

Исследование антимикробных свойств оксазол-тиазол-модифицированного пептида из *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*

Травин Дмитрий Юрьевич

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: travin_birds@mail.ru

Тиазол-оксазол-модифицированные микроцины (ТОММ) представляют собой группу разнообразных рибосомально-синтезируемых пептидов, содержащих тиазольные и оксазольные ароматические гетероциклы. Тиазолы и оксазолы образуются в результате пост-трансляционной циклизации остатков цистеина и серина в составе пептида, осуществляемой специализированными ферментами [1][2]. Кодированные ТОММ последовательности в силу небольшого размера плохо распознаются при автоматической аннотации генома, но могут быть найдены анализом входящих в тот же оперон ферментов пост-трансляционной модификации, демонстрирующих сходство у различных бактерий.

Данная работа посвящена определению ряда характеристик ранее не описанного ТОММ, обнаруженного биоинформатическими методами в геноме *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*. Нам удалось гетерологически экспрессировать это соединение в ряде штаммов *Escherichia coli* (XL1, BL21(DE3)) и продемонстрировать его антимикробную активность против некоторых штаммов энтеробактерий.

В процессе исследования был оптимизирован процесс продукции вещества и создан протокол его выделения и очистки с последовательным использованием обратнотазовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Нами проведён ряд экспериментов с использованием методов масс-спектрометрии для подтверждения структуры вещества, в том числе создан ряд мутантов, содержащих одиночную замену аминокислотного остатка в N-концевой части последовательности полипептида, было проанализировано влияние этих замен на возможность образования первого N-концевого цикла в молекуле.

Для выяснения мишени антимикробного вещества в бактериальной клетке был произведён отбор мутантов, проявляющих пониженную чувствительность к воздействию вещества. Отдельные колонии *Escherichia coli* BW25113 отбирались двумя различными методами: в первом случае бактерии культивировались на среде, содержащей вещество, во втором вещество непосредственно продуцировалось с плазмиды, трансформированной в бактериальную клетку. Для всех мутантов была исследована скорость роста на богатых и минимальных средах, определена минимальная ингибирующая концентрация вещества.

Геномы восьми отобранных двумя методами мутантов и родительского штамма были определены при помощи высокопроизводительного секвенирования (на платформе Illumina). На основе сравнения результатов секвенирования нами получен набор генов, мутации в которых, предположительно, участвуют в повышении устойчивости к исследуемому веществу (анти-сигма-Е фактор RseA, орнитин-декарбоксилаза и др.). Мы планируем экспериментально валидировать роль этих генов в устойчивости с помощью исследования нокауты по данным генам и сверхэкспрессии генов на плаزمидах.

Источники и литература

- 1) М. В. Метелев and Д. А. Гиляров, "Структура, Функция И Биосинтез Тиазол-Оксазол-Модифицированных Микроцинов," Молекулярная Биология, vol. 48, no. 1, pp. 36–54, 2014

- 2) K. Severinov, E. Semenova, A. Kazakov, T. Kazakov, and M. S. Gelfand, “Low-molecular-weight post-translationally modified microcins,” *Mol. Microbiol.*, vol. 65, no. 6, pp. 1380–94, Sep. 2007.