

# Влияние первичной последовательности микроцина в *escherichia coli* на процесс его созревания

Еремина Александра

Москва, ГБОУ ЦО №57 «Пятьдесят седьмая школа», 11 класс

Руководитель: Пискунова Юлия Валериевна, аспирант Института биологии гена РАН

В настоящее время известно большое число пептидов, в процессе созревания которых в их структуру вносятся оксазольные и тиазольные гетероциклы, - это микроцины (ТОММ). [1] Изучение ТОММ является весьма перспективным в связи с тем, что уже сейчас известны случаи их практического применения. [2, 3] Некоторые найденные пути химического синтеза представителей этого семейства являются весьма затратными и сложными, поэтому большие надежды возлагаются на изучение, синтез и разработку представителей данного класса веществ с использованием биотехнологических методов. Микроцин В является типичным и наиболее изученным представителем ТОММ.

Антибактериальный пептид микроцин В (microcin В) используется бактериями во внутривидовой и межвидовой борьбе. [4] Механизм его действия связан с его способностью ингибировать работу бактериального фермента ДНК-гиразы, что приводит к гибели клеток [5,6]. Как известно, генетический аппарат бактерий представлен в виде замкнутой цепи ДНК, а поэтому при репликации ДНК возникает явление сверхспирализации. Разделение полученных ДНК является необходимым для дальнейшего успешного функционирования клетки и выполняется классом ферментов - топоизомераз, способных изменять топологию ДНК. В частности, ДНК-гираза, одна из разновидностей топоизомераз, способна осуществлять процесс разъединения цепей посредством введения двухцепочечных разрывов в структуру ДНК, а затем раскручивать их и сшивать в две отдельные кольцевые молекулы. [7] Микроцин В воздействует на ДНК-гиразу в момент нанесения двухцепочечных разрывов, ингибируя дальнейшее действие фермента. [8]

Информация о генах, кодирующих пептид-предшественник микроцина В и белки, осуществляющие посттрансляционные модификации этого пептида, содержится на плазмиде в едином опероне, состоящем из 7 генов: *mcbA-G*. Ген *mcbA* кодирует пептид-предшественник микроцина. Посттрансляционные модификации *mcbA* осуществляются тремя ферментами: *McbB*, *McbC*, *McbD*. Белки, кодируемые генами *mcbE* и *mcbF*, осуществляют экспорт зрелого антибиотика из клетки хозяина, а ген *mcbG* обуславливает резистентность бактерии-хозяина к действию антибиотика.

Зрелый микроцин содержит 8 гетероциклов в своей структуре: это 4 оксазольных и 4 тиазольных кольца, образующихся при модификации цистеиновых и сериновых остатков, содержащихся в пептиде-предшественнике. [9] Изначально считалось, что гетероциклизация происходит последовательно с одного конца молекулы на другой, но некоторые данные указывают на иное течение процесса гетероциклизации: после окончания последовательного образования циклов возможно образование новых циклов в различных частях цепи. [10] Это позволило предположить, что утверждение о последовательности образования циклов в пептиде-предшественнике является ложным.

Целью данной работы является выяснение порядка течения процесса гетероциклизации, для подтверждения высказанной гипотезы. В ходе исследования произошло изменение генетической последовательности *mcbA* посредством делеции некоторых генов, кодирующих аминокислотные остатки, подвергающиеся гетероциклизации в процессе формирования антибиотика (*ser40-cys41*, *cys51-ser52*, *cys55-ser56*). Таким образом, в полученных мутантах уменьшалось количество потенциально возможных гетероциклов в составе микроцина. Такой эксперимент позволяет проверить предположение о непоследовательном формировании оксазольных и тиазольных колец в антибиотике: при зависимости формирования одного гетероцикла от сформированности предыдущего в изучаемых мутантах не должны циклизироваться серины и цистеины, находящиеся в гене после делеции. В течение исследования мутантные гены нарабатывались в различных клетках с использованием плазмид *pBAD* и *pUC19*, были использованы методы рестрикции, легирирования,

ПЦР, электрофорез, секвенирование и др. Данная работа также предполагает изучение зависимости эффективности действия антибиотика от используемых делеций: в настоящий момент эти исследования проводятся в лаборатории.

Выявление действительного порядка гетероциклизации остатков серина и цистеина в пептиде-предшественнике микроцина В, является важным направлением исследований по изучению данного антибиотика. Определение последовательности механизмов образования циклов создает возможности для разработки новых синтетических антибиотиков на основе микроцина В, обладающих нужными человеку фармацевтическими свойствами. Ввиду быстрого возникновения резистентности бактерий к используемым препаратам на основе антибиотиков лекарственный рынок постоянно нуждается в новых веществах, позволяющих бороться с патогенными микроорганизмами. Микроцин В, возможно, станет одним из новых используемых в данной сфере компонентов.

#### Литература:

1. Melby, J. O., Nard, N. J. & Mitchell, D. A. Thiazole/oxazole-modified microcins: complex natural products from ribosomal templates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 369–378 (2011).
2. Ho, D. D. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123–126 (1995).
3. Salvatella, X., Caba, J. M., Albericio, F. & Giralt, E. Solution Structure of the Antitumor Candidate Trunkamide A by 2D NMR and Restrained Simulated Annealing Methods. *J. Org. Chem.* 68, 211–215 (2003).
4. Baquero, F., Bouanchaud, D., Martinez-Perez, M.C., and Fernandez, C. Microcin plasmids: a group of extrachromosomal elements coding for low-molecularweight antibiotics in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 135: 342–347.(1978);.
5. K. Severinov, E. Semenova, A. Kazakov, T. Kazakov and M.S. Gelfand. Low-molecular-weight post-translationally modified microcins. *Molecular Microbiology* (2007) 65(6), 1380–1394;
6. F. J. del Castillo, I. del Castillo and F. Moreno, *J. Bacteriol.*, 2001, 183, 2137–2140; J. L. Vizán, C. Hernandez-Chico, I. del Castillo and F. Moreno, *EMBO J.*, 1991, 10, 467–476;
7. J. Piton, S. Petrella, C. Mayer et al. Structural Insights into the Quinolone Resistance Mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Gyrase. *PLoS ONE*, August 2010, Vol. 5, Issue 8, e12245;
8. M. Herrero and F. Moreno, *J. Gen. Microbiol.*, 1986, 132, 393–402;
9. Y. M. Li, J. C. Milne, L. L. Madison, R. Kolter and C. T. Walsh, *Science*, 1996, 274, 1188–1193;
10. Roy, R. S., Belshaw, P. J. & Walsh, C. T. Mutational Analysis of Posttranslational Heterocycle Biosynthesis in the Gyrase Inhibitor Microcin B17: Distance Dependence from propeptide and tolerance for substitution in a GSCG cyclizable sequence. *Biochemistry* 37, 4125–4136 (1998).