стало бы восстановление работы ингибированной системы трансляции после внесения недостающего субстрата, продукция которого была прекращена микроцином, а именно аспартил-тРНК.



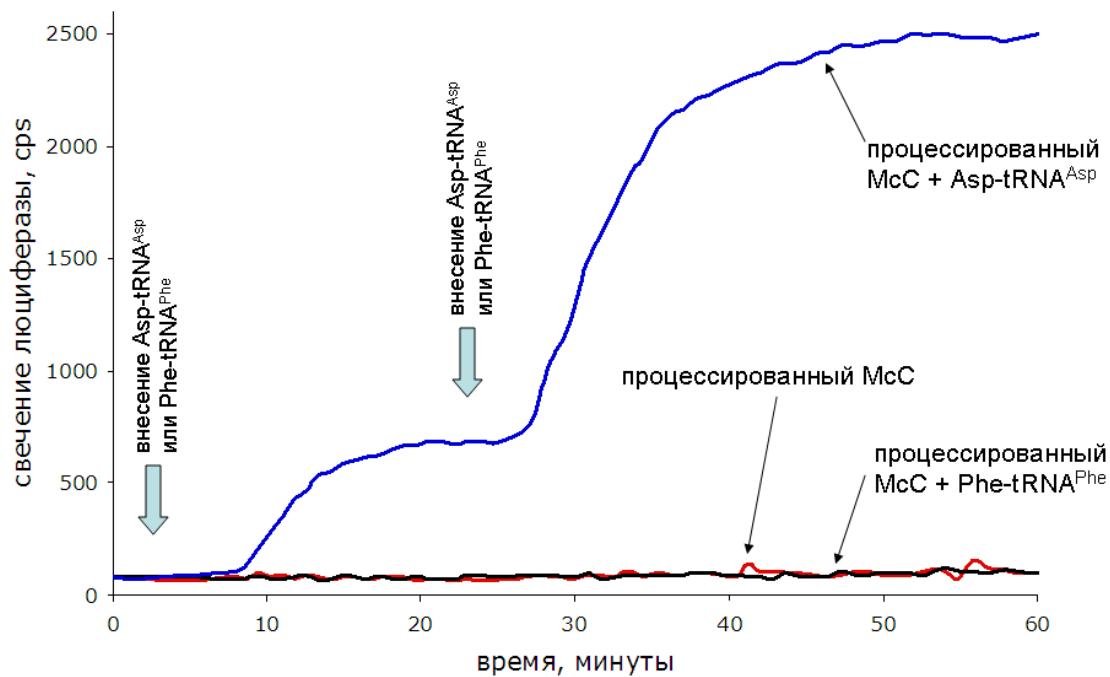


**Рисунок 4.** Действие процессированного микроцина С на бесклеточную систему трансляции мРНК люциферазы и полиуридиловой кислоты. **(А)** Процессированный микроцин добавлен в систему бесклеточной трансляции мРНК люциферазы. Трансляция полностью подавлена. **(Б)** Трансляция поли(У) в бесклеточной системе. Синтез полифенилаланина измеряли по включению радиоактивно меченого фенилаланина во фракцию осадка, нерастворимого в горячей ТХУ на 30 минуте реакции. Ни интактный, ни процессированный микроцины не подавляют трансляцию поли(У).

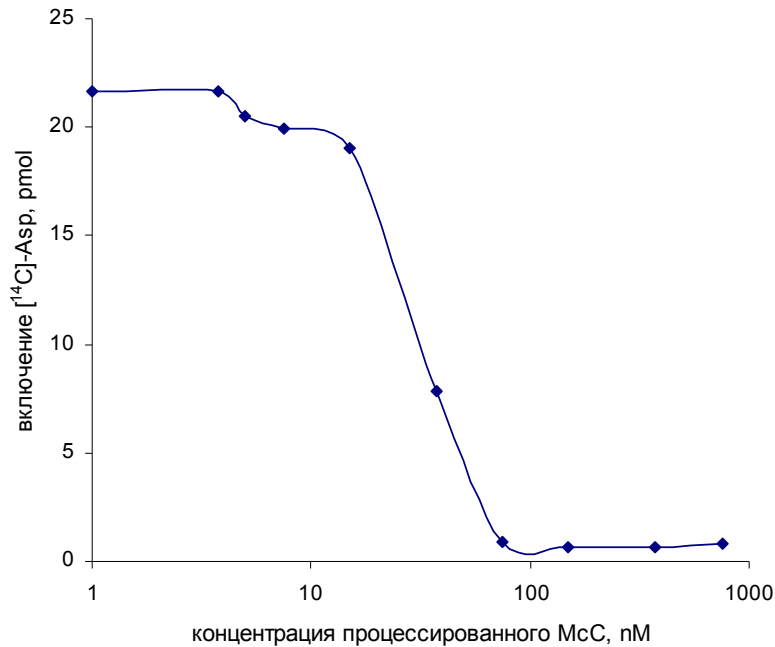


**Рисунок 5. Аминоацилирование тРНК в присутствии микроцина.** Аминоацилирование проводили в присутствии 1% экстракта S30 из *E.coli*, суммарной прокариотической тРНК и индивидуальных радиоактивно меченных аминокислот. Количество образовавшейся аминоксил-тРНК измеряли по включению радиоактивной метки во фракцию, осаждаемую холодной ТХУ.

Аспартил-тРНК была синтезирована, препарат очищен от примесей и внесён в систему трансляции, подавленную процессированным антибиотиком. В качестве контроля использовали внесение фенилаланил-тРНК, полученную в таких же условиях. Для большей убедительности эксперимента вносили аминоксил-тРНК в каждую из реакций дважды. При добавлении аспартил-тРНК в ингибированную микроцином систему трансляции мРНК люциферазы наблюдается восстановление накопления активной люциферазы. После истощения внесённого запаса аспартил-тРНК накопление светящейся люциферазы прекращается. Повторное внесение дополнительного количества аспартил-тРНК приводит к восстановлению синтеза люциферазы, опять до момента истощения внесённого запаса. Внесение фенилаланил-тРНК не вызвало восстановления синтеза белка в подавленной процессированным микроцином С системе трансляции (рис. 6).

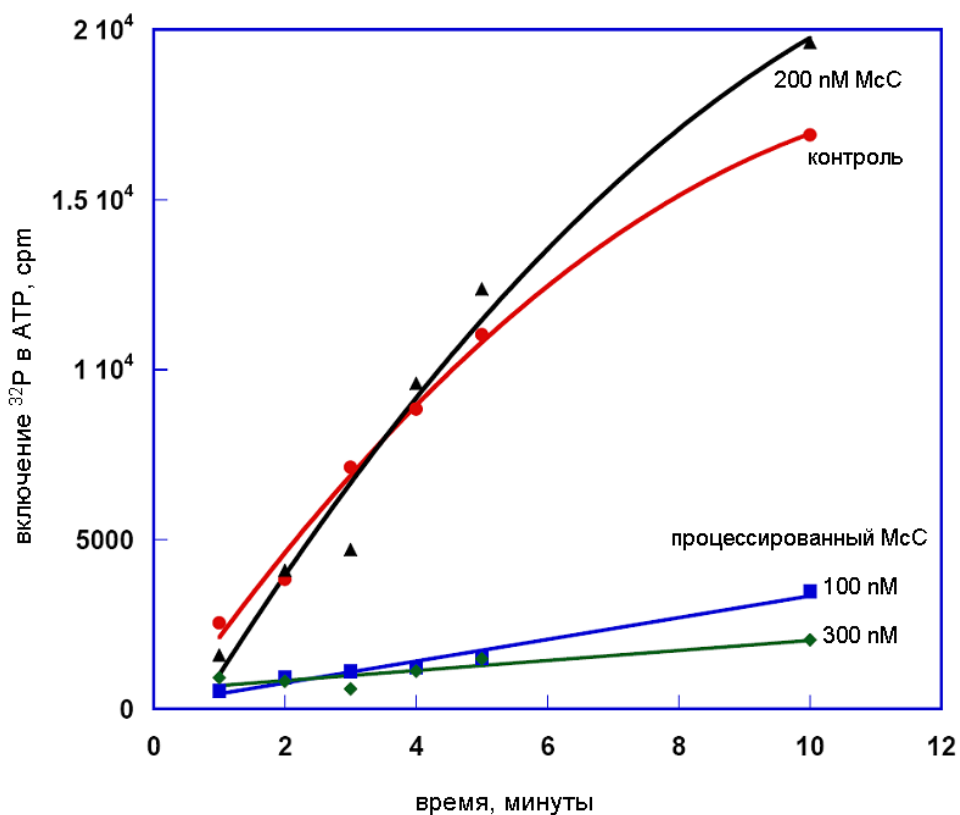


**Рисунок 6. Восстановление синтеза люциферазы в бесклеточной системе трансляции, ингибированной процессированным микроцином С.** Синтез белка проводили в трёх независимых пробах бесклеточной системы трансляции люциферазной мРНК в присутствии процессированного микроцина, добавленного в ингибирующей концентрации. В процессе инкубации в пробы дважды (отмечено стрелками) вносили аспартил-тРНК, или фенилаланил-тРНК, или ничего не вносили. Наблюдали за восстановлением синтеза белка по нарастанию количества синтезируемой люциферазы, измеренного по её активности.



**Рисунок 7. Ингибирование аминоацилирования процессированным МсС в реакционной смеси из изолированных и очищенных компонентов.** Реакцию проводили, используя очищенную рекомбинантную AspRS из *F. tularensis* в присутствии процессированного МсС, добавленного в указанной концентрации. Измеряли включение радиоактивного аспартата в осадок, нерастворимый в холодной ТХУ.

Для того, чтобы прямо показать взаимодействие процессированного антибиотика с тРНК-синтетазой, использовали изолированную и очищенную рекомбинантную AspRS из *F. tularensis*, гомологичную ферменту из *E.coli* на 58%. Правомерность этого опыта следует из чувствительности к интактному микроцину С представителей как грам-положительных, так и грам-отрицательных бактерий. Кроме того, тРНК-синтазы имеют очень консервативный активный центр, что предполагает связывание антибиотика практически с любой прокариотической AspRS. Так или иначе, предположение было подтверждено экспериментальными данными. Видно, что в диапазоне концентраций процессированного микроцина от 20 до 100 нМ активность синтетазы из *F. tularensis* изменяется от почти не пониженной при 20 нМ антибиотике до полностью подавленной при 100 нМ (см. рис. 7). Концентрация аспартил-тРНК-синтетазы в этом эксперименте составляла 40 нМ. Следовательно, можно с уверенностью утверждать, что весь фермент связался с антибиотиком при 100 нМ концентрации микроцина.

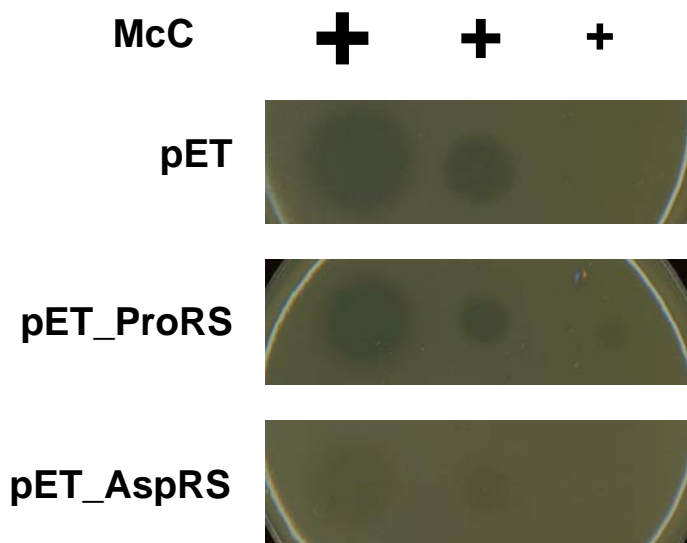


**Рисунок 8. Реакция обмена фосфата между  $PP_i$  и АТР.** Для реакции обмена использовали рекомбинантную AspRS из *F. tularensis* в концентрации 30 нМ, радиоактивно меченный пирофосфат, немеченый АТР, интактный микроцин (200 нМ), процессированный микроцин (100 и 300 нМ). За ходом реакции следили по появлению радиоактивного АТР.

Следующий эксперимент был поставлен для того, чтобы выяснить, какую именно стадию рабочего цикла аминоацил-тРНК-синтетазы ингибирует процессированный микроцин. Для этого проверили, происходит ли реакция обмена радиоактивно меченного фосфата между неорганическим пирофосфатом и АТР в присутствии антибиотика. Результат на рис. 8 показывает, что такой обмен эффективно подавляется микроцином. Таким образом, получено прямое указание на то, что микроцин подавляет первую стадию в работе фермента, называемую активацией аминокислоты.

Суммировав все приведённые выше результаты, можно сделать вывод, что процессированный микроцин С подавляет в бесклеточной системе трансляции аспартиловую тРНК-синтетазу, а именно стадию активации аминокислоты в работе фермента. Следовало также проверить, является ли мишень микроцина, идентифицированная в опытах *in vitro*, мишенью антибиотика в живой клетке. Для

ответа на этот вопрос клетки трансформировали экспрессионным вектором, несущим гены либо аспартиловой, либо пролиловой тРНК-синтетазы (в контроле – вектор без вставки) и наблюдали за появлением полной или частичной устойчивости к интактному микроцину. Мы предположили, что увеличение количества AspRS в клетке увеличит устойчивость клетки к антибиотику, подавляющему работу AspRS, в то время как наличие избытка другой тРНК-синтетазы (в данном случае – ProRS) не повлияет на устойчивость клетки к микроцину.

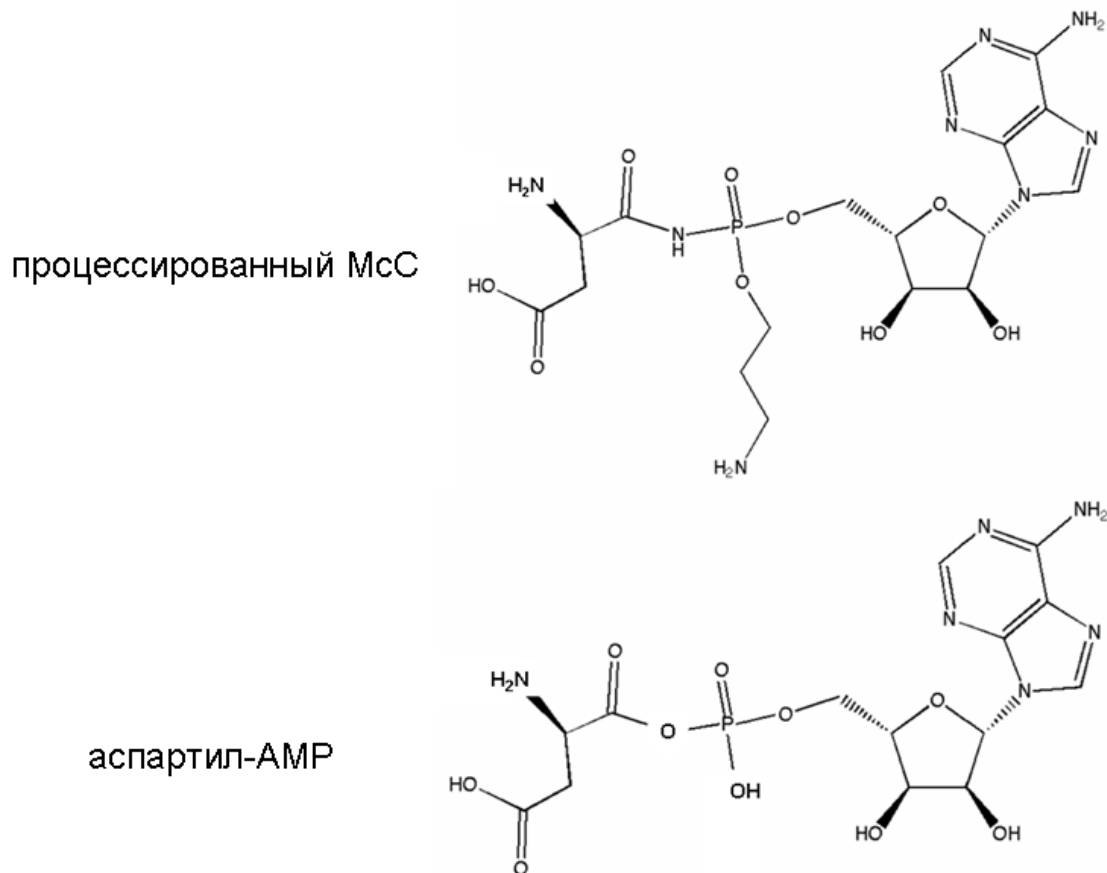


**Рисунок 9. Подавление роста клеток интактным микроцином С при сверхэкспрессии генов аминоксил-тРНК-синтаз.** На слой мягкого агара, содержащего клетки, несущие векторы pET, pET\_ProRS, pET\_AspRS, наносили капли раствора с McC в трёх концентрациях. После впитывания капель в агар чашки Петри инкубировали 5-8 часов при 37 °С для образования газона клеток. На месте нанесения микроцина образовывались прозрачные зоны подавления – в этих зонах клетки не вырастали.

На рис. 9 представлены результаты этого эксперимента. Нетрудно видеть, что сверхэкспрессия гена аспартиловой тРНК-синтетазы даёт возможность клеткам расти в присутствии микроцина С, в то время как рост контрольных клеток (вектор без вставки) и клеток, экспрессирующих ген пролиновой тРНК-синтетазы, был полностью подавлен.

В зрелом микроцине С седьмой остаток (аспартиловый) соединён с АМР посредством нехарактерной для клетки N-ацилфосфорамидной связи. Если убрать первые шесть аминокислот гептапептида, то получится аспарат, соединённый с АМР негидролизуемой (ферментами клетки) связью. Такая структура очень похожа на аминоксиладенилат – продукт первой стадии рабочего цикла аспартил-тРНК-

синтетазы (см. рис. 10), который, в свою очередь, является субстратом второй реакции – переноса аминокислоты на тРНК.



**Рисунок 10. Сравнение структур аспартил-AMP, природного субстрата для реакции аминокислотирования, и процессированного микроцина.**

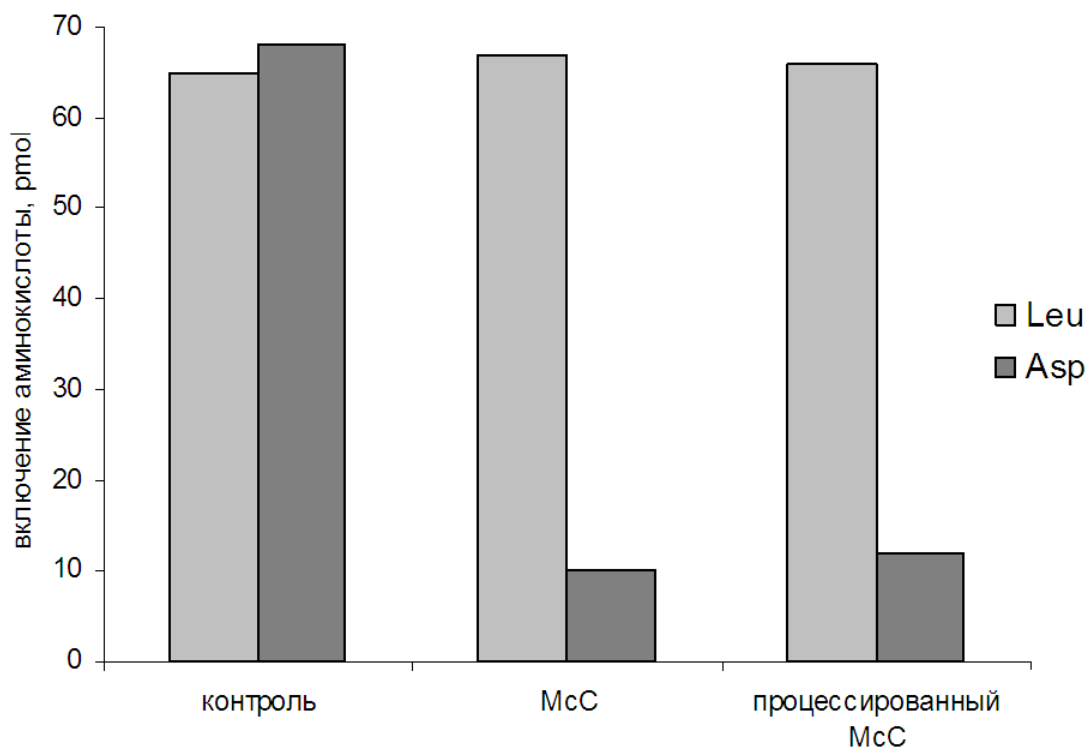
Мы предположили, что процессированный микроцин подавляет работу аспартил-тРНК-синтетазы именно благодаря такой «молекулярной мимикрии». Очевидно, что для образования антибиотика, обладающего нерасщепляемой синтетазой связью между аспартатом и AMP, необходимо удалить шесть N-концевых аминокислотных остатков. Для проверки этой гипотезы наблюдали за изменениями молекулярной массы микроцина и его активности в процессе инкубации с экстрактом из клеток *E.coli*. Рассчитанная молекулярная масса интактного микроцина С составляет 1178 Да; это же значение определяется с помощью масс-спектрометрии. После выдерживания антибиотика с клеточным экстрактом пик 1178 Да в масс-спектре исчезает, но появляется пик вещества массой 519 Да. Очищенный «исходный» микроцин обладает антибактериальным действием, но не способен подавлять бесклеточную систему аминокислотирования. Очищенное

вещество с массой в 519 Да не действует на бактерии, но подавляет бесклеточную систему аминоацилирования, то есть обладает активностью гипотетического процессированного микроцина С. Вещество с молекулярной массой 519 Да было проанализировано методом ЯМР, который подтвердил наше предположение – это микроцин С, лишённый шести N-концевых аминокислотных остатков. Более того, измеренная молекулярная масса в 519 Да совпадает с рассчитанной массой негидролизуемого аналога аспартил-аденилата. Важное следствие из этого открытия – наличие обязательной стадии процессинга, осуществляемой клеточными ферментами (ферментом).

Активированная аминокислота – аминоациладенилат – является субстратом реакции присоединения аминокислоты к тРНК и у прокариот, и у эукариот. Это позволяет предположить, что процессированный микроцин С оказывает такое же ингибирующее действие на аспартил-тРНК-синтетазу ядерных организмов. Мы провели реакцию аминоацилирования в бесклеточном экстракте из зародышей пшеницы, добавляя в экстракт процессированный либо интактный микроцин. На рис. 11 представлен результат этого опыта: аминоацилирующую активность эукариотического экстракта подавлял не только процессированный антибиотик, но и интактный. Видимо, пептидазная активность в пшеничном экстракте настолько высока, что процессинг успевает пройти до или во время начала реакции аминоацилирования. Альтернативным объяснением высокой ингибиторной активности интактного микроцина С в эукариотической системе трансляции может служить предполагаемое различие пространственных структур бактериальной и растительной AspRS: не исключено, что растительный фермент способен связывать непроецессированный антибиотик. Для контроля специфичности действия микроцина мы проверили его влияние на аминоацилирование тРНК другими аминокислотами (в данном случае – Leu). Видно, что McC не оказывает влияния на аминоацилирование лейцином (рис. 11).

Насколько прочно связывание активного антибиотика с мишенью? Для ответа на этот вопрос был проведен следующий опыт с аспартил-тРНК синтетазой из *F. Tularensis*, имеющей 6 гистидиновых остатков на С-конце, что позволяло выделять фермент из реакционных смесей.

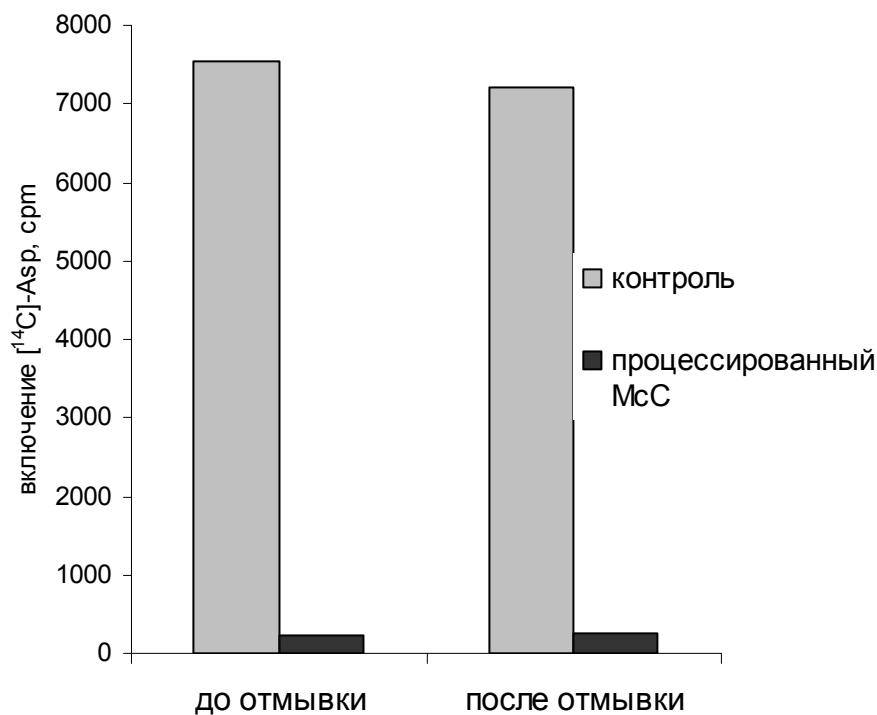




**Рисунок 11. Аминоацилирование тРНК в экстракте зародышей пшеницы в присутствии микроцина С и его процессированной формы.** За ходом реакции следили по включению радиоактивно меченной аминокислоты (аспартата или лейцина) во фракцию осадка, нерастворимого в холодной ТХУ.

С таким ферментом провели реакцию аминоацилирования в присутствии и в отсутствие процессированного микроцина. В присутствии антибиотика фермент терял аминоацилирующую активность, в то время как контрольный фермент (без антибиотика) остался активным. Эти два образца были нанесены на Ni-содержащую колонку и подвергнуты промывке буфером. После элюции фермента с колонки была проведена повторная реакция аминоацилирования, которая показала, что синтетаза с подавленной активностью осталась неактивна, в то время как контрольный фермент имел активность, сравнимую с таковой до процедуры отмывки (рис. 12). Этот опыт указывает на чрезвычайно прочное связывание микроцина с его мишенью. Можно предположить, что взаимодействие антибиотика с синтетазой идёт по пути конкуренции микроцина с субстратами фермента. Такое предположение подразумевает, что в присутствии субстратов и ингибитора фермента должно возникать равновесие между ферментами, связанными с субстратами, и ферментами,

связанными с ингибиторами. Увеличивая концентрацию субстратов, можно вытеснить весь антибиотик из активного центра и сместить равновесие в сторону активных ферментов. Для проверки этого предположения был проведён эксперимент, описанный выше, с той разницей, что аспартиловую тРНК-синтетазу промывали на колонке буфером, содержащим АТФ и аспарагиновую кислоту. Результат такого эксперимента совпал с предыдущим (рис. 12). Это может быть ещё одним доказательством того, что тРНК-синтетаза работает как клешня – «закрывается», держа субстрат (или антибиотик) в активном центре до полного завершения реакции. Так как в случае с антибиотиком следующая стадия реакции аминоацилирования идти не может, то фермент оказывается «закрытым» навсегда.



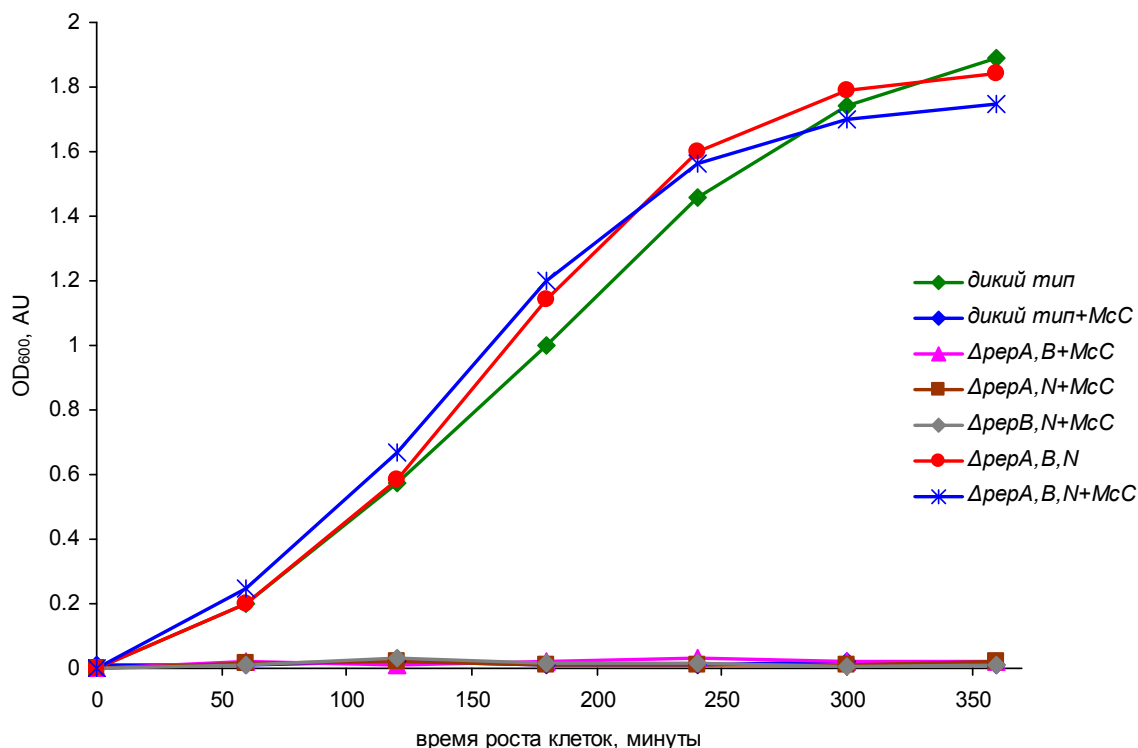
**Рисунок 12. Реакция аминоацилирования до и после отмывки иммобилизованной на колонке аспартил-тРНК-синтетазы буфером.** Описание эксперимента см. в тексте.

Экспериментальные данные позволяют заключить, что механизм действия микроцина С описывается моделью «троянского коня»: антибиотик неактивен в среде, клетка-мишень активно транспортирует его внутрь цитоплазмы, где антибиотик продолжает оставаться безвредным для клетки, пока не подвергнется процессингу клеточными пептидазами.

## Процессинг микроцина С в цитоплазме клетки-мишени

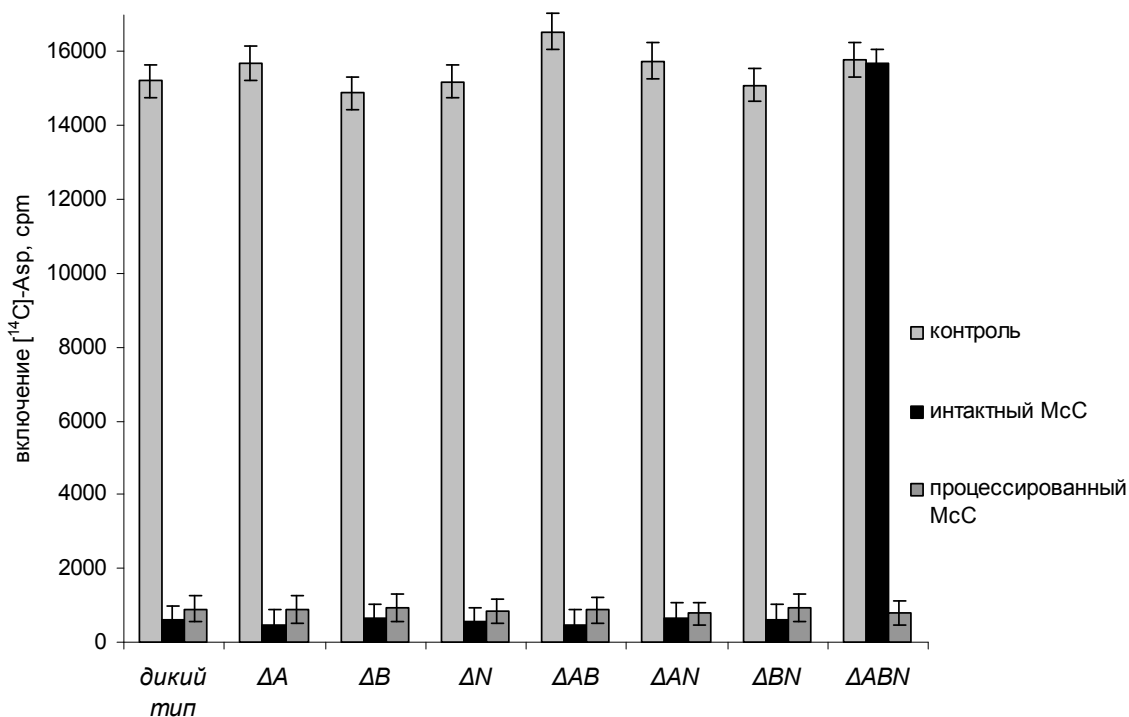
Новиковой и коллегами было показано, что транспорт микроцина С в клетку-мишень осуществляется белками-транспортёрами, закодированными в *uej*-локусе, относящимися к ABC-транспортёрам. Но оставалось неизвестным, какие ферменты бактериальной клетки-мишени осуществляют процессинг микроцина, превращая его из неактивной олигопептид-нуклеотидной химерной структуры в сильный ингибитор аспартил-тРНК-синтетазы, имитирующий активированную аминокислоту. Метод введения статистических нарушений генов с помощью транспозона не позволил найти клетки, имеющие внутриклеточную устойчивость к микроцину. Таким методом Новиковой и коллегами были найдены гены, ответственные за транспорт микроцина в клетку через цитоплазматическую мембрану. Выключение любого из генов транспорта локуса *uej* приводит к нарушению транспорта. Отсутствие мутантов, устойчивость которых обусловлена изменением внутриклеточной мишени, легко объяснимо: тРНК-синтетаза – критичный фермент для клетки, и изменение его активного центра несовместимо с жизнеспособностью клетки. Однако отсутствие мутаций по ферментам процессинга микроцина навело нас на мысль, что процессинг может осуществляться несколькими взаимозаменяемыми белками. Наши наблюдения позволяют сделать вывод, что гидролиз шести аминокислот осуществляют пептидазы, общие для большинства прокариотических клеток, так как цитоплазма любых проверенных нами клеток способна процессировать микроцин С (мы проверили экстракты из большого числа штаммов на процессирующую активность и чувствительность к микроцину, данные не приведены). Кроме того, интактный микроцин должен быть процессирован либо с N-конца, либо внутри последовательности гептапептида, но никак не с C-конца, закрытого для терминального гидролиза присоединённым АМР. На основании этих предположений и предпосылок, мы стали искать предполагаемые ферменты среди аминокислотидаз. Так, были проверены делеционные мутанты по наиболее универсальным (с широкой специфичностью) аминокислотидазам: А, В, N, D, Т и олигопептидазе. Клетки с такими одиночными мутациями были чувствительны к интактному микроцину, а экстракт из этих клеток был способен процессировать микроцин *in vitro*. Тогда мы стали проверять двойные и тройные мутанты. Устойчивыми к микроцину оказались только клетки с тройной мутацией *ΔperAΔperBΔperN*. На рис. 13 видно, что рост клеток

двойных мутантов полностью подавлен микроцином, в то время как тройной мутант устойчив и рост его клеток совпадает с контрольным ростом. На рисунке не приведены данные, показывающие, что все полученные нами мутантные клетки росли при 37 °С на богатой жидкой и твёрдой средах без видимых отличий от контрольного штамма, имеющего все пептидазы.



**Рисунок 13. Рост клеток в жидкой среде в присутствии McC.** За процессом роста клеток следили по увеличению оптической плотности среды при 600 нм. Дикая тип – исходный штамм, на основе которого были получены делеционные мутанты по пептидазам A, B, N.

Таким образом было установлено, что ни одна из проверенных пептидаз не является единственной ответственной за процессинг микроцина. Напротив, любая из трёх пептидаз, A, B или N, способна сделать клетку чувствительной к интактному микроцину. Чтобы доказать, что процессинг не происходит в цитоплазме тройного мутанта, но способен происходить в присутствии любой из этих трёх аминокислот, инкубировали интактный микроцин в экстрактах из мутантных клеток, с последующим проведением реакции аминокислотирования в этих экстрактах. В качестве положительного контроля вносили в экстракты процессированный McC.

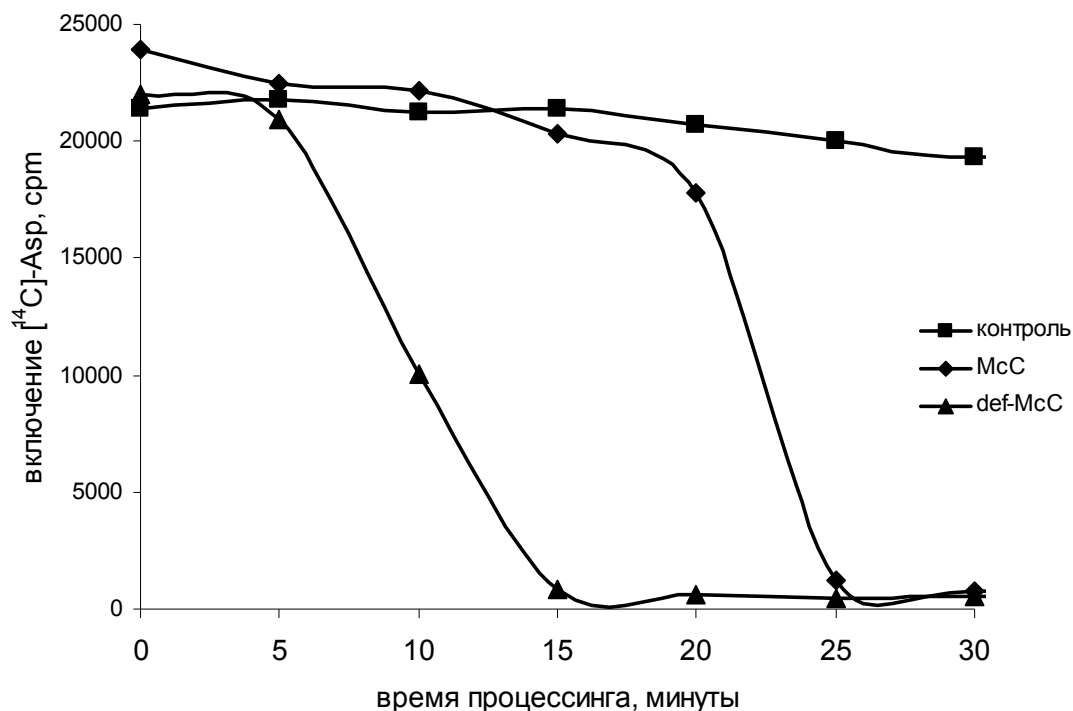


**Рисунок 14. Реакция аминоацилирования в экстрактах клеток, мутантных по генам пептидаз.** S30 экстракты клеток инкубировали с интактным или процессированным микроцином С 1 час при 37<sup>0</sup>С, после чего экстракты использовали в реакции аминоацилирования. За ходом реакции следили по включению радиоактивно меченого аспаргата во фракцию осадка, нерастворимого в холодной ТХУ.

Все мутанты, кроме тройного по пептидазам А, В и N, способны процессировать интактный микроцин С в своей цитоплазме (рис. 14). Мы с уверенностью можем утверждать, что любая из аминопептидаз А, В или N способна процессировать McC. Этот вывод хорошо согласуется с представлениями о том, что перечисленные пептидазы обладают широкой субстратной специфичностью и могут отщеплять аминокислотные остатки, из которых состоит олигопептидная часть микроцина. Однако, аминопептидазы А, В и N отщепляют только N-концевые аминокислоты, в то время как зрелый (интактный) McC содержит формилированный метионин. В самом деле, пептидная часть микроцина синтезируется рибосомой, поэтому несёт формильную группу на первом метионине, как и все синтезированные *de novo* белки. Ни одна из трёх пептидаз не способна удалять формил-метионин. Формильную группу белка может удалить только специальный клеточный фермент – пептидная деформилаза (PDF). И уже после этого шага первый метионин может быть удалён метионин аминопептидазой (MAP). Активность метиониновой

аминопептидазы зависит от контекста, так называемого правила N-конца. В случае микроцина метионин может быть удалён любой из аминопептидаз с широкой специфичностью.

Далее мы проверили, как сказывается отсутствие таких важных пептидаз в клетке на продукцию микроцина. Для этого клетки, несущие тройную мутацию в генах пептидаз, трансформировали микроциновой плазмидой рУНАВ, содержащей все гены для синтеза антибиотика. Трансформанты производили антибактериальное вещество с молекулярной массой в 1150 Да, в отличие от 1178 Да интактного микроцина, производимого клетками дикого типа. При более подробном рассмотрении масс-спектров микроцина, синтезируемого диким типом клеток, также был обнаружен минорный пик в 1150 Да помимо пика интактного микроцина в 1178 Да. Разница в массе величиной в 28 Да соответствует массе формильной группы первого метионина. Анализ продукта массой в 1150 Да с помощью ЯМР подтвердил наше предположение: эта структура представляет собой интактный микроцин С, лишённый формильной группы. Таким образом, отсутствие в клетках пептидаз А, В и N приводит к синтезу только деформилированного микроцина. Можно предположить, что это обусловлено наличием обратной связи между аминопептидазами и деформилазой. Так или иначе, у нас появилась возможность сравнить процессинг интактного и деформилированного (def-McC) микроцинов в клеточном экстракте из чувствительных клеток. В реакционные смеси для аминокислотирования добавляли одинаковое количество интактного или деформилированного микроцина и определяли скорость процессинга микроцинов по подавлению включения меченного аспартата во фракцию тРНК. Как следует из результатов (рис. 15), деформилированный микроцин процессируется примерно на 10 минут быстрее (почти в 2 раза). Так как эти два типа McC отличаются только формильной группой, то можно заключить, что процессинг микроцина С происходит с самого N-конца и половину времени процессинга занимает стадия отщепления формильной группы первого метионина.



**Рисунок 15. Скорость процессинга intactного (McC) и деформированного (def-McC) микроцинов.** S30 экстракт клеток *E. coli* дикого типа инкубировали в присутствии McC или def-McC, через каждые 5 минут отбирая аликвоты смеси и проводя в них реакцию аминокислотирования. За ходом реакции следили по включению радиоактивно меченого аспаргата во фракцию осадка, нерастворимого в холодной ТХУ.

Для ответа на вопрос, участвует ли метиониновая аминоксептидаза в процессинге микроцина, провели следующий эксперимент. Intактный и деформированный микроцины инкубировали в экстрактах из клеток дикого типа и мутанта *ΔреpAΔреpBΔреpN*. После инкубации измеряли молекулярную массу микроцинов с помощью масс-спектрометрии. Как и следовало ожидать, в экстрактах из клеток дикого типа микроцины оказались полностью процессированными. В экстрактах, лишённых трёх пептидаз, def-McC сохранил массу 1150 Да, то есть не подвергся процессингу. Intактный McC массой в 1178 Да превратился в деформированный с массой 1150 Да. Следовательно, в отсутствие пептидаз А, В и N может происходить только отщепление формильной группы, но даже шаг удаления первого метионина с помощью MAP не происходит. Это объясняется наличием остатка аргинина во втором положении пептидной части микроцина: активность MAP намного слабее в таком контексте.

Имеет ли деформированный микроцин более высокую антибактериальную активность благодаря более быстрому процессингу в клетке? Для ответа на этот

вопрос сравнили действие интактного McC и def-McC *in vivo* при разных концентрациях микроцинов. Неожиданностью оказался тот факт, что активность def-McC была в несколько раз ниже таковой интактного микроцина (данные не приведены). Мы пришли к заключению, что формильная группа на N-конце пептидной части микроцина играет важную роль в процессе транспорта антибиотика в клетку-мишень.

Выводы из этой части работы таковы: процессинг McC в клетке-мишени осуществляется только четырьмя ферментами – деформилазой и тремя пептидазами, которые одинаковы в своей способности гидролизовать олигопептидную часть микроцина. Кроме того, наличие формильной группы у интактного McC важно для транспорта микроцина внутрь клетки.

### **Структурно-функциональный анализ микроцина С**

Благодаря тому, что пептидная часть микроцина закодирована геном, McC поддается структурному анализу активности, который можно провести стандартными генно-инженерными методами. В то время как иницирующий кодон *тссА* нельзя мутировать без влияния на трансляцию мРНК *МссА*, мутации в остальных шести кодонах могут быть использованы для изучения эффектов замещения аминокислоты при созревании McC, при транспорте в клетку-мишень, при процессинге внутри цитоплазмы и при ингибировании фермента-мишени. Нами был создан и проанализирован набор из 114 точечных мутантов, полученных из гена *тссА* (6 *тссА* кодонов X 19 вариантов аминокислот недикого типа).



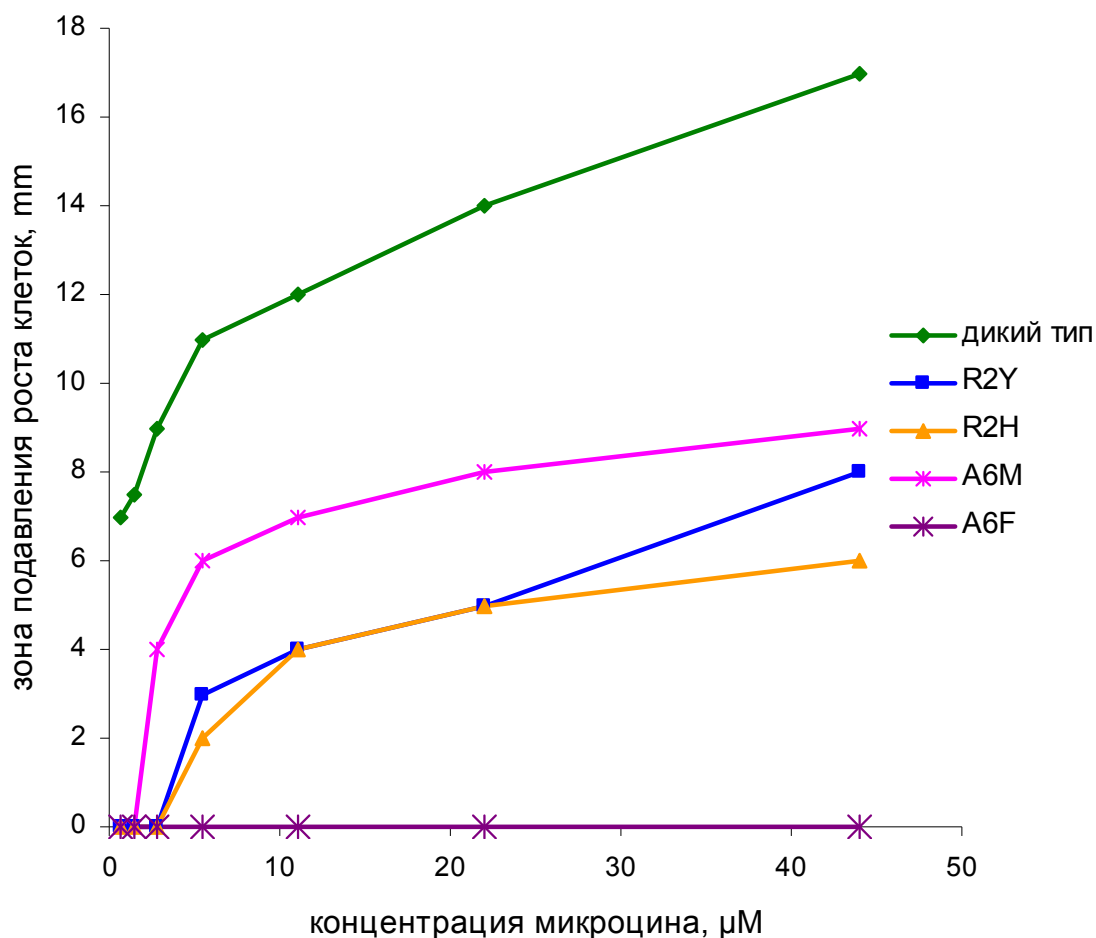


использовали клетки DH5a, из которых был получен дикий тип McC, а также клетки, которые несут в себе векторную плазмиду без генов *mcc*. Спустя 12 часов инкубации при температуре 37 °C колонии клеток, содержащих плазмиды с индивидуальными мутациями *mccA*, были покрыты мягким агаром M63 с содержанием клеток *E. coli*, чувствительных к микроцину. Было отмечено, что после 5 часовой инкубации при температуре 37 °C вокруг колоний клеток, несущих гены *mcc*, появились зоны ингибирования. Прозрачные зоны ингибирования, в которых не было клеточного роста, были легко заметны на мутном фоне слоя чувствительных клеток. Результаты этого исследования схематично изображены на рисунке 16.

Вокруг колоний, несущих плазмиды с 28 вариантами точечных мутаций в гене *mccA*, можно было увидеть чёткие зоны ингибирования. Размеры зон ингибирования соответствовали или превосходили размеры зон ингибирования, созданных клетками, содержащими дикий тип плазмиды pUNAV. Во всех 28 случаях масс-спектральный анализ культуральной среды показал наличие ожидаемой ионной массы, соответствующей мутантным микроцинам. Для мутантов, которые не образовывали зон подавления чувствительных клеток, мы так же провели поиск теоретически рассчитанных масс, однако их удалось обнаружить только в четырёх случаях (голубой и розовый цвет на рис.16): R2Y, R2H, A6M, A6F. Так как эти мутантные формы микроцина C секретировались в среду, но не оказывали действия на чувствительные клетки (также и в последующих опытах), мы предположили, что либо путь их процессинга в клетке-мишени нарушен, либо их концентрация в среде мала. Для мутантов, присутствия которых не удалось обнаружить в среде, мы предположили нарушение синтеза или транспорта зрелого микроцина наружу клетки-продуцента. Например, может быть нарушен механизм созревания микроцина, так как для белков, отвечающих за созревание, скорее всего важна аминокислотная последовательность гептапептида. С другой стороны, отсутствие экспрессии генов, мутантных по седьмому положению, может быть объяснено отсутствием устойчивости к ним у клетки-продуцента: такие антибиотики, вероятно, поражают другие, соответствующие замене, аминоацил-tРНК-синтазы, а устойчивости у клетки-продуцента к ним быть не может.

Четыре мутанта, которые продуцировались в среду, но не имели антибактериальной активности, были изучены подробно. Эти мутантные формы

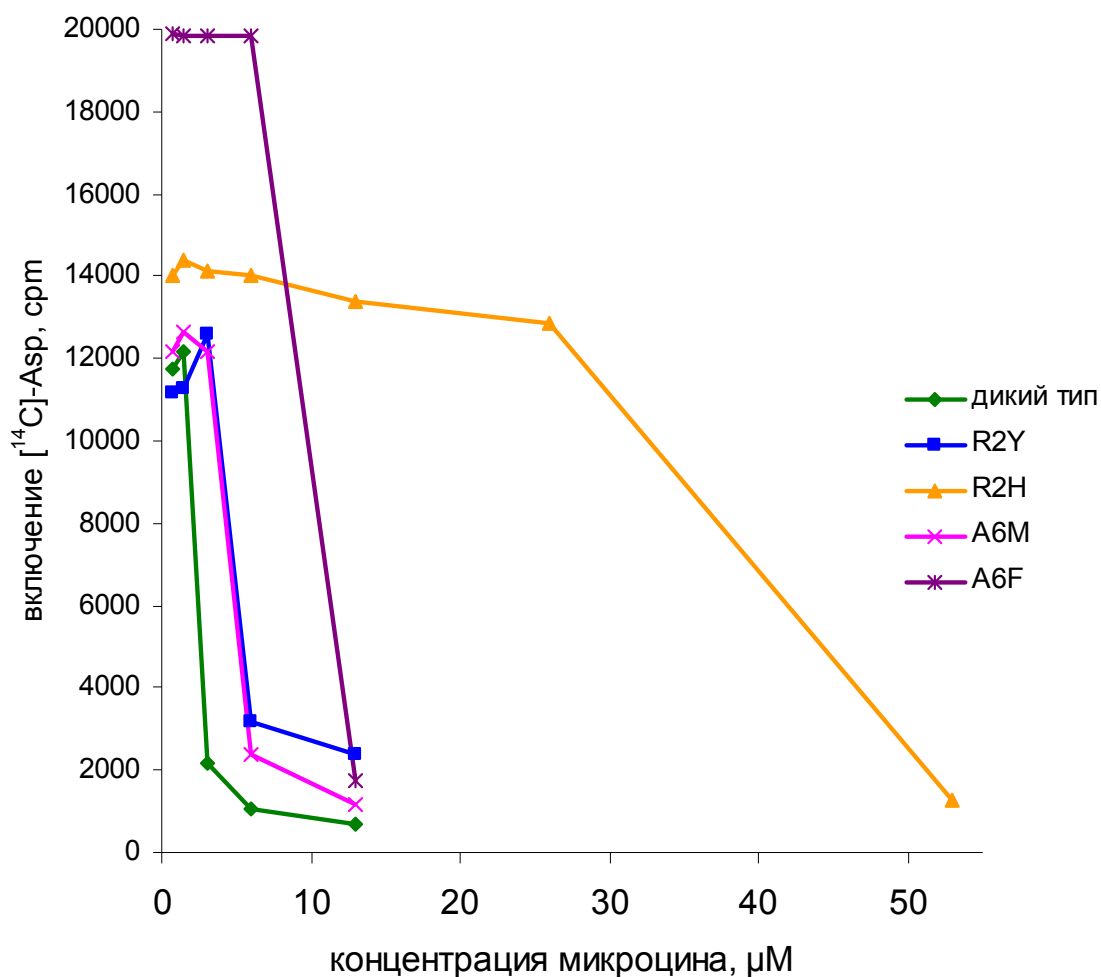
были выделены и очищены, их способность давать зоны подавления роста чувствительных клеток при более высоких концентрациях проверена (рис. 17).



**Рисунок 17.** Измерение антибактериальной активности мутантных форм микроцина С. На газон с чувствительными клетками *E.coli* наносили образцы с разной концентрацией микроцина. По прошествии нескольких часов роста клеток измеряли диаметр зон ингибирования, образованных антибиотиками.

Можно видеть, что зоны, образуемые мутантами R2Y, R2H и A6M как минимум в два раза уступают по размерам зонам от микроцина дикого типа. Мутант A6M вообще не образовывал зон подавления на слое агара с чувствительными клетками. При увеличении концентрации до 200 мкМ появлялись едва заметные мутные зоны (данные не приведены). Низкая эффективность действия этих мутантов *in vivo* может иметь два объяснения: слабое поглощение клетками-мишенями и слабый процессинг мутантов внутри клетки. Возможность того, что мутанты имеют другое сродство к

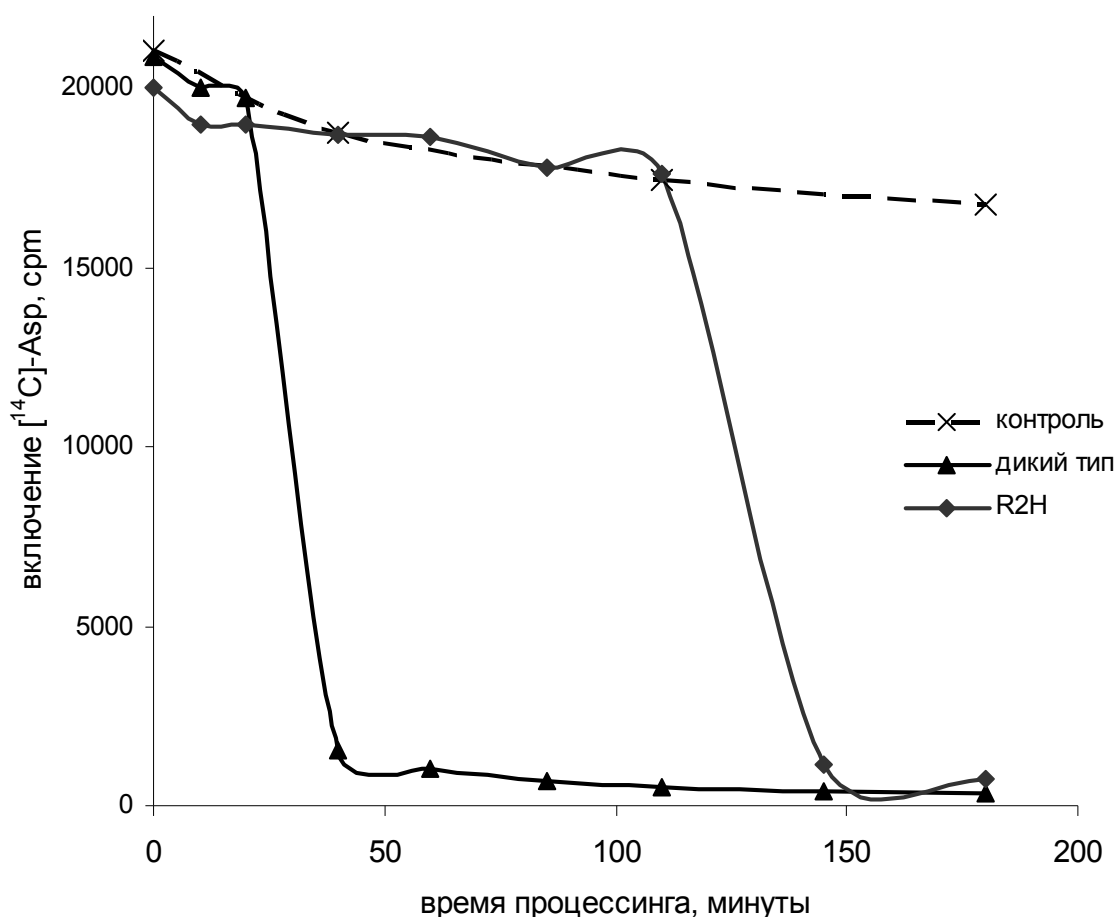
внутриклеточной мишени, следует исключить, так как активная часть (процессированный McC) этих мутантов идентична активной части микроцина дикого типа. Для проверки предположений, приведенных выше, мы провели эксперименты с этими мутантами *in vitro*, сравнив их способность процессироваться и подавлять реакцию аминоацилирования с микроцином дикого типа. Результаты приведены на рис. 18. Видно, что мутанты R2Y и A6M обладают активностью, сравнимой с диким типом. Значит, их слабая антибактериальная активность объясняется нарушением транспорта микроцинов в клетку.



**Рисунок 18. Подавление аминоацилирования мутантными микроцинами.** Дикий тип и мутанты микроцина инкубировали 1 час при 37<sup>0</sup>С в экстрактах S30 из чувствительных клеток *E. coli*, далее эти экстракты использовали в реакции аминоацилирования.

Для одинакового ингибирования аминоацилирования требуется примерно четырёхкратный избыток мутанта A6F по сравнению с диким типом, что говорит о

нарушении его процессинга. Однако, учитывая неспособность этого микроцина подавлять рост клеток *in vivo*, можно с уверенностью заключить, что транспорт этого мутанта нарушен в большей степени, чем у мутантов R2Y и A6M. Неожиданностью оказался тот факт, что для появления *in vitro* активности мутанта R2H потребовалась концентрация этого микроцина, в 80 раз превосходящая концентрацию антибиотика дикого типа. Мы заключили, что именно нарушение процессинга мутанта R2H является причиной его слабого антибактериального действия, так как активная часть, как указывалось выше, в мутантах и диком типе микроцина идентичны. Для проверки этого предположения микроцины мутантного и дикого типов подвергли инкубации разной длительности в экстракте клеток *E.coli* (рис. 19).



**Рисунок 19. Скорость процессинга микроцинов мутантного и дикого типов.** S30 экстракт клеток *E.coli* инкубировали при 37 °С в присутствии одинаковой концентрации микроцина дикого типа или мутанта R2H, взятых в одинаковой концентрации. В процессе инкубации из смесей отбирали аликвоты и в них проводили реакцию аминокислотирования. Контроль – экстракт, инкубированный в таких же условиях, но без микроцина.

Как следует из результатов этого эксперимента, микроцин С дикого типа подавляет реакцию аминоацилирования уже через 30 минут инкубации с клеточным экстрактом. Напротив, для подавления аминоацилирования мутантом R2H требуется 140-минутная инкубация антибиотика с клеточным экстрактом. Таким образом, замена аргинина на гистидин во втором положении гептапептида микроцина снижает скорость процессинга в 4 раза.

Анализ распределения активных и частично активных мутантов микроцина указывает на несколько важных свойств антибиотика. Во-первых, это возможность внесения мутаций во все положения, за исключением седьмого, без нарушения антибиотической активности микроцина. Более того, положения 4 и 5 в олигопептиде наименее требовательны к аминокислотному составу. Это может указывать на отсутствие в этих положениях участка узнавания белками созревания микроцина, а также транспортёрами, которые выкачивают зрелый микроцин наружу клетки-продуцента и закачивают в клетку-мишень. Во-вторых, для транспорта микроцина внутрь клетки оказались важными аминокислоты в крайних положениях. Замена положительно заряженного аргинина на тирозин с жёсткой нейтральной боковой цепью приводит к сильному ухудшению распознавания или транспорта микроцина белками клетки-мишени. К такому же эффекту приводит замена аланина в шестом положении на более массивные аминокислотные остатки метионина и фенилаланина. При этом если замена на метионин существенно ухудшает транспорт McC в клетку, то замена на жёсткую структуру фенилаланина вовсе исключает такую возможность. В-третьих, влияние гистидина во втором положении на скорость процессинга микроцина подтверждает, что гидролиз гептапептида идёт «шаг за шагом» с N-конца антибиотика. Опираясь на полученные данные, можно предположить, что замена положительно заряженного аргинина на положительно заряженный гистидин не сказывается на транспорте микроцина в клетку, но «проблемный» для пептидаз гистидин сильно замедляет процессинг антибиотика. Таким образом, использование микроцина С в качестве зонда может оказаться перспективным для изучения специфичности транспортных белков и пептидаз.

## Выводы

1. Механизм действия микроцина С соответствует модели «тройного коня» – антибиотик активно поглощается клеткой-мишенью, после чего претерпевает процессинг, осуществляемый ферментами клетки, в результате которого приобретает свойства ингибитора.
2. Внутриклеточной мишенью микроцина С является аспартил-тРНК-синтетаза, причём антибиотик способен *in vitro* подавлять как прокариотический, так и эукариотический фермент. Активная часть микроцина представляет собой нерасщепляемый аналог природного субстрата реакции аминоацилирования, аминоациладенилата.
3. Связывание активной части микроцина (процессированного МсС) с внутриклеточной мишенью, по-видимому, необратимо.
4. Пептидная часть зрелого антибиотика играет роль сигнальной последовательности для транспорта микроцина внутрь клетки. N-концевые и C-концевые аминокислотные остатки пептидной части МсС наиболее важны как для созревания антибиотика в клетке-продуценте, так и для транспорта микроцина в клетку-мишень.
5. Процессинг интактного микроцина осуществляет любая из аминопептидаз А, В, N и клеточная деформилаза. Процессинг идёт от N-конца к C-концу. Ключевой фермент деградации белков, МАР, не принимает участия в этом процессе, вместо него первый метионин отщепляет любая из аминопептидаз: А, В или N. Наличие тяжело отщепляемого аминокислотного остатка в пептидной части может значительно замедлить скорость процессинга.

## Публикации результатов и доклады автора работы на конференциях

### Публикации автора работы по этой тематике.

Metlitskaya\*, A., **Kazakov\***, T., Kommer, A., Pavlova, O., Praetorius-Ibba, M., Ibba, M., Krashenninikov, I., Kolb, V., Khmel', I., and Severinov, K. (2006) Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptidenucleotide antibiotic Microcin C. *J. Biol. Chem.*, **281**, 18033-18042.

(\* - авторы внесли одинаковый вклад в работу)

**Kazakov, T.**, Metlitskaya, A., and Severinov, K. (2007) Structure-activity analysis of translation inhibitor microcin C. *J. Bacteriol.*, **189**, 2114-2118.

Severinov, K., Semenova, E., Kazakov, A., **Kazakov, T.**, and Gelfand, M. S. (2007) The post-translationally modified microcins. *Mol. Microbiol.*, **65**, 1380-1394.

**Kazakov, T.**, Vondenhoff, G.H., Datsenko, K.A., Novikova, M., Metlytskaya, A., Wanner, B.L., Severinov, K. (2008) *E. coli* Peptidases A, B, or N Can Process Translation Inhibitor Microcin C. *J. Bacteriol.*, **190**, 2607-2610.

### Представление результатов этой работы на конференциях.

*Molecular Genetics of Bacteria & Phages*

August 7-12, 2007

University of Wisconsin-Madison, WI, USA

Poster presentation, "Molecular Mechanism of Action of Microcin C5I"

(Authors: T.S. Kazakov, A.Z. Metlitskaya, K. Severinov)

*NIAID Region II Center of Biodefense and Emerging Infectious Disease Research*

October 7-9, 2007

Northeast Biodefense Center, NY, USA

Poster presentation, "Molecular Mechanism of Action of Microcin C5I"

(Authors: T.S. Kazakov, A.Z. Metlitskaya, M. Novikova, K. Datsenko, K. Severinov)