

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДОВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА ОСНОВЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S1 ИЗ THERMUS THERMOPHILUS

С.Р. Курпе, С.Ю. Гришин, О.М. Селиванова, А.К. Сурин, О.В. Галзитская*

Институт белка РАН, Пуцино, Московская область, Россия

T. thermophilus является модельным организмом для изучения бактериальных рибосомных белков, в частности, самого крупного белка S1 рибосомной субчастицы 30S. В настоящее время трехмерная структура белка S1 недостаточно изучена из-за его высокой склонности к агрегации, а также относительной подвижности конструкции из пяти белковых S1-доменов и неупорядоченных участков. Вместе с тем, изучение агрегационных (амилоидогенных) и антибактериальных эффектов пептидов, разработанных на основе последовательности S1, представляет интерес, как для выяснения участков в структуре белка, ответственных за агрегацию, так и для разработки антимикробных препаратов. Цель работы состояла в теоретическом предсказании белковых участков, склонных к агрегации в аминокислотной последовательности белка S1 из *T. thermophilus*, синтезе пептидов на их основе и экспериментальной проверке их амилоидогенности и антибактериального действия (токсического эффекта пептидов на бактериальные клетки).

Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой объекты пептидной природы с высоким содержанием положительно заряженных и гидрофобных аминокислот, с пространственным разобщением заряженных и гидрофобных частей молекулы, синтезирующихся *in vivo* на рибосомах или ферментативным путем, либо *in vitro*, обладающих широкой антимикробной активностью против бактерий, грибов, вирусов и простейших при физиологических условиях [1]. Антимикробные пептиды способны проявлять широкий спектр биологических функций. Помимо антимикробной, антибактериальной, антивирусной, противогрибковой, антипаразитарной функций, АМП могут проявлять более специфическое действие.

Под антимикробной активностью понимают проявление какой-то одной, либо нескольких, а в редких случаях всех видов активностей, направленных против вирусов, бактерий, грибов или паразитов [2]. Известно, что количество АМП уменьшается с увеличением типов активностей. Снижение числа типов активностей может быть связано с физико-химическими свойствами пептидов [2]. Действительно, некоторые из широко изученных АМП входят в короткий список, обладающих всеми четырьмя типами активностей. Такими пептидами являются маггаинин 2, дермисептин C1 и дермисептин C4 амфибий; мелиттин насекомых; человеческий α -дефенсин HNP-1, кателицидин LL-37; бычий BMAP-27, BMAP-28 и растительный калата В2. Наиболее распространенной является антибактериальная активность АМП. Такая активность обнаруживается у 31 % пептидов, депонированных в dbAMP. Эта активность обычно объясняется действием катионных пептидов на мембрану [2]. Интересно, что активность против грамотрицательных и грамположительных бактерий распределяется примерно поровну (19 % и 22 %, соответственно). Противогрибковой активностью обладают 16 % пептидов dbAMP. Часто эта активность принадлежит представителям растительных АМП [3]. Вызывает интерес противовирусная активность АМП. Известно, что кателицидин LL-37 проявляет активность против ВИЧ-1, респираторно-синцитиального вируса (RSV) и вируса гриппа [4,5]. Причем подвергаются воздействию вирусные частицы как покрытые оболочкой, так и без нее. Предполагается, что амфипатическая природа АМП позволяет связываться с нуклеиновой кислотой вируса. Антипаразитарные пептиды представляют собой относительно меньшую группу по сравнению с другими группами АМП. Хотя паразитические организмы, как правило, многоклеточные, механизм действия антипаразитарных пептидов включает в себя гибель клеток путем нарушения целостности клеточной мембраны, подобно другим АМП [6]. Пептиды с этой активностью проявляют действие против различных паразитов, включая *Leishmania* и *Trypanosoma brucei* [7].

Исследования антибактериальной активности пептидов на основе рибосомального белка S1 проводили на культуре *T. thermophilus*. Родственное филогенетическое положение с археями и бактериями, высокая термическая устойчивость ферментативных систем, небольшой размер генома делает этот вид классической экспериментальной лабораторной моделью. *T. thermophilus* – грамотрицательная термофильная бактерия, относящаяся к облигатным аэробам.

Штамм HB27 *T. thermophilus* был любезно предоставлен С.В. Тищенко (ИБ РАН). Замороженную биомассу выращивали в небольшом объеме (500 мкл) среды LB в 1,5 мл пробирке в течение ночи при 70 °С и помешивании 230 об/мин. Для получения рабочей культуры 500 мкл ночной культуры пересевали в 300 мл колбу со 100 мл среды и культивировали в тех же условиях. Рост культуры контролировали с помощью СФ-102 при $\lambda=600$ нм в кювете 10 мм.

Аминокислотные последовательности пептидов, предсказанные биоинформатическими инструментами, были синтезированы в филиале ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

Поиск последовательности аминокислот способных к агрегации показал, что все пять доменов S1 *T. thermophilus* содержат амилоидогенные участки по данным программ FoldAmyloid, Waltz, PASTA 2.0 и AGGRESCAN. Наиболее амилоидогенные консенсусные последовательности третьего и пятого доменов D9G^{3-домен} (DFGVFVNLG), E10D^{5-домен} (EMEVVVLNID), V10I^{5-домен} (VTDFGVFVEI) и V10T^{3-домен} (VVEGTVVEVT) были проанализированы на соответствие антимикробной активности. Оценка антимикробной активности проводилась с помощью четырех алгоритмов онлайн-сервера CAMPR3: метода опорных векторов (SVMs), метода случайных деревьев (Random Forests), искусственных нейронных сетей (ANN) и дискриминантного анализа (DA). Из четырех предсказанных амилоидогенных пептидов D9G и V10I являются потенциально антимикробными. Для увеличения антимикробной активности, способности проникать через мембрану, повышения жесткости и механической стойкости амилоидных комплексов к N-концу V10I и V10T была добавлена последовательность ТАТ-белка ВИЧ-1 (RKKRRQRRR и небольшой линкер GGSarG) [8], что подтверждается прогнозом для R23I и R23T по сравнению с не модифицированными пептидами.

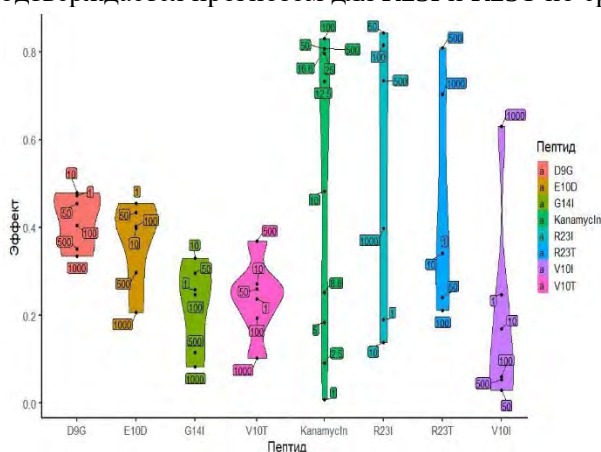


Рис. 1. Оценка антимикробной активности пептидов методом спектрофотометрии.

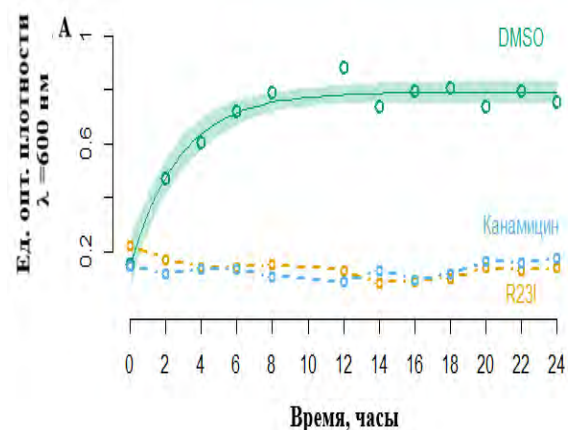


Рис. 2. Оценка антимикробной активности пептидов методом спектрофотометрии

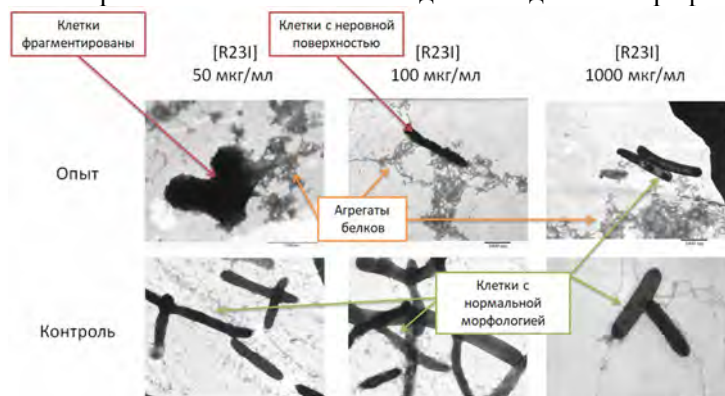
Вытянутая палочкообразная форма фигуры указывает на проявление антимикробной активности, а широкая форма фигуры демонстрирует отсутствие эффекта. Расчет биологической активности пептида производился по формуле: $\mathcal{E} = 1 - A(\text{Опыт})/A(\text{Контроль})$, где $\mathcal{E}$ – биологическая активность (эффект); A – поглощение оптической плотности после 24 ч. инкубации в опыте и контроле.

Основываясь на предсказанных данных, были синтезированы пептиды и проверена их биологическая активность на клеточной культуре *T. thermophilus*. Скрипичная диаграмма отражает первичную проверку (однократный повтор) исследуемых пептидов (рис. 1). По оси абсцисс расположены пептиды, по оси ординат эффект действия. Доверительный интервал показан верхней и нижней границей фигуры. Ширина фигуры показывает частоту наблюдения точек. Цифровые метки с черными точками в области построения графика отражают действующую концентрацию пептида (мкг/мл). Воздействие канамицином на рост клеточной культуры выступало в роли положительного контроля. Заметно, что пептиды, угнетающие рост *T. thermophilus*, как и канамицин, имеют вытянутую форму графика плотности. Стоит обратить внимание, что эффективность канамицина не превышает 0.8, что, вероятно, является ограничением метода измерения. Согласно предсказанию, пептиды, проявляющие антибактериальное действие, являются R23I (RKKRRQRRRGGSarGVTFDFGVFVEI), R23T (RKKRRQRRRGGSarGVVEGTVVEVT) и V10I. Этот вывод был подтвержден повторами эксперимента (для R23I 5 повторов и по 2 для R23T и V10I).

Минимальная опытная ингибирующая концентрация (MIC) для R23I, R23T и V10I равна 50, 500 и 1000 мкг/мл, соответственно. Однако D9G не проявил биологической активности в диапазоне исследуемых концентраций. Интересно, что наблюдается взаимосвязь между эффективностью пептида (наименьший уровень MIC) и уровнем предсказания антимикробной активности методом DA CAMPR3. Уровень предсказания для наиболее эффективного пептида R23I равен 0.99, тогда как для R23T лежит на границе чувствительности 0,59. Таким образом, увеличение уровня предсказания соответствует уменьшению MIC и соответственно увеличению антимикробной эффективности пептида.

Другой не менее важной характеристикой антимикробной активности является время наступление эффекта. Для R23I (наиболее эффективного пептида) было показано, что пептид ингибирует рост клеточной культуры в первые часы воздействия (рис. 2). По оси абсцисс время, по оси ординат поглощение оптической плотности клеточной культуры. Кривая DMSO отражает рост культуры *T. thermophilus* без токсического воздействия в экспериментальных условиях. Активный прирост клеток наблюдается с начального момента инкубации. Переход в стационарную фазу роста происходит через 6–8 часов. Численность бактерий стабилизировалась на уровне 0.8 единиц оптической плотности. В среде с добавлением 50 мкг/мл канамицина и R23I не наблюдается прирост оптической плотности, что свидетельствует об отсутствии роста бактерий.

На ряду со спектрофотометрическим методом определения антимикробной активности пептидов состояние клеток оценивали методом электронной микроскопии. Было показано, что при добавлении в среду 50 мкг/мл R23I практически отсутствуют целые клетки, часто встречаются фрагменты клеток (представлено на ЭМ изображении) и большое количество агрегатов белков (см. рис. 3). При увеличении концентрации пептида до 100 мкг/мл, по сравнению с контролем, уменьшилось количество клеток. Часто клетки имеют неровную поверхность, встречаются фрагменты клеток, много белковых агрегатов. Действие 1000 мкг/мл R23I не привело к морфологическим изменениям по сравнению с контролем. При данной концентрации пептида часто встречаются клетки с типичной морфологией, с наличием жгутиков. Также наблюдается много агрегатов белка. Отсутствие антимикробного эффекта при увеличении концентрации пептида до 1000 мкг/мл, что соответствует данным по оценке антимикробной активности пептидов методом спектрофотометрии (см. рис. 1).



Образцы клеток *T. thermophilus* подвергали электрофоретическому разделению в ПААГ. Полосы разделяли на три равные части, измельченные кусочки геля обрабатывали протеазой. Масс-спектры, полученные в исследовании протеома интактных и обработанных R23I клеток *T. thermophilus*, были проанализированы с помощью веб-сервера IdentiPy [9]. Дальнейший анализ проводился в статистической среде R с помощью пакетов UniProt.ws, tidyverse, ggplot2, splitstackshape, reshape, readr, R Venn. После исключения белков, число обнаруженных пептидов для которых было меньше трех, количество белков в группах было определено (Таблица 1).

Таблица 1. Количественное соотношение белков в исследуемых образцах.

Концентрация R23I, мкг/мл	Условия гомогенизации клеток <i>T. thermophilus</i>	Количество обнаруженных белков
0	Замораживание – оттаивание	386
20		232
50		201
100		395
0У*		513
100У*	Ультразвук	434

У* – гомогенизация методом ультразвука

В образцах обработанных 20 и 50 мкг/мл R23I выявлено меньше белков на 40 % и 48 % соответственно относительно контроля. Воздействие концентрации 100 мкг/мл R23I на клетки *T. thermophilus* не приводит к резкому увеличению или уменьшению количества белков.

Попарное сравнение групп с помощью точного критерия Фишера для малых выборок с поправкой на множественную проверку гипотез Benjamini показало (Таблица 2):

Образцы, гомогенизированные различными методами, статистически значимо различаются ($p < 0.05$) и не могут быть использованы для сравнения.

Кроме того, действие 20 и 50 мкг/мл R23I значимо отличается от контроля.

Однако действие 100 мкг/мл R23I не приводит к значимому изменению количества белков в образцах, гомогенизированных циклами замораживание – оттаивание и ультразвуком.

Таблица 2. Уровень значимости с поправкой Benjamini, оцененный тестом Фишера						
	0	20	50	100	0У*	100У*
0	1					
20	6.92E-15	1				
50	6.92E-15	0.058886	1			
100	1	2.20E-07	8.18E-11	1		
0У*	0.000131	1.38E-14	1.38E-14	0.640444	1	
100У*	0.000131	2.75E-10	1.67E-13	1.38E-14	0.003743	1

У* – гомогенизация методом ультразвука

Сравнение белков разных групп показало, что при добавлении в клеточную среду R23I в концентрации 20 и 50 мкг/мл происходит снижение уникальных, общих и общего количества обнаруженных белков (Таблица 1). В клетках, не обработанных пептидом, описано 100 уникальных белков.

Для клеток, обработанных 20 мкг/мл R23I, характерно наличие 11, для 50 мкг/мл R23I – 2, а для 100 мкг/мл R23I – 176. Снижение количества уникальных белков в 50 раз относительно контроля в клетках, обработанных 50 мкг/мл R23I, может быть связано с отсутствием роста клеточной культуры при максимальном антибактериальном эффекте при действии этой концентрации. Кроме того, отмечается уменьшение количества белков в клетках обработанных 20 мкг/мл в 9 раз по сравнению с контролем. Рост клеточной культуры при действии 20 мкг/мл не изменялся относительно контроля (по спектрофотометрическим данным), однако снижение количества общих, уникальных и всего набора белков может говорить о проявлении антимикробного действия R23I. С другой стороны, увеличение уникальных и общего количества обнаруженных белков еще раз подтверждает тот факт, что концентрация R23I равная 100 мкг/мл и выше приводит к снижению антимикробного эффекта по отношению к клеткам *T. thermophilus*.

Аннотирование определённых белков, по ключевым словам (Keywords) базы данных Uniprot, позволяет оценить изменения белкового состава по 10 категориям: биологический процесс, клеточный компонент, разнообразия кодирующих последовательностей, молекулярная функция и другие. Сравнение клеточных белков, аннотированных как цитоплазматические и мембранные, показало, что при воздействии 20 и 50 мкг/мл R23I наблюдается снижение количества цитоплазматических и мембранных белков относительно контроля. Вероятно, это снижение связано с общим снижением количества белков в пробах.

При действии 20 и 50 мкг/мл R23I в клетках уменьшается количество аминоксил-тРНК-синтетаз и белков участвующих в биосинтезе аминокислот (биосинтез изолейцина, треонина, метионина, гистидина и ароматических аминокислот). Интересно, в образцах, подвергшихся воздействию 20, 50 и 100 мкг/мл R23I, снижается количество белков биогенеза рибосом. Снижение количества белков этой группы может указывать на снижение уровня биосинтеза белка. На снижение биосинтетической активности указывает уменьшение количества белков, участвующих в репликации ДНК, а также биосинтезе пуринов непрямым путем и *de novo*. Помимо уменьшения биосинтетической активности наблюдается снижение белков, имеющих протеолитическую и нуклеазную активность. Снижение анаболических и катаболических процессов может указывать на нахождение клеток, подвергшихся воздействию R23I, в стрессовых условиях. Возможно, снижение биосинтетической активности определяется снижением уровня энергетического метаболизма. Так, например, уменьшение ферментов глиоксилатного пути, белков участвующих в окислительно-восстановительных реакциях может приводить к снижению продукции ATP, NADH и других макроэргов. Таким образом, уменьшение анаболических процессов биосинтеза белков и нуклеиновых кислот может быть следствием энергетических потерь, вызванных нарушением функциональной целостности клеточной стенки и/или мембраны. Однако нельзя исключать внутриклеточные мишени действия R23I.

В числе этих «чувствительных» белков треть связана с окислительно-восстановительными процессами энергетического метаболизма. Помимо белков участвующих в транспорте электронов (cytochrome c oxidase subunit 2, isocitrate dehydrogenase (NADP), NADH-quinone oxidoreductase subunit 2), в этом наборе белков особенно выделяется redox-sensing transcriptional repressor Rex, являющийся регулятором анаэробного метаболизма [10]. Этот репрессор приводит к анаэробной регенерации NAD⁺, путем образования лактата, формиата и этанола, нитратное дыхание и синтез АТФ, что может подтверждать гипотезу о снижении продукции АТФ, NAD⁺ и других макроэргов.

Нами проведена оценка антимикробной активности искусственно синтезированных пептидов. Исследованы основные зависимости наступления антибактериального эффекта от концентрации пептида и времени его действия. Среди исследуемых пептидов R23I обладает наибольшей антимикробной активностью. Минимальная ингибирующая опытная концентрация (MIC) R23I равна 50 мкг/мл. При увеличении концентрации более 500 мкг/мл наблюдается снижение антимикробного действия. MIC для R23T и V10I соответственно равны 500 и 1000 мкг/мл, что указывает на их меньшую эффективность по сравнению с R23I. Дозо-зависимый характер антимикробного действия пептидов был продемонстрирован кривыми отклика. Зависимость «доза-эффект» для канамицина и для R23I имеют различную природу, что указывает на различные механизмы действия. Время наступления эффекта для канамицина и для R23I наступает в первые часы воздействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 18-14-00321).

ЛИТЕРАТУРА

1. Азимова, В.Т., и др. (2015). Современные проблемы науки и образования, (1–1), 1337–1337.
2. Wang, G. (Ed.). (2017). Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies. Cabi.
3. Wang, G. (2016). Structural Analysis of Amphibian, Insect, and Plant Host Defense Peptides Inspires the Design of Novel Therapeutic Molecules. In Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents (pp. 229–252). Springer, Cham.
4. Barlow, P.G., et al. (2011). PloS one, 6(10).
5. Hsieh, I.N., & Hartshorn, K.L. (2016). Pharmaceuticals, 9(3), 53.
6. Ahmed, T.A., & Hammami, R. (2019). Journal of food biochemistry, 43(1), e12546.
7. Jenssen, H., et al. (2006). Clinical microbiology reviews, 19(3), 491–511.
8. Console, S., et al. (2003). Journal of Biological Chemistry, 278(37), 35109–35114.
9. Levitsky, L.I. et al. (2018) J. Proteome Res. 2018, 17, 2249–2255
10. Pagels, M., et al. (2010). Molecular microbiology, 76(5), 1142–1161.

УДК 577.214.39

SYNTHETIC INHIBITORS TARGETING KU/DNA INTERACTION AS A POSSIBLE TOOL TO STUDY DNA-MEDIATED REGULATION OF TRANSCRIPTION BY KU PROTEIN.

E. Pavlova, S. Korolev, O. Shadrina, A. Mantysyzov, M. Gottikh

Lomonosov Moscow State Universit, Moscow, Russia

Human Ku heterodimeric protein participates in DNA double strand break repair and effectively binds to free ends of double stranded DNA, but its ability to interact with internal DNA regions such as gene promoters has not yet been clearly shown. Nevertheless, Ku can contribute to the transcription regulation of cellular and viral genes including IIIV–I through interactions with proteins or DNA. We assumed that during IIIV–I transcription Ku could directly bind to the viral promoter. We investigated the effect of Ku intracellular concentrations on the transcription of the firefly luciferase gene under the control of the IIIV–I LTR promoter. It was found that the depletion of Ku subunits by both siRNAs and CRISPR/Cas9 monoallelic knockout significantly decreased the transcription efficiency, whereas overexpression of each Ku subunit equally activated luciferase expression from the LTR promoter. Also, we found that both recombinant Ku and Ku from the nuclear cell lysate were able to interact with DNA containing IIIV–I promoter in the absence of free DNA ends. Using the available crystallographic structure of Ku/DNA complex we built a pharmacophore model describing key contacts of a DNA duplex with Ku. The model was implemented to filter ChemDiv collection of compounds and select 232 molecules fitting the pharmacophore. The subset of compounds for initial screening was further fetched taking into account the results of virtual docking of the molecules to the putative binding site on the Ku heterodimer surface. We carried out three consecutive rounds of EMSA experimental screening on recombinant Ku and identified a new structural class of Ku/DNA interaction inhibitors with an IC₅₀ within micromolar range.

The work was supported by RFBR grant 18-04-00542.