

На правах рукописи

Новикова Мария Владимировна

**БИОСИНТЕЗ МИКРОЦИНА С И МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ
КЛЕТОК К АНТИБИОТИКУ**

Специальность 03.00.26 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2009

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Учреждения Российской академии наук Института биологии гена РАН и в группе регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот Учреждения Российской академии наук Института молекулярной генетики РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук
Северинов Константин Викторович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Гельфанд Михаил Сергеевич

доктор биологических наук
Колб Вячеслав Адамович

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт
биоорганической химии им. М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится 27 октября 2009 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.037.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

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

Автореферат разослан ___ сентября 2009 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
канд. фарм. наук

Л. С. Грабовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. С открытия и выделения пенициллина в 30-40-х годах XX века началось массовое применение антибиотиков в качестве медицинских препаратов для лечения заболеваний, вызываемых микроорганизмами. К сожалению, практически в то же время было обнаружено, что постоянное использование одних и тех же антибактериальных соединений может приводить к появлению устойчивости к их действию у микроорганизмов. Ученые предполагают, что в недалёком будущем существующие антибиотики могут исчерпать свой потенциал, так как патогенные микроорганизмы приобретут резистентность к широкому спектру антибактериальных соединений. В связи с этим открытие и исследование новых антибиотиков, а также изучение механизмов устойчивости клеток к ним являются крайне актуальными вопросами современной микробиологии.

В настоящее время широко изучаются микроцины - антибактериальные вещества, продуцируемые энтеробактериями. В отличие от большинства антибиотиков, синтезируемых специальными ферментами без участия рибосом, микроцины - это пептиды, закодированные в ДНК (чаще всего их гены располагаются на плазмидах) и синтезируемые на рибосомах. Характерной особенностью микроцинов является низкая молекулярная масса, не превышающая 10 кДа. Наибольший интерес в последние годы привлекают микроцины, подвергающиеся сложным посттрансляционным модификациям, в результате которых могут образовываться самые необычные структуры. К таким посттрансляционно модифицированным микроцинам и относится микроцин С (McC), а также два других микроцина - микроцин В и микроцин J. Специфический ингибитор ДНК-гиразы микроцин В - богатый остатками глицина пептид, содержащий четыре тиозольных и четыре оксазольных кольца. Микроцин J - пептид, состоящий из 21 аминокислоты и имеющий необычную структуру «протянутого лассо». N-концевой глицин микроцина J образует лактамовую связь с карбоксильной группой остатка глутаминовой кислоты в восьмом положении. В результате образуется кольцо, через которое пропущен C-конец молекулы. Микроцин J ингибирует транскрипцию, связываясь с аминокислотными остатками вторичного канала бактериальной РНК-полимеразы и предотвращая доступ субстратов (рибонуклеозидтрифосфатов) к каталитическому центру.

McC является нуклеотид-гептапептидом, который ингибирует синтез белка в чувствительных клетках. Его структура и механизм действия были открыты сотрудниками Института молекулярной генетики РАН и Института биологии гена РАН. Мишенью McC является одна из аминоацил-tРНК-синтетаз - аспартил-tРНК-синтетаза (AspRS). Сам нуклеотид-гептапептид является неактивной транспортной формой антибиотика; для перехода в активное состояние McC должен подвергнуться процессингу внутриклеточными пептидазами. В

результате высвобождается активная часть - негидролизуемый аспартил-аденилат (процессированный МсС), который и ингибирует AspRS.

Такой необычный механизм действия по аналогии со стратегией, использованной древними греками для захвата Трои, получил название стратегия Троянского коня. Подобный механизм действия также описан для ряда других антибиотиков (альбомицина, агроцина 84, фосфонептидов).

Следует отметить, что к моменту начала данной работы МсС являлся наименее изученным антибиотиком в группе посттрансляционно модифицированных микроцинов. Кроме его структуры и открытого недавно механизма действия, оставались не до конца изученными синтез МсС, его процессинг, регуляция экспрессии микроцинового оперона *mssABCDE*, транспорт антибиотика в чувствительные клетки, а также механизмы клеточной устойчивости клеток к МсС. В рамках настоящей работы были получены новые данные по некоторым из вышеперечисленных вопросов.

Цели и задачи исследования. Основной целью данной работы являлось изучение механизма созревания МсС, а также определение механизмов устойчивости клеток к антибиотику.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Выяснить роль продуктов генов *mssD* и *mssE* микроцинового оперона *mssABCDE* в синтезе МсС.
2. Исследовать роль МссЕ в обеспечении устойчивости клеток к антибиотику.
3. Идентифицировать систему транспорта МсС в клетку.

Научная новизна и практическая значимость работы. В ходе работы получены новые данные по механизму синтеза МсС. Впервые установлена роль продуктов генов *mssD* и *mssE* микроцинового оперона в созревании антибиотика и определены интермедиатные формы МсС, образующиеся в процессе синтеза.

Открыт и изучен один из механизмов устойчивости клеток к МсС за счёт действия МссЕ. Доказано, что С-концевой домен МссЕ ацетилюет процессированный МсС и тем самым нейтрализует его ингибирующее действие.

Идентифицирован АВС транспортёр YejABEF, который является единственным комплексом внутренней мембраны *E. coli*, отвечающим за транспорт антибиотика из периплазматического пространства в цитоплазму клетки.

Полученные в данной работе результаты расширяют представления о механизме созревания МсС, транспорте антибиотика, а также о механизмах клеточной устойчивости к МсС и могут быть использованы для решения ряда прикладных задач, например, для химического

синтеза МсС и МсС-подобных соединений или для создания более эффективных антибактериальных препаратов на основе МсС.

Публикации и апробация работы. По результатам диссертационной работы опубликовано 3 статьи. Основные положения и результаты работы были представлены на следующих конференциях: 1) «ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases», March 1 - 8, 2008, Innsbruck, Austria; 2) «IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов», 11 – 15 мая, 2008, Новосибирск, Россия; 3) «FEBS Practical Course on Protein interaction modules», April 18 - 25, 2009, Split, Croatia; 4) «VIII European Symposium of The Protein Society», June 14 - 18, 2009, Zurich, Switzerland; 5) IV Российский симпозиум «Белки и пептиды», 23 – 27 июня, 2009, Казань, Россия; 6) 3rd Congress of European Microbiologists: «Microbes and Man – interdependence and future challenges», June 28 - July 2, 2009, Gothenburg, Sweden.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждений, заключения, а также выводов, приложений и списка литературы. Работа изложена на ___ страницах машинописного текста, включая 2 таблицы, ___ рисунков. Список цитируемых литературных источников включает 148 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Биосинтез МсС

Гены, отвечающие за синтез зрелой формы МсС, или МсС1178 (молекулярная масса 1178 Да) (Рис. 1а), а также за устойчивость клетки-продуцента к синтезируемому антибиотику, образуют оперон *mssABCDE* (Рис. 2). *mssA* кодирует гептапептид–предшественник МсС; продукт гена *mssB* присоединяет к С-концевому аминокислотному остатку гептапептида аденозинмонофосфат; продукт гена *mssC* – трансмембранный белок, который экспортирует зрелый МсС из клетки-продуцента. Для определения функций продуктов генов *mssD* и *mssE* нами были получены плазмиды *mssABCE* и *mssABCD* на основе плазмиды рУНАВ (плазмида рУНАВ содержит полный микроциновый оперон *mssABCDE*), несущие амбер-мутации, соответственно, в начале *mssD* и *mssE*, и выделены и охарактеризованы производные МсС, продуцируемые клетками, содержащими полученные плазмиды.

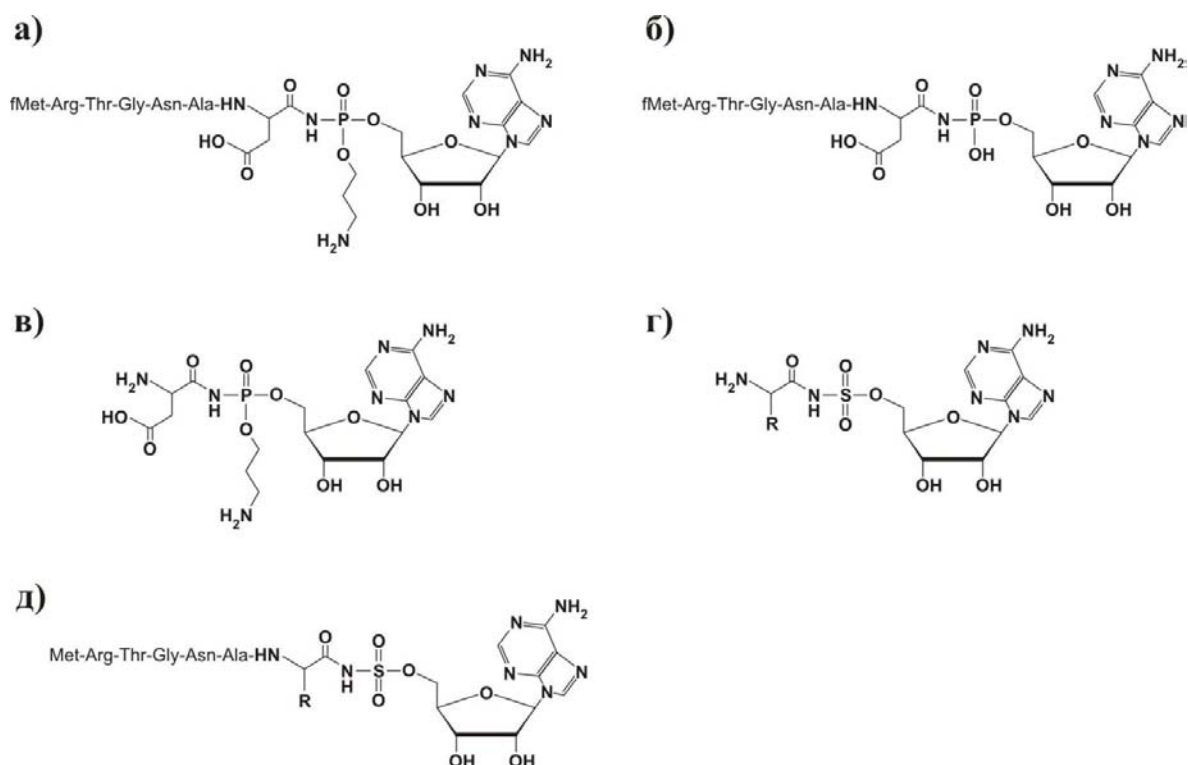


Рисунок 1. Структуры форм МсС и синтетических аналогов антибиотика: а) МсС1178; б) МсС1120; в) процессированная форма МсС1178; г) синтетические аналоги процессированного МсС, где R – Asp, Glu или Leu; д) синтетические аналоги зрелого МсС, где R – Asp, Glu или Leu.



Рисунок 2. Структура микроцинового оперона *mscABCDE*.

Формы МсС, продуцируемые клетками, содержащими *mscABCE*, и клетками, содержащими *mscABCD*. Анализ препарата МсС, выделенного из культуры клеток *E. coli* дикого типа, содержащих плазмиду *mscABCE* (в отсутствии функционального гена *mccD*), показал, что зрелый антибиотик не продуцируется, а основным продуктом синтеза является производное МсС, обладающее антибактериальной активностью, с молекулярной массой 1120 Да (МсС1120).

Ранее было обнаружено, что клетки дикого типа, содержащие плазмиду с микроциновым опероном в отсутствии *mccE*, не синтезируют МсС, в то время как клетки *perAperBperN*, лишённые трёх аминопептидаз широкой специфичности – PerA, PerB и PerN, продуцируют антибиотик (клетки *perAperBperN* устойчивы к МсС: в их цитоплазме процессированная форма антибиотика (Рис. 1в) не образуется; причины, по которым экспрессия микроцинового оперона в отсутствии *mccE* зависит от культуры клеток, неизвестны). Поэтому для выяснения роли МсС в созревании антибиотика была использована культура клеток *perAperBperN*.

При контрольном выделении антибиотика из клеток *perAperVrepN*, содержащих плазмиду с полным микроциновым опероном, было показано, что в препарате выделенного МсС присутствуют два мажорных масс-пика, соответствующие МсС1178 и МсС1149 - производному МсС1178, не содержащему формильной группы на N-концевом остатке Met в составе гептапептида. Количество МсС1149, выделяемого из клеток дикого типа, содержащих полный микроциновый оперон, в несколько раз меньше, чем количество МсС1178 (было выдвинуто предположение, что в клетках *perAperVrepN* повышена активность деформилазы). Анализ выделенного МсС из клеток *perAperVrepN*, содержащих плазмиду с микроциновым опероном с мутацией в гене *mssE*, показал, что основными продуктами синтеза также являются две формы МсС - МсС1120 и его деформилированное производное - МсС1092.

Таким образом, главным продуктом, синтезируемым клетками, содержащими плазмиду с микроциновым опероном как в отсутствие продукта гена *mssD*, так и *mssE*, является форма МсС с молекулярной массой 1120 Да – МсС1120.

МсС1120: структура и антибактериальная активность. Структура МсС1120 была определена методом ЯМР. Оказалось, что МсС1120 представляет собой микроцин, который состоит из гептапептида и аденозинмонофосфата, в составе которого отсутствует аминопропильная группа (Рис. 1б). Было показано, что МсС1120 так же, как и МсС1178, не подавляет рост клеток *perAperVrepN*, а его антибактериальное действие на рост клеток чувствительной культуры дикого типа в несколько раз слабее, чем МсС1178 (Рис. 3). На основании результатов опытов по ингибированию реакции аминоацилирования тРНК^{Asp} *in vitro* было установлено, что наличие аминопропильной группы может влиять на сродство антибиотика к ферменту-мишени. Так, концентрация МсС1120, необходимая для 50%-ного ингибирования AspRS, в 10 раз выше, чем соответствующая концентрация МсС дикого типа. Кроме того, в отличие от МсС1178, даже при насыщающих концентрациях МсС1120 не наблюдалось полного ингибирования AspRS. Таким образом, наличие аминопропильной группы существенно увеличивает сродство процессированного МсС к ферменту-мишени.

Объяснение полученным экспериментальным данным было найдено с помощью структурного моделирования комплекса молекулы процессированного МсС и AspRS *E. coli*, более точно, докинга этой молекулы в аспартил-аденилат-связывающий сайт белка (моделирование было проведено с помощью разработанного ранее программного обеспечения для молекулярного докинга ¹). Результаты докинга (Рис. 4) показывают, что положительно заряженная аминогруппа аминопропильной группы предположительно находится вблизи двух отрицательно заряженных карбоксильных групп AspRS Asp475 и Glu482. Электростатическое

¹ Ramensky, V., A. Sobol, Zaitseva N., Rubinov A., and V. Zosimov. 2007. A novel approach to local similarity of protein binding sites substantially improves computational drug design results. *Proteins* 69: 349–357.

притяжение должно увеличивать сродство процессированной формы McC1178 к ферменту, а также может изменять структуру комплекса фермент-ингибитор, снижая скорость его диссоциации.

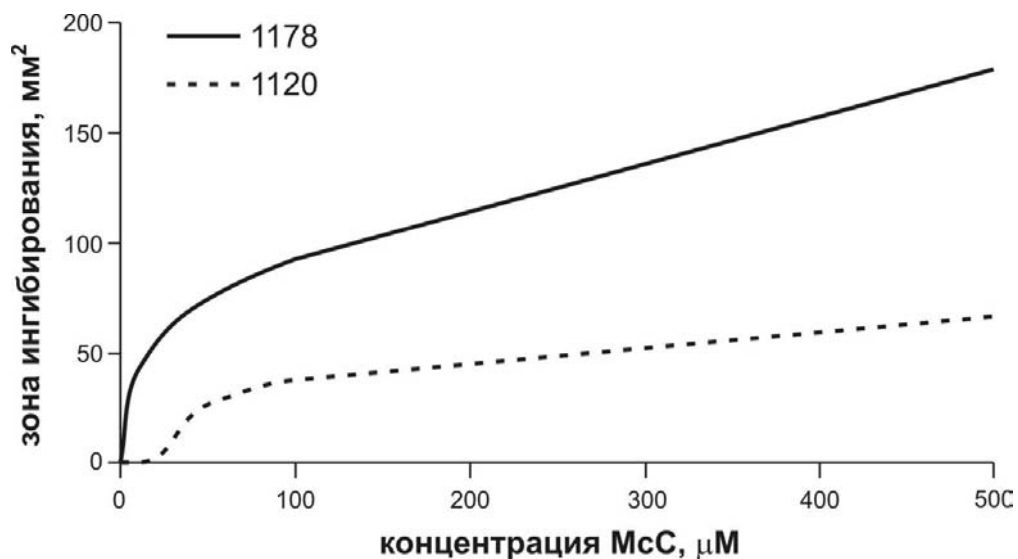


Рисунок 3. Сравнение антибактериальной активности McC1178 и McC1120. На газон чувствительных клеток *E. coli* наносили образцы McC в различных концентрациях. После нескольких часов инкубации измеряли диаметр образующихся зон ингибирования роста клеток.

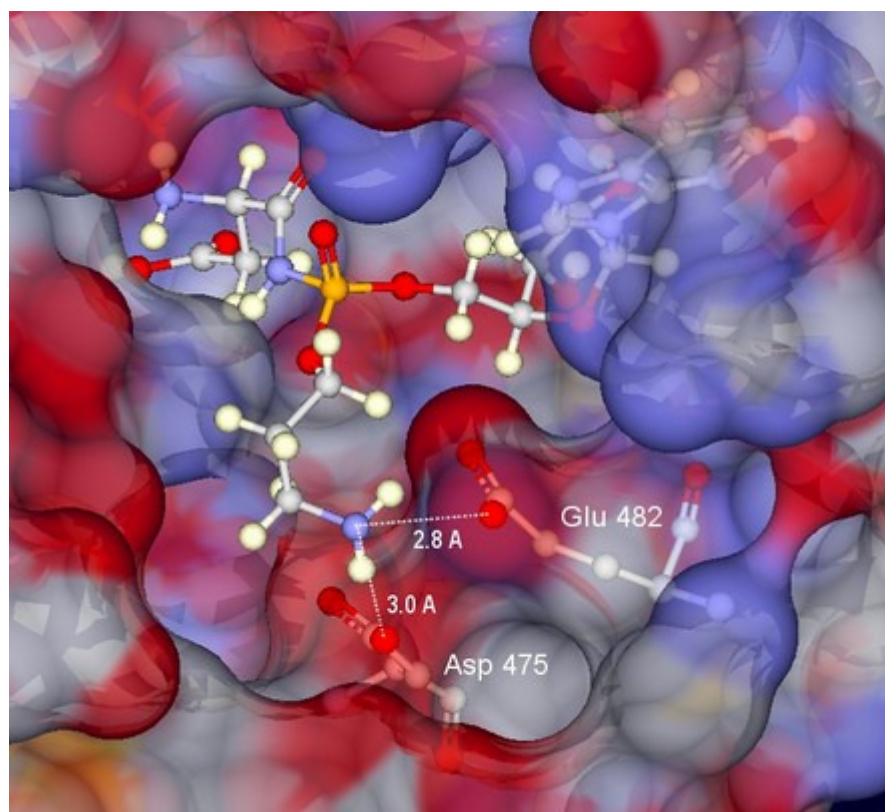


Рисунок 4. Структурное моделирование комплекса молекулы процессированного McC и AspRS *E. coli*.

Таким образом, McC1120 – это предшественник зрелого McC, у которого отсутствует аминопропильная группа. Аминопропильная группа в составе McC1178 повышает антибактериальную активность соединения за счёт улучшения взаимодействия с ферментом. Возможно, что наличие аминопропильной группы также влияет на эффективность транспорта и процессинга антибиотика.

На основании полученных нами данных, а также данных исследователей ² можно предложить следующую схему синтеза McC. MccB, используя в реакции две молекулы АТР, присоединяет аденозинмонофосфат к гептапептиду, образуя McC1120. После MccB-зависимой модификации гептапептида MccD и MccE осуществляют присоединение аминопропильной группы.

2. Ацетилтрансферазная активность MccE^{CTD} обеспечивает устойчивость клеток к McC и аналогам процессированного McC

Продукты микроцинового оперона *mccABCDE* не только обеспечивают синтез McC, но и отвечают за резистентность клетки-продуцента к нарабатываемому антибиотику. Считается, что MccC - это помпа, находящаяся в цитоплазматической мембране *E. coli*, которая экспортирует зрелый антибиотик из клетки в окружающую среду. Вторым белком, который обеспечивает «иммунитет» клетки-продуцента к антибиотику, считался продукт *mccE*.

К моменту начала экспериментов по изучению роли MccE в «иммунитете» к McC было показано, что в экстракте, содержащем все продукты микроцинового оперона, имеется активность, нейтрализующая ингибирование AspRS процессированным McC. Нами было предположено, что MccE участвует в этом процессе.

Клетки, продуцирующие MccE и MccE^{CTD}, устойчивы к McC и аналогам его процессированной формы. Из результатов биоинформатического анализа следует, что MccE – это двудоменный белок. N-концевой домен MccE - MccE^{NTD} - имеет гомологию с декарбоксилазами, С-концевой домен – MccE^{CTD} - гомологичен ацетил-КоА-зависимой ацетилтрансферазе RimL, которая осуществляет ацелирование рибосомного белка L12.

В настоящей работе были получены экспрессионные плазмиды (на основе вектора pET28), содержащие ген *mccE* и отдельно его N-концевой и С-концевой домены – pET-*mccE*, pET-*mccE*^{NTD} и pET-*mccE*^{CTD}. Были подобраны условия экспрессии рекомбинантных белков. Для получения MccE и его доменов в растворимом состоянии в клетки *E. coli* BL21(DE3) была введена дополнительная плазида pG-KJE8 (*dnaK-dnaJ-grgE, groES-groEL*) (Takara BIO Inc.,

² Roush, R. F., E. M. Nolan, F. Löhr, and C. T. Walsh. 2008. Maturation of an *Escherichia coli* ribosomal peptide antibiotic by ATP-consuming N-P bond formation in microcin C7. *J Am Chem Soc.* 130:3603-3609.

Japan)), содержащая несколько генов, кодирующих шапероны. Использование шаперонов - белков, которые обеспечивают правильное сворачивание полипептидных цепей, - является одним из известных способов получения белков в растворимой форме.

Для проверки устойчивости McC наносили на мягкий агар с газоном тестируемой культуры и после роста клеток в течение нескольких часов измеряли диаметр образующихся зон ингибирования роста. Кроме McC, дополнительно была проанализирована устойчивость клеток к тетрациклину (Tc), канамицину (Km) и хлорамфениколу (Cm) (pET28 содержит ген устойчивости к Km, а pG-KJE8 - к Cm). Из полученных результатов (Рис. 5) видно, что клетки, в которых происходит продукция MccE и MccE^{CTD} устойчивы к действию McC. Клетки, продуцирующие MccE^{NTD}, чувствительны к антибиотику. Продукция MccE и его двух доменов не оказывает влияние на устойчивость к Tc. Все тестируемые культуры были устойчивы к Km и Cm (данные не показаны).

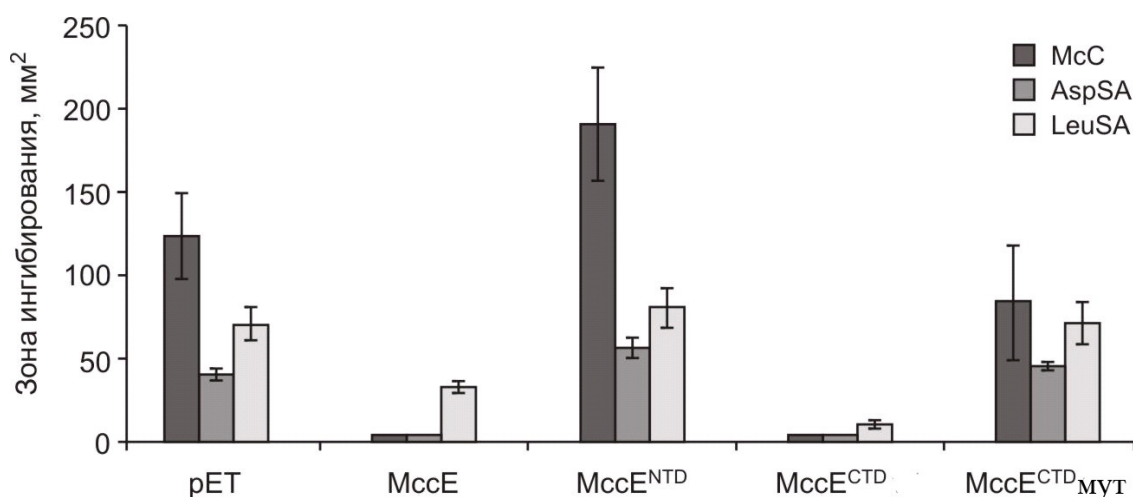


Рисунок 5. Проверка устойчивости клеток, продуцирующих MccE и его домены, к McC и аналогам процессированного McC. В качестве контроля использовались клетки, содержащие вектор без вставки. На газон тестируемых культур было нанесено 5 мкл McC (300 мкМ), 10 мкл AspSA (6 мМ), 5 мкл LeuSA (3 мМ).

Для того чтобы выяснить, способен ли MccE обеспечивать устойчивость к процессированному McC, мы использовали его синтетический аналог – аспартилсульфамойладенозин (AspSA), а также другой аналог процессированного McC – лейцилсульфамойладенозин (LeuSA) (Рис. 1г) (получить процессированный McC в количествах, необходимых для исследований, на данный момент невозможно). В системе *in vitro* AspSA и LeuSA ингибируют соответствующие аминоксил-тРНК-синтетазы с константами ингибирования – 8,0 nM и 8,4 nM, соответственно ³. Концентрация этих соединений, необходимая для

³ Van de Vijver, P, G. H. Vondenhoff, T. S. Kazakov, E. Semenova, K. Kuznedelov, A. Metlitskaya, A. Van Aerschot, and K. Severinov. 2009. Synthetic Microcin C Analogs Targeting Different Aminoacyl-tRNA Synthetases. J Bacteriol. Accepted for publication.

ингибирования роста бактериальных клеток *in vivo*, составляет около 0,5 - 5 мМ (в зависимости от штамма).

Проверка устойчивости клеток, продуцирующих MccE, MccE^{NTD} и MccE^{CTD}, к аналогам процессированного McC проводилась аналогично проверке на действие McC. Оказалось, что клетки, продуцирующие MccE^{NTD}, так же, как и клетки, содержащие вектор без вставки, чувствительны к используемым концентрациям AspSA и LeuSA. Клетки, продуцирующие MccE, были устойчивы к AspSA, но частично устойчивы к LeuSA, в то время как продукция MccE^{NTD} приводит к полной устойчивости клеток к этим соединениям (Рис. 5).

Таким образом, MccE^{CTD}, по-видимому, обеспечивает устойчивость к McC, функционируя на уровне процессированной формы антибиотика. Кроме того, действие MccE, вероятно, не зависит от аминокислотного остатка в структурах негидролизующих аминокислотаденилатов.

MccE^{CTD} обладает ацетилтрансферазной активностью. На основании гомологии MccE^{CTD} с RimL было сделано предположение, что MccE^{CTD} обладает ацетилтрансферазной активностью, и эта активность необходима для нейтрализации ингибирующего действия процессированного McC. Мы проверили наличие ацетилтрансферазной активности у С-концевого домена MccE в системе *in vitro*. В качестве донора ацетильной группы использовали ацетил-КоА (АцКоА), в качестве возможных субстратов – AspSA, LeuSA, McC1178, McC1149, а также GluSA (глутамилсульфамоиладенозин (Рис. 1г), который является ингибитором глутаминовой тРНК-синтетазы (константа ингибирования 2,8 нМ⁴), но в концентрации 5-10 мМ не подавляет рост клеток *in vivo*) и свободные аминокислоты – Asp, Leu и Glu. На основании данных колориметрического метода, в основе которого лежит определение количества свободного КоА, образующегося в ходе реакции, были посчитаны скорости ацетилирования белком тестируемых соединений. Оказалось, что MccE^{CTD} ацетилирует аналоги процессированного McC (максимальная скорость реакции ацетилирования AspSA – 19,8 ± 0,9 мин⁻¹; LeuSA – 47,3 ± 3,0 мин⁻¹; GluSA – 40,0 ± 3,2 мин⁻¹), а зрелый McC, McC1149 и свободные аминокислоты не являются субстратами фермента.

Для локализации сайта ацетилирования аналогов процессированного McC белком MccE продукты реакции были проанализированы методами гидрофильной HILIC-хроматографии (Hydrophilic interaction liquid chromatography) и тандемной масс-спектрометрии в лаборатории А. Van Aerschot (Rega Institute for Medical Research, Бельгия). Оказалось, что все три соединения – ацетилированные AspSA, LeuSA и GluSA - имели ацетильную группу, которая располагалась на α-аминогруппе аминокислотного остатка.

⁴ Van de Vijver, P, G. H. Vondenhoff, T. S. Kazakov, E. Semenova, K. Kuznedelov, A. Metlitskaya, A. Van Aerschot, and K. Severinov. 2009. Synthetic Microcin C Analogs Targeting Different Aminoacyl-tRNA Synthetases. J Bacteriol. Accepted for publication.

Для доказательства того, что ацетилтрансферазная активность $MscE^{CTD}$ необходима для обеспечения устойчивости к McC методом сайт-направленного мутагенеза был получен $MscE^{CTD}_{мут}$ - $MscE^{CTD}$, несущий двойную замену остатков Ser553 и Glu572 на остатки Ala (на основании данных по структуре активного сайта RimL предполагалось, что эти аминокислоты являются ключевыми остатками активного сайта $MscE$). Было показано, что максимальные скорости ацетилирования AspSA, LeuSA и GluSA мутантным белком составляют, соответственно, $0,8 \pm 0,1 \text{ мин}^{-1}$, $2,4 \pm 0,3 \text{ мин}^{-1}$ и $4,0 \pm 0,5 \text{ мин}^{-1}$, что в 10-25 раз ниже скорости реакции, катализируемой белком дикого типа. Кроме того, клетки, продуцирующие мутантную форму $MscE^{CTD}$, чувствительны к McC и его процессированным аналогам (Рис. 5).

Для того чтобы определить, необходима ли ацетилтрансферазная активность $MscE^{CTD}$ для синтеза антибиотика, мутации, приводящие к заменам Ser553 и Glu572 на остатки Ala, также были введены в последовательность гена *mccE* в составе полного микроцинового оперона. Анализ антибиотика выделенного из культуры клеток *perAperVperN*, содержащих полученную плазмиду, показал, что основным продуктом синтеза является зрелый McC. Таким образом, ацетилтрансферазная активность $MscE^{CTD}$ необходима для обеспечения устойчивости клеток к McC, но не играет роли в созревании McC. По-видимому, в синтезе антибиотика участвует N-концевой домен белка, гомологичный декарбоксилазам.

Ацетилированные аналоги процессированного McC не ингибируют реакцию аминокислотирования *in vitro*. На основании полученных данных мы предположили, что устойчивость клеток-продуцентов к McC обусловлена тем, что ацетилированный аналог процессированного McC - ацетил-AspSA - не ингибирует AspRS, а устойчивость к аналогам процессированного McC связана с тем, что продукты ацетилирования – ацетил-LeuSA и ацетил-GluSA - не ингибируют соответствующие аминокислот-тРНК-синтетазы.

Ацетилированные AspSA, LeuSA и GluSA были проверены на способность ингибировать реакцию аминокислотирования *in vitro*. Из результатов (Рис. 6) видно, что добавление в экстракт клеток немодифицированных ингибиторов или аминокислотсульфамойладенозинов, проинкубированных с $MscE^{NTD}$, подавляет реакцию аминокислотирования соответствующих тРНК, в то время как продукты, образующиеся в ходе ацетилтрансферазной реакции в присутствии $MscE^{CTD}$, – ацетилированные LeuSA, AspSA и GluSA - не влияют на активность тРНК-синтетаз.

Таким образом, ацетилированные аналоги процессированного McC не ингибируют тРНК-синтетазы.

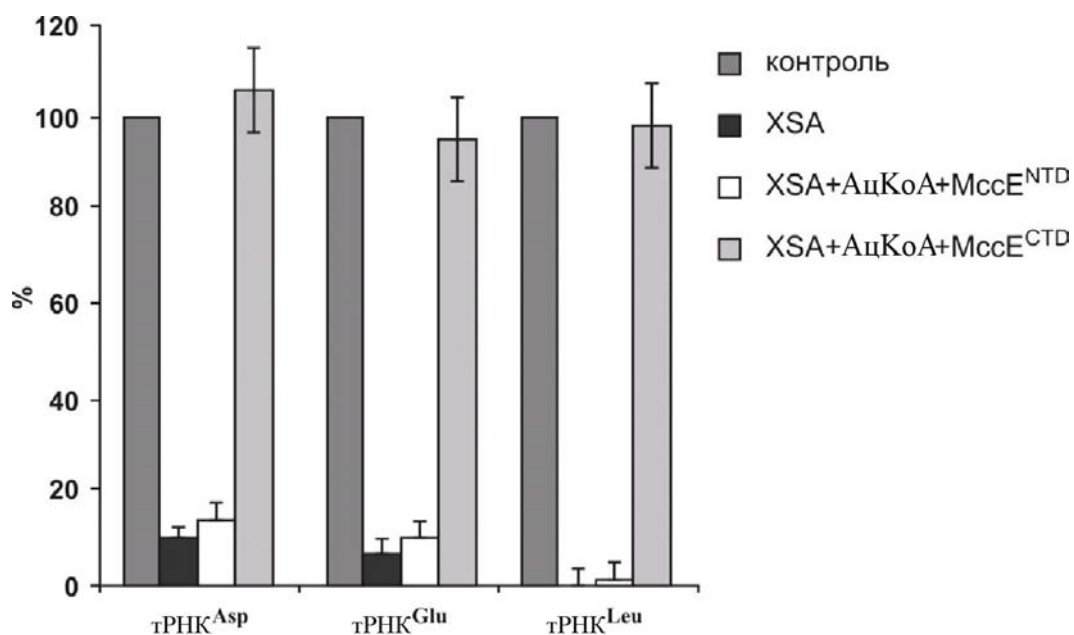


Рисунок 6. Реакция аминокцилирования в присутствии XSA (AspSA, LeuSA или Glu-SA) и ацетилированных XSA. Продукты реакции ацетилирования белком MccE^{CTD} (XSA+AcCoA+MccE^{CTD}) добавлялись к S30 экстрактам *E. coli*. После чего к экстрактам были добавлены радиоактивные аминокислоты, соответствующие аминокислотным частям ингибиторов, а затем определялось количество аминокцилированной т-РНК по включению радиоактивно меченой аминокислоты (аспарагата, лейцина или глутамата) во фракцию осадка, нерастворимого в холодной ТХУ. Для проверки были взяты XSA, а также эти же соединения, которые инкубировались с MccE^{NTD} (XSA+AcCoA+MccE^{NTD}). За 100% было принято количество аминокцил-тРНК, образуемое в отсутствии инкубации с каким-либо из соединений (контроль).

На основании результатов наших экспериментов, выполненных с использованием AspSA - аналога процессированного McC, можно заключить, что С-концевой домен MccE является ацетилтрансферазой, которая переносит ацетильную группу на NH₂-группу остатка Asp процессированного McC, и что ацетилированная форма антибиотика не ингибирует клеточную мишень - AspRS. Мутации, приводящие к снижению ацетилтрансферазной активности MccE, приводят к чувствительности клеток к антибиотику.

3. Система транспорта McC

Механизм действия McC предполагает, что появление устойчивости к антибиотику может быть обусловлено тремя типами мутаций - нарушениями транспорта McC, его процессинга, а также повреждениями гена, кодирующего фермент-мишень.

Поскольку AspRS - жизненно важный фермент, то мутации в гене, кодирующем мишень, скорее всего, будут для клетки летальными. Однако не исключено, что мутации в регуляторной последовательности этого гена, например, повышающие его экспрессию, могут повлиять на

уровень устойчивости. Действительно, было показано, что сверхпродукция AspRS приводит к устойчивости клеток к действию McC⁵.

Получение мутаций устойчивости, связанных с нарушением процессинга McC маловероятно, так как в деградации пептидной части молекулы участвуют несколько взаимозаменяемых клеточных пептидаз. Было обнаружено, что клетки, лишённые одновременно трёх генов, кодирующих пептидазы широкой специфичности *PepA*, *PepB* и *PepN*, устойчивы к антибиотику.

Наконец, устойчивость к McC может возникать вследствие нарушения проникновения его в клетку. В предварительных исследованиях, проведенных в лаборатории И. А. Хмель, была проверена коллекция штаммов *E. coli* с мутациями различных компонентов транспортных систем. Было показано, что, одним из белков, участвующим в транспорте McC в периплазму, является *OmpF*⁶, так как клетки, несущие мутацию в этом гене, были частично устойчивы к антибиотику. Однако вопрос о системе, необходимой для транспорта антибиотика в цитоплазму, оставался неисследованным.

Для идентификации системы транспорта McC была использована библиотека клеток *E. coli* SG289, несущих случайные инсерции транспозона TNSC189⁷, - SG289(Tn) (была любезно предоставлена Sean Garrity (Harvard Medical School, США)). Инсерция транспозона делает клетки SG289(Tn) устойчивыми к канамицину (Km).

Отбор клеток *E. coli*, устойчивых к McC, и проверка сцепленности устойчивости к Km и McC. Из библиотеки клеток SG289(Tn) были отобраны 7 независимых колоний, устойчивых к McC. Для экспериментального доказательства того, что устойчивость к McC отобранных колоний действительно вызвана инсерцией транспозона, были проведены опыты по трансдукции фагом P1_{vir}. Для каждого из 7 штаммов было получено 10-20 колоний-трансдуктантов, устойчивых к Km. Наличие инсерции транспозона у полученных трансдуктантов TnSC289 было подтверждено методом ПЦР. Все трансдуктанты были устойчивы к McC (ко-трансдукция – 100%). Таким образом, можно заключить, что устойчивость к McC у исследуемых колоний, действительно, обусловлена вставкой транспозона.

Определение нуклеотидной последовательности в районе вставки транспозона. Одним из ключевых моментов данной работы части было определение генов, в последовательность

⁵ Metlitskaya, A., Kazakov T., Kommer A., Pavlova O., Praetorius-Ibba M., Ibba M., Krasheninnikov I., Kolb V., Khmel I., and Severinov K. 2006. Aspartyl-tRNA Synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic microcin C. *J. Biol. Chem.* 281: 18033-18042.

⁶ Khmel, I. A., V. M. Bondarenko, I. M. Manokhina, E. I. Basyuk, A. Z. Metlitskaya, V. A. Lipasova, and Y. M. Romanova. 1993. Isolation and characterization of *Escherichia coli* strains producing microcins of B and C types. *FEMS Microbiol Lett.* 111: 269-74.

⁷ Chiang S.L. & Rubin E.J. 2002. Construction of a *mariner*-based transposon for epitope-tagging and genomic targeting. *Gene* 296: 179-185.

которых произошла инсерция транспозона. Определение локализации транспозона проводили с помощью метода ПЦР с одним праймером в реакционной смеси и со сменой температур отжига праймера в течение опыта⁸. Было установлено, что у пяти трансдуктантов вставка транспозона произошла в различные места гена *yejA*, а у двух трансдуктантов 1 и 6 - в ген *yejB*. Оба этих гена находятся в составе оперона *yejABEF*. На основании данных биоинформатического анализа можно утверждать, что гены оперона *yejABEF* кодируют белки олигопептидного транспортёра ABC-семейства: продукт гена *yejA* - это периплазматический белок, отвечающий за связывание субстрата, YejB и YejE – трансмембранные белки, а YejF - белок, обладающий АТФ-азной активностью. Данных о специфичности транспортной системы YejABEF не имеется.

***yej* мутанты, полученные методом направленного мутагенеза, устойчивы к McC и к его синтетическим аналогам, но чувствительны к аналогам процессированного McC.** Методом направленного мутагенеза⁹ в лаборатории д. Wanner (Purdue University, США) были получены четыре штамма *E. coli*, не содержащие генов *yejA*, *yejB*, *yejE* или *yejF*, и нами была определена их чувствительность к McC. Оказалось, что все эти штаммы устойчивы к антибиотику (Рис. 7). В экстрактах клеток каждого из мутантов - *yejA*, *yejB*, *yejE* и *yejF* - так же, как в экстрактах клеток дикого типа, наблюдалось полное ингибирование реакции аминоацилирования тРНК^{Asp} при добавлении McC (Рис. 8), что указывает на то, что и процессинг McC и фермент-мишень остались неизменными. Таким образом, продукты генов оперона *yejABEF* действительно необходимы для обеспечения чувствительности клеток к McC и, скорее всего, действуют на стадии проникновения антибиотика в клетку.

Нами была проверена устойчивость *yej* мутантов к химическим аналогам зрелого McC и соответствующим аналогам процессированного McC (синтетические аналоги McC содержат остатки Asp, Leu или Glu в 7 положении гептапептида и ингибируют соответствующие аминоацил-тРНК-синтазы; кроме того, в структуре этих соединений отсутствует аминопропильная группа (Рис. 1 д)). В качестве контроля использовались клетки дикого типа. Из рис. 9 видно, что клетки чувствительны ко всем аналогам процессированного McC, но устойчивы к синтетическим аналогам McC.

На основании полученных данных можно заключить, что YejABEF необходим для транспорта McC и его аналогов, но не участвует в транспорте аналогов процессированного McC. Природа аминокислоты в 7-ом положении гептапептида не важна для узнавания транспортёром.

⁸ Ducey, T. F. & D. W. Dyer. 2002. Rapid identification of EZ:TNTM transposon insertion sites in the genome of *Neisseria gonorrhoeae*. EPICENTRE Forum 9:6–7.

⁹ Datsenko, K.A. & Wanner B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. PNAS 97:6640-6645.

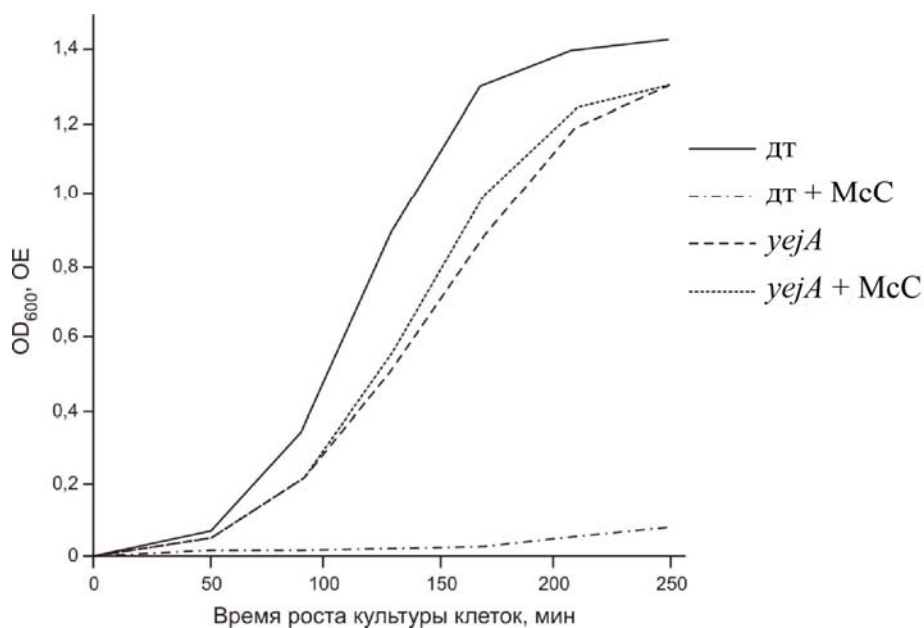


Рисунок 7. Рост клеток *yejA* в жидкой среде в присутствии зрелого McC (10 мкг/мл). За скоростью роста клеток следили по увеличению оптической плотности среды при 600 нм (OD₆₀₀). В качестве контроля использовали клетки дикого типа (дт). Аналогичная картина наблюдалась и для клеток *yejB*, *yejE* и *yejF*.

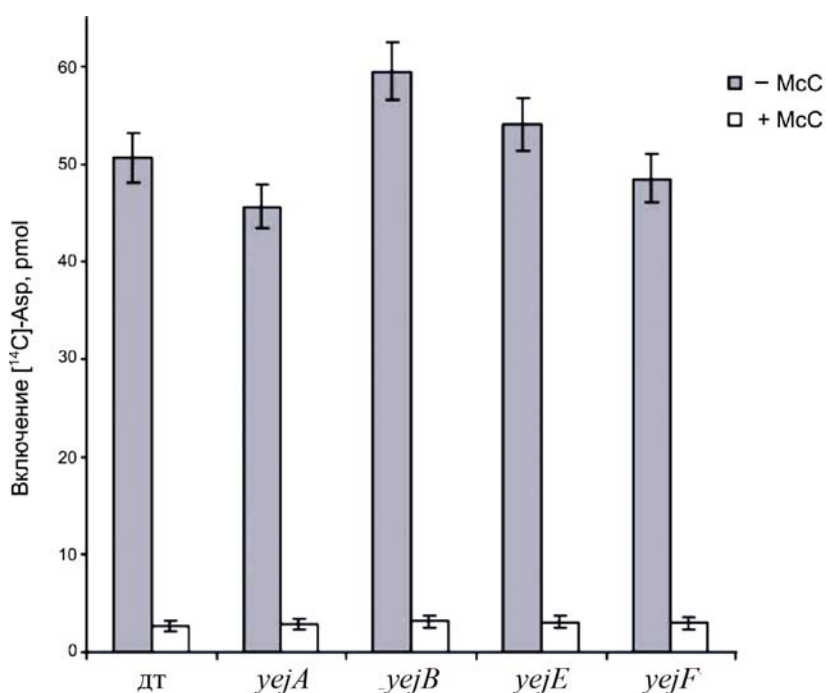


Рисунок 8. Реакция аминокислотирования в экстрактах клеток, мутантных по генам оперона *YejABEF*. S30 экстракты клеток инкубировали с интактным McC в течение 1 часа (времени, достаточного для процессинга) при 37 °C, после чего в эту смесь добавляли компоненты для реакции аминокислотирования, включая радиоактивную аминокислоту Asp. Количество образовавшейся аминокислотированной тРНК^{Asp} измеряли по включению радиоактивной метки во фракцию осадка, нерастворимого в холодной ТХУ.

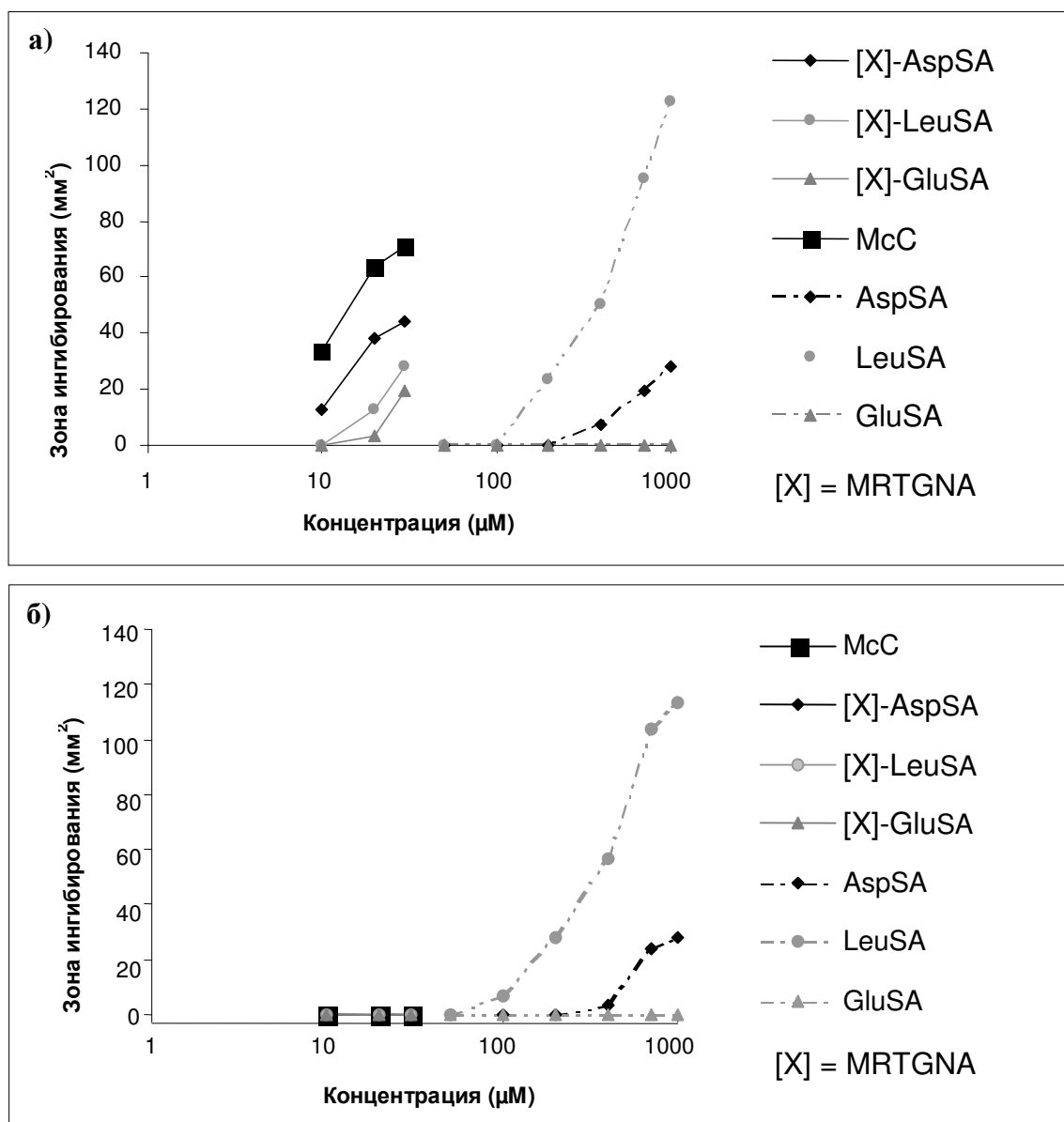


Рисунок 9. Проверка устойчивости клеток дикого типа (а) и *yejA* (б) к аналогам зрелого McC и аналогам процессированного McC. На газон клеток были нанесены растворы тестируемых соединений и после инкубации в течение нескольких часов измерены диаметры ингибирования зон роста. Аналогичная картина наблюдалась и для культур клеток *yejB*, *yejE* и *yejF*.

Предсказание функций продуктов генов оперона *yejABEF* методами биоинформатики. Для получения дополнительной информации об опероне *yejABEF* был проведён биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей YejA и YejB. Поскольку периплазматические белки известных олигопептидных транспортёров суперсемейства ABC схожи с периплазматическими белками ABC-транспортёров ионов никеля, было построено общее филогенетическое дерево периплазматических белков семейства ABC-транспортёров, отвечающих за транспорт олигопептидов и ионов никеля (включая Yej). Анализ филогенетического дерева показал, что YejA и его гомологи лежат на отдельной ветке.

Анализ филогенетических деревьев, построенных на основании аминокислотных последовательностей гомологов YejA и YejB позволил выявить белки, имеющие с ними общее эволюционное происхождение. В исследованных геномах гомологи YejA, как правило, соседствуют с гомологами YejB, и предположительно входят в состав одного оперона. Структура содержащего эти гены локуса в целом консервативна в пределах типа *Proteobacteria* и включает, помимо гомологов генов *yejA* и *yejB*, гомологи генов *yejE* и *yejF*.

Предполагалось, что бактерии, которые содержат оперон *yej* в геноме, должны быть чувствительны к действию McC. Однако, несмотря на то, что *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 имеет два оперона, кодирующих транспортные системы, родственные комплексу Yej, этот организм оказался устойчивым к микроцину (Н. Курепина, личное сообщение). Мы предполагаем, что поскольку AspRS – высоко консервативный фермент у бактерий и система клеточных пептидаз, в целом, консервативна, то устойчивость должна быть связана со свойствами транспортной системы. Поэтому устойчивость к McC *Pseudomonas* может быть объяснена как изменениями специфичности транспортёра к McC, так и низким уровнем экспрессии оперонов *yej* в данном штамме. Также возможно, что на транспорт McC влияют другие, в настоящее время неизвестные рецепторные системы внешней мембраны.

Таким образом, в результате исследования были обнаружены и идентифицированы мутации, приводящие к устойчивости к McC. Картирование мутаций методом однопраймерной ПЦР показало, что у отобранных нами мутантов устойчивость к McC определяется повреждением генов ABC транспортёра, расположенного во внутренней (цитоплазматической) мембране бактериальной клетки. Гены, кодирующие четыре субъединицы транспортёра, – периплазматический белок (YejA), два трансмембранных белка (YejB и YejE) и белок, обладающий АТФ-ной активностью, (YejF) (на основании данных биоинформатического анализа) – находятся в опероне *yejABEF*. Опыты по проверке устойчивости к McC клеток, лишённых отдельных генов оперона *yejABEF*, показали, что каждый из белков транспортёра необходим для транспорта McC.

Механизм транспорта и структура комплекса YejABEF неизвестны. Однако есть ряд экспериментальных данных, указывающих на его функцию в клетке. Так, для патогенных штаммов *Salmonella enterica* показано, что мутации в *yej* понижают их вирулентность и повышают чувствительность к антимикробным пептидам¹⁰. Предполагают, что Yej участвует в транспорте иммуногенных бактериальных пептидов, тем самым, снижая вероятность их взаимодействия с комплексом МНС I, а также транспортирует антимикробные пептиды для их деградации в цитоплазме клетки.

¹⁰ Eswarappa, S. M., Panguluri K. K., Hensel M., Chakravorty D. 2008. The *yejABEF* operon of *Salmonella* confers resistance to antimicrobial peptides and contributes to its virulence. *Microbiology* 154: 666-678.

На основе вышеуказанных данных и данных биоинформатического анализа можно предположить, что основная функция этого транспортера связана с транспортом олигопептидов. Но вопрос о специфичности транспортера требует дополнительных исследований.

ВЫВОДЫ

1. Продукты генов *mccD* и *mccE* микроцинового оперона *mccABCDE* отвечают за присоединение аминопропильной группы к гептапептид-нуклеотиду McC.
2. Наличие аминопропильной группы в составе зрелого McC приводит к увеличению антибактериальной активности соединения за счёт повышения сродства к белку-мишени - AspRS.
3. MccE является частью системы, обеспечивающей устойчивость клеток к McC. С-концевой домен этого белка является ацетилтрансферазой, которая переносит ацетильную группу на процессированный McC, и такая модифицированная форма антибиотика не ингибирует AspRS. Ацетилтрансферазная активность MccE не важна для синтеза антибиотика.
4. ABC-транспортёр YejABEF - это единственный комплекс белков внутренней мембраны *E. coli*, ответственный за транспорт McC через цитоплазматическую мембрану в цитоплазму клетки. Мутации в каждом из генов оперона *yeyABEF* приводят к устойчивости к McC.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. Metlitskaya, A., Kazakov T., Vondenhoff G. H., **Novikova M.**, Shashkov A., Zatsepin T., Semenova E., Zaitseva N., Ramensky V., Van Aerschot A., and Severinov K. 2009. Maturation of Translation Inhibitor Microcin C. *J Bacteriol.* 191: 2380-7.
2. Kazakov, T., Vondenhoff G.H., Datsenko K.A., **Novikova M.**, Metlitskaya A., Wanner B.L., Severinov K. 2008. *Escherichia coli* peptidase A, B, or N can process translation inhibitor microcin C. *J Bacteriol.* 190: 2607-10.
3. **Novikova, M.**, Metlitskaya A., Datsenko K., Kazakov T., Kazakov A., Wanner B., Severinov K. 2007. The *Escherichia coli* Yej Transporter Is Required for the Uptake of Translation Inhibitor Microcin C. *J Bacteriol.* 189: 8361- 8365.

Тезисы конференций:

1. **Novikova, M.**, Metlitskaya A. Z., Kazakov, T. S., Datsenko K., Vondenhoff G.H., Severinov K. Microcin C: biosynthesis, transport, processing of the translation inhibitor. 3rd Congress of

European Microbiologists: «Microbes and Man – interdependence and future challenges», Gothenburg, Sweden, June 28 - July 2, 2009.

2. **Новикова М. В.**, Метлицкая А. З., Казаков Т. С., Vondenhoff G. H., Северинов К. В. Разработка нанолечарств на основе антибактериального пептида микроцина С. IV Российский симпозиум «Белки и пептиды», Казань, Россия, 23 – 27 июня 2009.
3. **Novikova, M.**, Metlitskaya A. Z., Kazakov, T. S., Vondenhoff G.H., Severinov K. Dissecting the functions of the products of microcin C biosynthetic operon. VIII European Symposium of The Protein Society, Zurich, Switzerland June 14-18, 2009.
4. **Novikova, M.**, Metlitskaya A. Z., Kazakov, T. S., Vondenhoff G.H., Severinov K. Microcin C: transport, biosynthesis and mechanism of action. FEBS Practical Course on Protein interaction modules, Split, Croatia, April 18 - 25, 2009.
5. **Новикова М. В.**, Метлицкая А. З., Казаков Т. С., Vondenhoff G. H., Северинов К. В. Микроцин С: биосинтез, транспорт и механизм действия. «IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов», Новосибирск, Россия, 11 – 15 мая, 2008.
6. **Novikova, M.**, Metlitskaya A., Datsenko K., Kazakov T., Kazakov A., Severinov K. The *Escherichia coli* ABC Transporter Yej Is Required for the Uptake of Antibiotic Microcin C. 2008. ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, Innsbruck, Austria, March 1-8, 2008.