

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН



2015 * № 1

Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Ю.Б. Иванов, А.С. Васильченко, 2015

УДК 579.62

Ю.Б. Иванов, А.С. Васильченко

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ ТРОМБОДЕФЕНСИНОВ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Разработка методов выделения катионных тромбоцитарных белков, конструирование люминесцирующих штаммов бактерий для тестирования активности тромбодифензинов.

Материалы и методы. Выделение тромбоцитарной массы, очистка тромбодифензинов методом ТФЭ, Создание генетической конструкции, эффективно экспрессирующей гены люциферазы (*luxAB*) природных люминесцирующих грамотрицательных микроорганизмов в клетках грамположительных бактерий. Использование атомно-силовой микроскопии (АСМ) для оценки морфо-функциональной реакции бактериальных клеток на воздействие тромбодифензинов.

Результаты. Разработана технология выделения, очистки и тестирования активности тромбодифензинов в биологических жидкостях и предложена панель репортерных штаммов для их определения. Дана оценка возможности их использования для исследования бактерицидной активности сыворотки крови в сравнении с традиционным методом оценки присутствия тромбодифензинов в данной биологической жидкости. Впервые методом АСМ проведен анализ эффектов тромбодифензинов человека в отношении морфо-функциональных характеристик модельных микроорганизмов.

Заключение. Полученный результат явился обоснованием для использования рекомбинантных люминесцирующих штаммов *Escheichia coli*, позволяющих специфично проводить количественное определение активности катионных антимикробных пептидов в биологических жидкостях сложного компонентного состава.

Ключевые слова: тромбодифензины, выделение, тестирование, биологическая активность.

I.B. Ivanov, A.S. Vasilchenko

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR MANAGEMENT OF NOVEL TEST-SYSTEMS ON THE BASE OF THROMBODEFENSINS FOR EXPRESS-DIAGNOSTIC INFECTIOUS DISEASES

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

Aim. The goal of a project is separation of the model platelet protein mixture on prepared monolithic ultrashort columns in comparison with reversed phase high performance liquid chromatography (RP HPLC) and characteristic of the molecular and cellular mechanisms of the natural (innate) immunity, based on an assessment of the response of a bioluminescent bacterial test systems with constitutive or inducible light emission.

Materials and methods. Separation of light molecular weight PHP from the high molecular weight proteins by solid phase extraction procedure on different types of sorbents (normal phase, reversed phase, weak cation-exchangers, short monolithic columns), as well as in micro-preparative mode was studied.

Results. Ultracentrifuge and dialysis procedure for the preliminary isolation of PHP from the human platelets was developed. A genetic construction that effectively expressed the luciferase

genes (luxAB) of natural luminescent gram-negative microorganisms in gram-positive bacteria cells is created. Some action of thrombodefensins on morphological and mechanical properties of *Escheichia coli* cells were revealed by atomic force microscopy.

Conclusion. The results obtained were the experimental basis for the development of original bioluminescent technology assessment humoral bactericidal systems in the system of non-specific innate immune of humans and animals, which was based on the original panel of luminescent strains, which structural features of the surface structures allow to evaluate the consistency of molecular system.

Key words: thrombodefensins, isolation, testing, biological activity.

Введение

В течение последних 15 лет значительное количество работ было посвящено микробицидным белкам, образующимся в результате отклика иммунной системы человека и животных [1-3]. Вызвано это повышением количества инфекционных заболеваний, связанных с микроорганизмами, которые проявляют устойчивость ко многим антимикробным препаратам [4, 5]. Указанные обстоятельства диктуют необходимость расширения арсенала лекарственных средств, обладающих микробицидным действием [6].

В качестве бактерицидных препаратов в настоящее время, в основном, применяются синтетические и полусинтетические антибиотики (фторхинолоны, аминогликозиды и др.), к которым у большинства микроорганизмов быстро формируется устойчивость [7]. Кроме того данные препараты обладают токсическим действием на органы и системы организма человека и животных, способствуют развитию дисбактериозов.

Ранее были использованы антимикробные пептиды, выделенные из нейтрофилов человека, кролика и мыши для лечения и профилактики инфекционных заболеваний [8]. Известно, что кроме нейтрофилов в противоинфекционной защите макроорганизма определенную роль играют тромбоциты, поскольку:

- а) тромбоциты адгезируются на патогенных микроорганизмах;
- б) обладают противогрибковым, бактерицидным и антипротозойным действием *in vitro*;
- в) при взаимодействии с микроорганизмами *in vitro* тромбоциты высвобождают низкомолекулярные бактерицидные белки [9].

В последнее время рядом авторов было показано, что в крови человека и животных образуется ряд антибактериальных тромбоцитарных катионных белков (ТКБ) – тромбоденсина, появление которых стимулируется фи-

зиологической активностью тромбинов против бактериальных и фунгицидных патогенов, которые внедряются в кровоток [10, 11].

В последствии было показано, что кроме ТКБ образуется и ряд анионных белков (ТАБ), обладающих различным вкладом в антибактериальную защиту организма при слабокислых и слабощелочных рН (табл.).

Таблица. Характеристики тромбодифензинов человека [12]

№ п/п	Пептид	ММ, Да *	Суммарный заряд при рН=7,5 - 5,5	Содержание в тромбоцитарной массе, nmol/10 ¹⁰
1	FP-A	-	-3,00 -2,86	<1,0
2	FP-B	1.551,6 ^a	-3,00 -2,88	<1,0
3	Tβ-4	4.962,2 (4.963,5) ^b	-3,00 -2,52	2,0
4	PBP	10.260,6 (10.261,9)	+3,55 +5,96	2,0
5	СТАР-3	9.287,0 (9.287,8)	+0,53 +2,95	23
6	RANTES	7.850,5 (7.847,1)	+4,52 +5,99	0,2
7	PF-4	7.765,0 (7.766,2)	+2,57 +4,84	15

Примечание: а - Молекулярная масса (ММ) оценена при помощи масс-спектрологии; б - Молекулярная масса (ММ) вычислена из данных аминокислотного сиквенса соответствующих пептидов.

Как видно из таблицы, первые три белка являются тромбоцитарными анионными белками (ТАБ), к ним относятся – фибринопептиды А и В (FP-A, Б) и тимозин (Тβ-4).

Остальные являются тромбоцитарными катионными белками (ТКБ):

- тромбоцитарный основной белок (PBP);
- соединительно-тканевый антивирусный пептид (СТАР-3);
- катионный пептид (Rantes);
- тромбоцитарный фактор 4 (PF-4).

В противоположность ТАБ, проявляющим в большинстве случаев незначительные антимикробные свойства при повышенном рН=7,2 (хотя их биохимия и биология сходна с другими тромбодифензинами), ТКБ показывают сильную *in vitro* антибактериальную активность, достигающую максимума при рН=5,5 [4]. Катионная природа большинства этих белков является основополагающим фактором, определяющим вектор доставки ТКБ и разрушения мембран бактерицидных клеток (патогенов).

Аминокислотный состав в комбинации с их молекулярными массами (ММ) предполагает, что большинство из этих белков состоит из различных

молекул, не происходящих из единого общего предшественника. Основываясь на их первичной структуре можно предположить, что антибактериальные пептиды классифицируются на четыре группы. Большинство из обнаруженных до сих пор белков существуют в виде β -спиральных структур, содержащие последовательности из 4-6 фрагментов цистеина, связанных дисульфидными мостиками. Другие классы состоят из амфифильных, пролин-насыщенных и связанных циклических белков [2, 6]. Таким образом, весьма сложная природа самих тромбоцитарных пептидов, отягощенная "тяжелым матриксом" высокомолекулярных белков, содержащихся в тромбоцитах, требует многоступенчатой процедуры выделения и очистки тромбодифензинов.

Обычными приемами получения антимикробных пептидов из тромбоцитов являются: а) ресуспендирование тромбоцитарной массы в ледяной (70%) уксусной кислоте; б) инкубация при температуре 258°К в течение 4 часов; в) разморозка суспензии; г) центрифугирование при комнатной температуре; д) фильтрация супернатантов через диализные мембраны различной пористости. В дальнейшем проводится очистка ТКБ разными хроматографическими методами (гельфильтрация, ионная хроматография).

Несмотря на то, что некоторые методы выделения белков описаны в литературе, они характеризуются значительной трудоемкостью и достаточно низким выходом целевых продуктов [10-12].

В настоящей работе поставлена задача упрощения методологии выделения, очистки и анализа катионных тромбоцитарных белков на основе современных приемов ВЭЖХ и твердофазной экстракции, а также конструирование оригинальных люминесцирующих штаммов бактерий, эффективно экспрессирующих гены бактериальной биолюминесценции с оценкой возможности их использования для исследования бактерицидной активности сыворотки крови в сравнении с традиционным методом определения присутствия тромбодифензинов в данной биологической жидкости.

Материалы и методы

В работе использовали растворители и химические реактивы марок ХЧ и ОСЧ (Нева-Реактив, Криохром, Реахим, Россия).

Для выделения тромбоцитарной массы использовали стандартную процедуру центрифужного разделения крови здоровых доноров (человеческой или лошадиной) с цитратным коагулянтом на фракции, содержащие плазму крови и эритроцитарную смесь, содержащую, кроме эритроцитов, лейкоциты и

тромбоциты. Далее – 50 мл такой массы ресуспендировали в 300 мл ледяной (70%) уксусной кислоты и инкубировали при температуре 258°K в течение 24 часов. После инкубации и размораживания суспензию клеток подвергали центрифугированию при 1000g в течение 30 минут при комнатной температуре. Полученные супернатанты, содержащие тромбоденсинины хранили при температуре 258°K.

Предварительная очистка тромбоцитарной массы супернатанта методом твердофазной экстракции (ТФЭ) проводилась при помощи микроколочных картриджей фирмы Биохиммак и НТЦ «Ленхром» (Россия) с использованием в качестве сорбентов модифицированные DEAE и C16 кремнеземы.

Планарную тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили методом восходящего потока при помощи "Базового набора для ТСХ" фирмы "Ленхром" (Россия). Количественную ТСХ и компьютерную визуализацию хроматограмм осуществляли с помощью видеоденситометра "ДенСкан" (НТЦ "Ленхром", Россия) в видимой и люминесцентной (при длине волны 365 нм) областях спектра. В качестве тонкослойных пластинок использовались обратнофазные (ОФ) пластинки RP-18 F254 фирмы "Merck" (Германия). Для детектирования хроматограмм применяли метод проявления белковых составляющих при помощи 0,3 % раствора нингидрина в ацетоне с добавкой уксусной кислоты.

Эксперименты по жидкостной хроматографии проводили на хроматографическом комплексе "Knauer" (Германия) семейства "Smartline" с рефрактометрическим и спектрофотометрическим детекторами на основе диодной матрицы. В работе использовались колонки фирмы Tessek (Чехия) 150 x 3 мм, упакованные сорбентом Separon C18, фр. 5 мкм.

В качестве матрицы для получения фрагментов ДНК с генами бактериальной биолюминесценции использована плаزمиды, любезно предоставленная *E.A. Meighen* (США) и содержащая полную кассету *lux*-генов природного морского люминесцирующего микроорганизма *Photobacterium leiognathi*. В свою очередь, в качестве инструмента для их клонирования использован T-вектор на основе плазмиды *pTZ57R* (Fermentas, Литва), а также челночные плазмиды *pLF14* и *pLF22*, способные реплицироваться в широком круге хозяев.

Фрагменты ДНК, содержащие гены *luxA* и *luxB*, кодирующие альфа- и бета-субъединицы бактериальной люциферазы – ключевого фермента бакте-

риальной билюминесценции, были амплифицированы с использованием праймеров:

luxA

LuxADir 5'–**GCGTCTCAGATCGGAAGGTGGAAGAAATAATGAAAATTAGTAATATC**– 3'

LuxARev 5' – **GCGTCTCGACGTCATAGTTTAAAAAGAACAGCTTACTGAGG** – 3'

luxB

LuxBDir 5'–**GCGTCTCGACGTCGAAGGTGGAATAAAATATGAATTTCCGGGTATTTTTTC**–3'

LuxBRev 5' – **GCGTCTCCAATTGCCGTAATTAATTTAATAAGGTTATC** – 3'

Важной особенностью этих праймеров являлось присутствие рибосом-связывающего сайта (подчеркнут) грамположительных бактерий. Кроме того, к 5' концам всех праймеров была добавлена последовательность сайта эндонуклеазы рестрикции *BsmBI* (помечена жирным шрифтом), обеспечивающая возможность последующего лигирования продуктов амплификации.

Очищенные при помощи элюции из геля фрагменты ДНК были рестрицированы и лигированы, после чего из полученной лигазной смеси амплифицированы фрагменты ДНК, содержащие искомые гены в последовательности *luxAB*. В свою очередь клонирование полученных ПЦР-продуктов в Т-векторе привело к созданию первичной плазмиды *pTZluxAB*, трансформация которой штамма *Escheichia coli* MC1061 сообщала последнему способность к выраженной билюминесценции при добавлении субстрата данной реакции – длинноцепочечного альдегида *n*-деканала в концентрации 7×10^{-6} М.

С целью интеграции *luxAB*-генов в клетки *Bacillus subtilis* они по сайтам *PstI* и *EcoRI* были переклонированы из *pTZluxAB* в челночные векторы *pLF14* и *pLF22*. При этом, несмотря на исходную предпочтительность использования последнего (меньший размер - 2,7 kb против 3,5 kb у *pLF14*, а также возможность транскрипции клонированных генов с более сильного промотора *PrepA*), созданная на его основе плазида *pLF22luxAB* характеризовалась сниженной копийностью и стабильностью. В свою очередь, перенос сформированной гибридной плазмиды *pLF14luxAB* в клетки *B. subtilis* 168 с последующим высевом бактериальной биомассы на LB-агар с 25 мкг/мл канамицина позволил получить рекомбинантный штамм *B. subtilis* 168 *pLF14luxAB* с высоким уровнем трансляции конститутивно транскрибируемых *luxAB*-генов, интенсивность свечения которого при добавлении *n*-деканала не менее чем в 10 раз превышала таковую у сконструированного ранее *B. subtilis* В-10191 с немодифицированными *luxAB*-генами *V. fischeri*.

Последующее исследование данного штамма включало оценку его реакции на воздействие 30 индивидуальных образцов сыворотки крови человека различного компонентного состава. При этом *B. subtilis* выращивали в течение 48 ч на LB-агаре при 30°C в присутствии селективного фактора (40 мкг/мл канамицина), смывали стерильным LB-бульоном и стандартизировали до оптической плотности 1,2 ед. при 540 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Полученную биомассу в соотношении 1:1 смешивали с исследуемыми образцами сыворотки крови или 0,85% раствора NaCl (контроль), после чего на 0 и 30 минутах инкубации при 37°C из полученных смесей отбирали аликвоты по 250 мкл, в которые вносили по 2 мкл деканала. Регистрацию интенсивности свечения осуществляли на люминометре «Биотокс-7» (ООО «Нера», Россия). Расчет эффектов сывороток крови на интенсивность бактериальной биолюминесценции проводили по формуле:

$$I_{\text{норм}} = \frac{I_n^{\text{опыт}} \cdot I_0^{\text{контр}}}{I_0^{\text{опыт}} \cdot I_n^{\text{контр}}},$$

где $I_0^{\text{опыт}}$ и $I_0^{\text{контр}}$, $I_n^{\text{опыт}}$ и $I_n^{\text{контр}}$ - уровни люминесценции опытной и контрольной проб на 0-й и n-ой минуте. Параллельную оценку развития бактерицидного эффекта и количественного присутствия в исследуемых сыворотках крови тромбодифенсинов проводили по известным методам.

При проведении атомно-силовых исследований использовались бактерии *Escherichia coli* K12 TG1; их культивирование проводилось на LB-агаре или в LB-бульоне («Sigma-Aldrich», США) при 37°C. Бактериальные клетки осаждались центрифугированием в течении 7-10 минут при 1000 г. Далее бактериальная масса ресуспендировалась в дистиллированной воде и в объеме 15-20 мкл наносилась на скол слюды до частичного высыхания капли, после чего образцы помещались в эксикаторы на 18-24 ч. Для создания атмосферы с заданным уровнем относительной влажности использовались эксикаторы с насыщенными растворами солей: KNO₃ (93%), KCl (84%), NaCl (75%), NaNO₂ (65%), Mg(NO₃)₂ (53%). При проведении микроскопического этапа исследования использовался атомно-силовой микроскоп SMM-2000 («Протон-МИЭТ», Россия), работающий в режиме постоянного контакта. В процессе сканирования использовались кантилеверы MSCT-AUNM («Park Scientific Instruments», США) с жесткостью балки 70,01 Н/м и радиусом кривизны иглы порядка 30 нм. Количественный морфометрический анализ по-

лученных изображений проводили с использованием штатного программного обеспечения микроскопа.

Результаты и обсуждение

Необходимость упрощения методик получения антисептических белков из тромбоцитарной массы человека и животных вытекает из сложности процедуры выделения и их предварительной очистки. Обычно тромбоцитарные пептиды получают ресуспендированием тромбоцитарной массы ледяной (70%) уксусной кислотой с последующим центрифугированием при комнатной температуре. Как правило, полученные супернатанты последовательно фильтруют через диализные мембраны Spektra Por: Biotech Regerated Cellulose Dialysis Membrana MWCO 500 (задерживающие продукты с молекулярной массой свыше 15000 Да) и Regerated CelluloseEster WCO 500 (пропускающие продукты и соли с молекулярной массой менее 500 Да). Концентрат ультрафильтрата наносят на колонку с сорбентом Sephadex-G50 и проводят элюцию с линейным градиентом ацетонитрила (от 0% до 60%) и добавлением 0,1% раствора фосфорной кислоты. Полученные методом гельпроникающей хроматографии (ГПХ) фракции объединяют и определяют общее содержание белка [3, 10-12].

Поставленная в работе задача заключалась в исключении процедуры диализной очистки (вследствие трудоемкости данного метода) и в попытке избежать использования метода ГПХ (в режиме низкого давления на сорбентах типа Sephadex). Последний метод также имеет ограничения в режиме эксклюзионной хроматографии белков, хотя известно, что ГПХ достаточно эффективна для отделения «тяжелого» белкового матрикса. Однако, по причине продолжительной процедуры хроматографирования супернатанта применение этого метода приводит к существенному уменьшению выхода целевых продуктов. Тем не менее, наша попытка прямого анализа и разделения этих низкомолекулярных белков, минуя предварительные стадии диализа и эксклюзионной хроматографии, показала, что это приводит к резкому увеличению давления в гидравлической системе хроматографа и быстрой потере эффективности хроматографических колонок. Данный эффект хорошо объясняется при рассмотрении данных, полученных с использованием ТСХ на обратнофазном кремнеземном сорбенте Merck RP-18 (рис. 1). Видно, что на старте ТСХ-пластинки ($R_f = 0$) находится значительное количество примесей,

содержащихся в тромбоцитарной массе, имеющих очень большой индекс удерживания в таких системах [11].

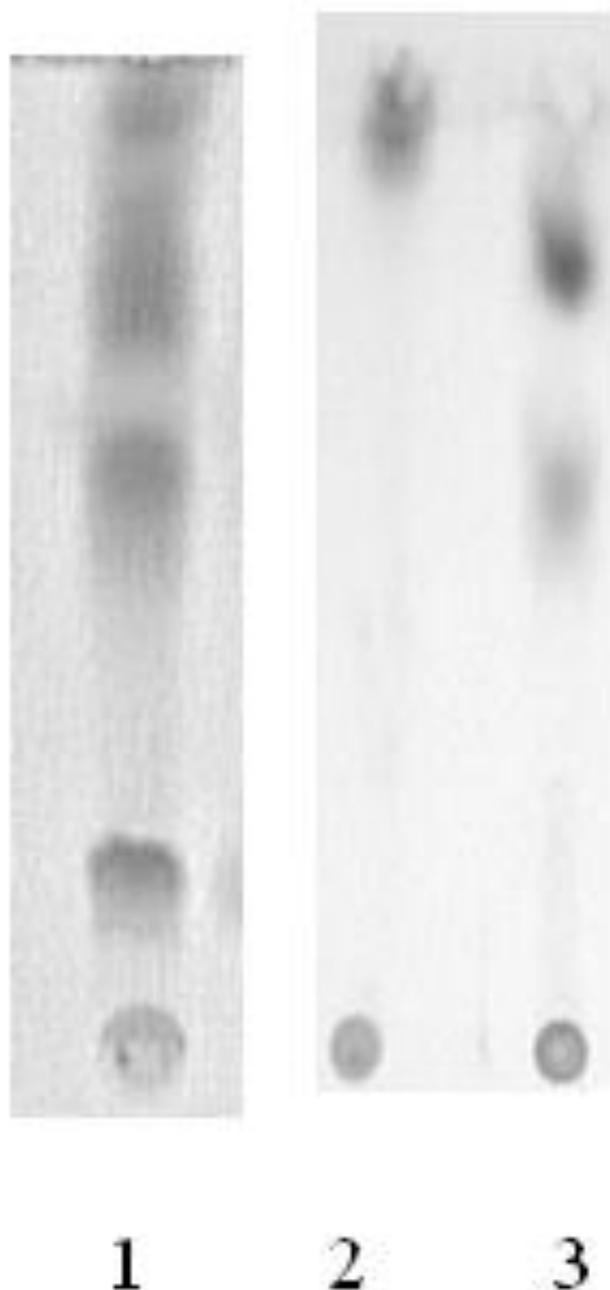


Рис. 1. Хроматограмма разделения ТНБ на пластинах RP-18F254 (Merck).

Обозначения: 1 – исходные ТНБ; 2 - после ТФЭ на патроне С16; 3 – после ТФЭ на патроне DEAE; Элюент: 0,1% водный раствор ТФУ-ацетонирил(30:70). Детектирование: нингидрин.

В связи с этими ограничениями нами предложен метод предочистки супернатанта методом твердофазной экстракции (ТФЭ) в режиме градиентного и фронтального элюирования. При выборе картриджей для ТФЭ учитывалась сложная анионо-катионная структура ТНБ (табл.). В качестве сорбентов для ТФЭ белков были выбраны обратнофазные (С16) и слабо катионные

(DEAE) сорбенты на основе кремнеземов. В качестве элюирующей смеси была выбрана система растворителей ацетонитрил-0.1% водный раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ), традиционно используемая для анализа и разделения белков и пептидов. В режиме ступенчатого градиентного элюирования использовались следующие системы: вода (смыв ацетат-иона); 0.1% водный раствор ТФУ- ацетонитрил (75:25); 0.1% водный раствор ТФУ - ацетонитрил (50:50); 0.1% водный раствор ТФУ - ацетонитрил (75:25); ацетонитрил. При таком режиме градиентного элюирования максимальная эффективность извлечения смеси ТНБ достигается при использовании системы 0.1% водный раствор ТФУ - ацетонитрил (75:25), традиционно используемой при анализе белков и пептидов.

Предварительные эксперименты показали, что наилучшие результаты по удалению "тяжелого белкового матрикса" из эритроцитарной массы и их концентрирования методом ТФЭ достигаются при использовании картриджей с умеренно гидрофобным сорбентом. Результаты по выделению целевых ТНБ на нормально-фазовых силикагелевых сорбентах показали, что наблюдалась необратимая сорбция как тяжелого матрикса, так и целевых тромбоцитарных белков, что приводит к существенному снижению выхода продукта. В то же время применение слабых анионных и ОФ картриджей показывает на частичную сорбцию тяжелого матрикса и увеличение концентрации целевых белков в элюате, что продемонстрировано методами ОФ ВЭТСХ.

Приведенные хроматограммы демонстрируют не только удаление тяжелого белкового матрикса, но и существенное различие в составе выделенных белков при использовании различных типов сорбентов для предварительной очистки ТНБ (рис. 2). Так, в случае использования слабого ионообменного сорбента происходит преимущественное концентрирование катионных белков. Полученные данные показывают, что применение слабых катионных обменных сорбентов патронов позволило получить хороший выход ТНБ без потери эффективности хроматографических колонок.

Следует отметить, что применение фазы картриджей позволяет удалить значительно большее количество примесных фракций, выходящих практически с мертвым объемом колонки (рис. 2, фракция 1). При этом наблюдается сохранение ТАБ (фракций 2 и 3) в обоих случаях, появление катионных белков (фракции 4, 5) и выделение альбуминовой фракции 7, отличающейся по времени удерживания от фракции лизоцима 6, что вполне соответствует ли-

тературным данным [12]. Однако в ТСХ экспериментах обращает на себя внимание наличие интенсивной стартовой зоны, что может быть связано с концентрационными перегрузками пластины.

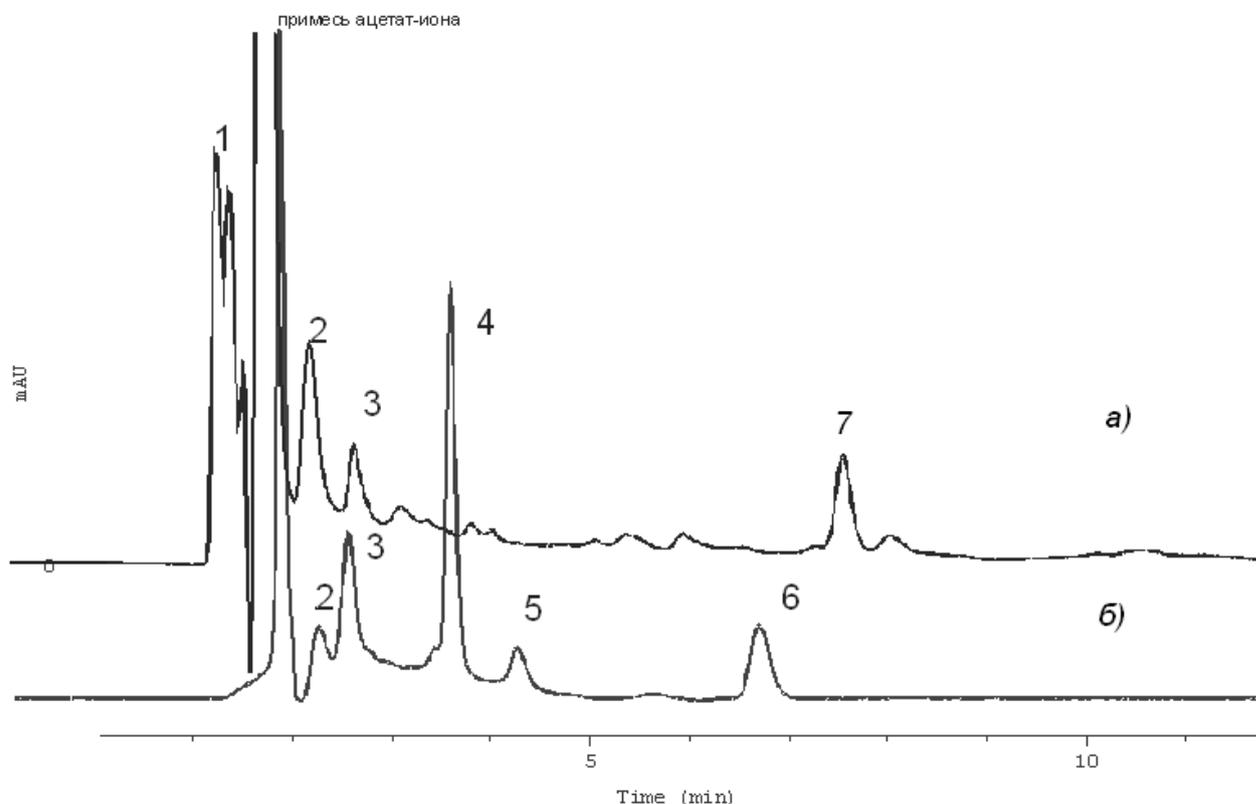


Рис. 2. ВЭЖХ ТНБ после предварительной очистки методом ТФЭ на патронах DEAE (а) и C16 (б). Колонка (15 x 3) мм RP-C18, $d_p = 5 \mu\text{м}$, элюент – 0.1% водный раствор ТФУ - ацетонитрил 25/75; режим элюирования - изокрактический, детектирование спектрофотометрическое (220 нм).

Таким образом, в работе продемонстрирована возможность выделения тромбоспондинов методом твердофазной экстракции, что существенно упрощает процедуру их выделения, минуя стадии диализной очистки и хроматографии низкого давления на сильно набухающих сорбентах. В дальнейшем планируется идентификация выделенных белковых продуктов методом MALDI/ESI масс-спектрометрии.

На втором этапе работы фрагменты ДНК, содержащие гены *luxA*, *luxB*, *luxC*, *luxD* и *luxE*, амплифицированы с использованием следующих праймеров:

luxA

LuxADir 5'–GCGTCTCAGATCGGAAGGTGGAAGAAATAATGAAAATTAGTAATATC–3'
LuxARev 5'–GCGTCTCGACGTCATAGTTTAAAAAGAACAGCTTACTGAGG–3'

luxB

LuxBDir 5' – **GCGTCTCGACGTCGAAGGTGGAATAAAATATGAATTTCCGGGTATTTTTTC**–3'

LuxBRev 5' – **GCGTCTCCAATTGCCGTAATTAATTTAATAAGGTTATC** –3'

luxC

LuxCDir 5' – **GCGTCTCCAATTGGAAGGTGGGAGATTACATGATTAAGAAGATCC** – 3'

LuxCRev 5' – **GCGTCTCCGTACGGATATATCTCTTTCTACGGTACAAAT** - 3'

luxD

LuxDDir 5' – **GCGTCTCCGTACGGAAGGTGGGATATATCATGGAAAATACACAACAT**– 3'

LuxDRev 5' – **GCGTCTCTCCGGATAGGTAAGTACTATTTAGACACTAGCCA** – 3'

luxE

LuxEDir 5' – **GCGTCTCTCCGGAGAAGGTGGGGGTТААСАТGTCAACATТАТТААА** – 3'

LuxERev 5' – **GCGTCTCGGGCCCAAATCATGATТАAGCCCTGCTTTТАТТТСА** – 3'

Последовательность сайта эндонуклеазы рестрикции BsmBI была добавлена к 5' концам всех праймеров (помечена жирным шрифтом). При этом способность BsmBI осуществлять гидролиз ДНК рядом с распознаваемой последовательностью

5`-CGTCTCN|NNNN N -3`

3`-GCAGAGNNNNN|N -5`

позволила добавить к каждому гену уникальные «липкие концы» для последующего лигирования. В результате обработанные рестриктазой фрагменты ДНК теоретически могут соединяться только в одной строго определенной последовательности: ABCDE.

Очищенные при помощи элюции из геля фрагменты ДНК были рестрицированы и лигированы. Из полученной лигазной смеси были амплифицированы фрагменты ДНК, содержащие искомые гены в последовательностях: luxAB, luxDE, luxCD и luxCDE, однако фрагмент со всеми пятью генами получить не удалось.

В результате клонирования полученных ПЦР-фрагментов в T-векторе на основе плазмиды pTZ57R (Fermentas MBI, Литва) были сконструированы плазмиды pTZluxAB, pTZluxCD и pTZluxDE. При этом перенос первой из них в штамм *E. coli* MC1061 обеспечивал развитие высокого уровня биолюминесценции при добавлении субстрата люциферазной реакции - n-деканала.

На следующем этапе гены luxAB по сайтам PstI и EcoRI были переклонированы из pTZluxAB в челночный вектор pLF22. Перенос полученной плазмиды pLF22luxABleo в клетки *E. coli* MC1061 также обуславливал раз-

витие сравнительно высокой люминесценции в присутствии n-деканала, оказывающейся, однако, несколько ниже, чем при использовании pTZluxAB.

Возможным объяснением этого может являться установленное в эксперименте снижение копийности плазмиды pLF22luxABleo по сравнению с исходным вектором pLF22. Различия в копийности и сниженная стабильность плазмиды pLF22luxABleo, предположительно, обусловлены проявлением так называемого «полярного эффекта» при клонировании длинного (более 2000 п.н.) фрагмента ДНК с генами luxAB между *perA* и *perB* генами. Кроме того эффективность трансформации плазмиды pLF22luxABleo в клетки *B. subtilis* оказалась невысокой, в результате чего, несмотря на неплохие биолюминесцентные характеристики, в дальнейшей работе данная конструкция не использовалась.

Для получения более стабильной конструкции на следующем этапе использован челночный вектор pLF14, в который по сайтам PstI и EcoRI были переклонированы гены luxAB из плазмиды pTZluxAB. Полученный при трансформации штамма *E. coli* MC1061 плазмидой pLF14luxABleo вариант характеризовался высоким уровнем биолюминесценции в присутствии n-деканала. Последующие же попытки переноса плазмиды pLF14luxABleo в клетки *B. subtilis* заставили констатировать, что эффективность трансформации использованного штамма *B. subtilis* 3399 была на два порядка ниже, чем известного лабораторного штамма *B. subtilis* 168.

Исследование люминесцентного отклика и жизнеспособности *B. subtilis* lux(+) при контакте с хроматографически очищенным препаратом тромбодифенсина (ТД) позволило зафиксировать существенный параллелизм в изменении результативных параметров. При этом, с одной стороны, продемонстрирован идентичный (пологий) характер зависимостей «доза-эффект», описываемый графиками изменения интенсивности свечения и жизнеспособности бактериальных клеток-мишеней в соответствующей системе координат; с другой стороны, зафиксировано опережающее по отношению к развитию бактерицидного эффекта угнетение биолюминесценции созданного сенсорного штамма, характеризуемого величиной $EC_{50}=28,4\pm 2,9$ мкг/мл против $LD_{50}=175,0\pm 20,4$ мкг/мл. Сравнение характера реакции на ТД у *B. subtilis* lux(+) с таковой у *E. coli* lux(+) позволила констатировать достоверно большую чувствительность последнего к данному катионному антимикробному пептиду (КАМП). При этом особенностями реагирования *E. coli*

lux(+)) являлись как меньшие значения характеристических величин $EC_{50}=7,1$ мкг/мл и $LD_{50}=55,1$ мкг/мл, так и иные (крутые) зависимости между увеличением концентрации действующего агента и параметрами светимости / жизнеспособности бактериальных клеток-мишеней.

Другая группа экспериментальных данных получена при исследовании биолюминесценции и жизнеспособности *B. subtilis* lux(+) и *E. coli* lux(+) при воздействии биологических жидкостей сложного компонентного состава – сыворотки крови человека и морской свинки. При этом постановка эксперимента включала использование интактной сыворотки, содержащей термостабильную систему КАМП/ТД и термолабильную бактерицидную систему комплемента, а также ее термоинактивированный (56°C, 10 мин) вариант.

Исследование реакции *E. coli* lux(+) на воздействие интактной сыворотки крови позволило зафиксировать фазные изменения уровня свечения, отражающие последовательные этапы активации системы комплемента и демонстрирующие чувствительность *E. coli* lux(+) к данной бактерицидной системе. С другой стороны, процедура термоинактивации вела к выраженным качественным и количественным изменениям результативных параметров, заключающимся в достоверном снижении ингибирующего влияния как на светимость, так и на жизнеспособность использованных клеток-мишеней. В свою очередь *B. subtilis* lux(+) при воздействии как интактной, так и термообработанной (с инактивированной бактерицидной системой комплемента) сывороток крови демонстрировал статистически неотличимые значения IC_{50} и LD_{50} ($P>0,05$). Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что при контакте с биологическими жидкостями сложного компонентного состава реакция *B. subtilis* lux(+) на присутствующую в них термостабильную бактерицидную систему КАМП/ТД является более специфичной, чем таковая у *E. coli* lux(+).

Использование метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволило визуализировать результат взаимодействия ТД с клетками *E. coli*, объясняющий особенности описанной выше люминесцентной реакции (рис. 3). При этом в случае использования низких (суббактерицидных) концентраций данного КАМП зарегистрирована агрегация липополисахаридов наружной мембраны модельного микроорганизма с соответствующим увеличением показателя шерховатости его поверхности, что является вероятной причиной активации гена *fabA*, задействованного в биосинтезе мембранных липидов.

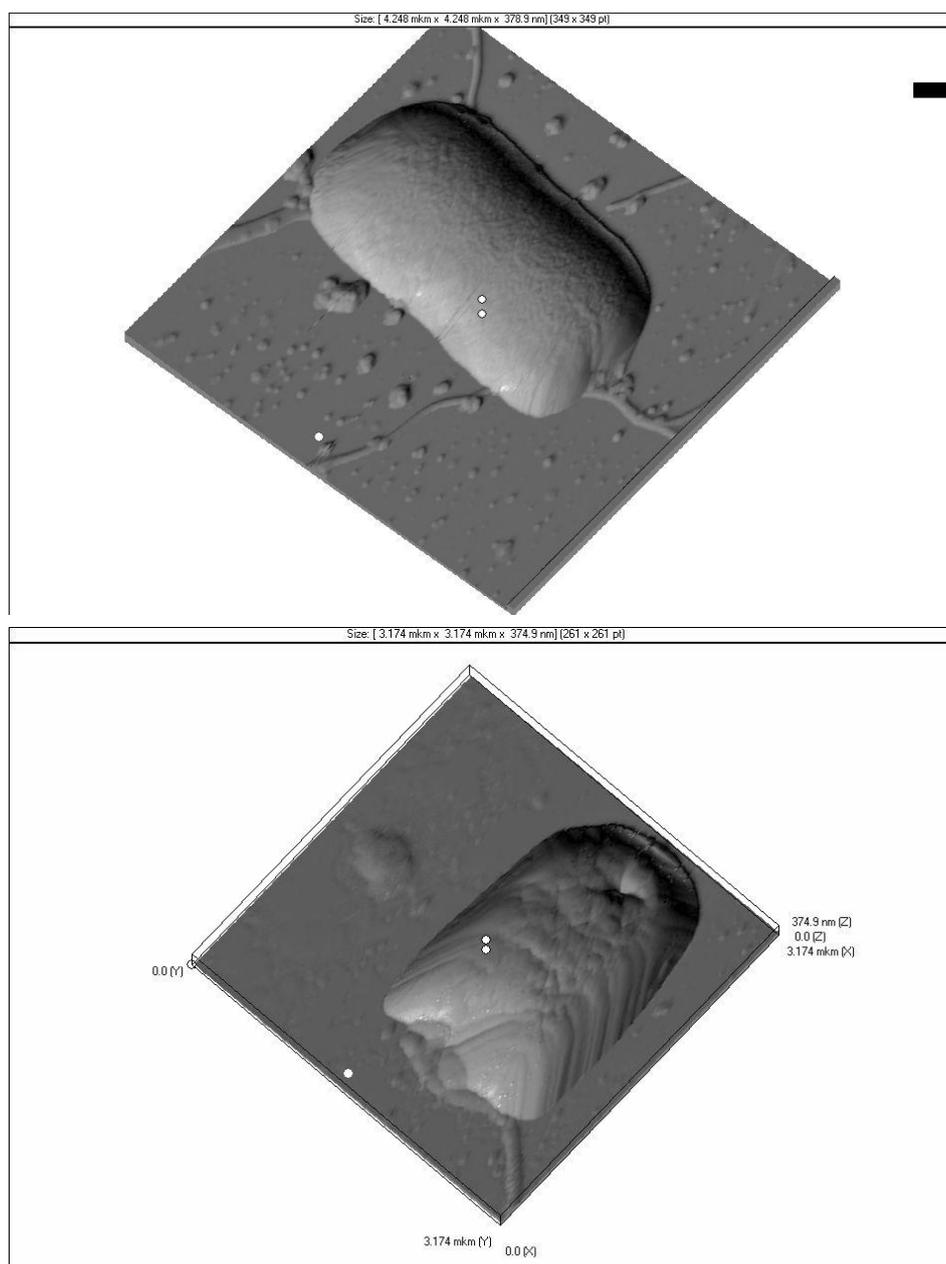


Рис. 3. Результаты атомно-силовой микроскопии клеток *Escherichia coli* K12 TG1 в контроле (верхний ряд) и после воздействия ТД (нижний ряд).

В свою очередь, результатом увеличения концентраций ТКБ до уровня LD50 и выше становилось необратимое формирование поровых комплексов диаметром $165,9 \pm 62,7$ и глубиной $20,6 \pm 10,7$ нм, существенно нарушающих целостность наружной мембраны.

Заключение

Полученные результаты показали возможность выделения тромбоденсина методом твердофазной экстракции, что существенно упрощает процедуру их выделения, минуя стадии диализной очистки и хроматографии низкого давления на сильно набухающих сорбентах. В дальнейшем планиру-

ется идентификация выделенных белковых продуктов методом MALDI/ESI масс-спектрометрии.

В то же время созданные генетические конструкции тест-штаммов *B. subtilis* и *E. coli* позволят существенно модифицировать и унифицировать ряд лабораторных технологий, входящих в «Номенклатуру клинических лабораторных исследований», утвержденную Приказом Министерства здравоохранения РФ от 21.02.2000 г. №64. При этом реализация обозначенного подхода создаст возможность на основе анализа световой эмиссии в режиме реального времени получать информацию об активности гуморальных и клеточных бактерицидных систем в большом количестве биологических проб сложного компонентного состава, а также в 20-30 раз сократит время анализа, что существенно повысит производительность и технологичность выполняемых исследований. Сказанное позволяет предполагать высокую востребованность этих результатов в медицинской и ветеринарной лабораторной практике при оценке состояния неспецифического врожденного иммунитета при различных патологических и физиологических состояниях. Потребность в подобных диагностических исследованиях только в РФ оценивается не менее чем в 150000 определений в год.

Вторым предполагаемым путем использования результатов проекта является создание панели сенсорных и репортерных рекомбинантных люминесцирующих бактериальных биосенсоров для экспресс-оценки биологической активности и механизмов действия вновь создаваемых антибактериальных препаратов. При этом включение в состав подобной панели сенсорных грамотрицательного и грамположительного микроорганизмов с конститутивной экспрессией lux-генов позволит осуществлять быстрый скрининг антибактериальной активности у синтезируемых *de novo* химических соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zaat S.A., Hiemstra P.S., Dankert J. Initial characterization of antibacterial proteins from trombin-simulated platelets involved in clearance of *Streptococcus sanguis* from cardiac vegetation in experimental endocarditis. In: Pathogenic streptococci, present and future / Ed. A. Totolian. 1994: 473-475.
2. Hancock R.E.W., Scott M.G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. PNAS. 2000. 97: 8856-8861.
3. Yeaman M.R., Ibrahim A.S., Edwards J.E. et al. Trombin-induced rabbit platelet microbicidal proteins is fungicidal in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 1993. 37: 546-553.
4. Shailaja V.V., Himabindu V., Anuradha K. et al. In vitro activity of gatifloxacin against gram negative clinical isolates in a tertiary care hospital. Indian J. Med. Microbiol. 22: 222-225.

5. Mosca D.A., Hurst M.A., So W. et al. IB-367, a protegrin peptide with in vitro and in vivo activities against the microflora associated with oral mucositis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. 44: 1803-1808.
6. US Patent 5338724, A 61 K 037/02, 1994.
7. US Patent 6211148, A 61 K 038/16, 2001.
8. US Patent 6008195, C 07 K 007/08, 1999.
9. Yeaman M.R. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin. Infect. Dis.* 1997. 25: 951-968.
10. Krijjveld J.S., Zaat A.J., Meeldijk J. et al. Trombocidines, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *J. Biol Chem.* 2000. 275: 20374-20381.
11. Yeaman M.R., Tang Y.-Q., Shen A.J. et al. Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins. *Infect. Immun.* 1997. 65: 023-1031.
12. Tang Y.-Q., Yeaman M.R., Selsted M.E. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect. Immun.* 2002. 70: 6500-6533.

Поступила 20.03.2015

(*Контактная информация:* **Иванов Юрий Борисович** - кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, e-mail: ubi2010@rambler.ru;

Васильченко Алексей Сергеевич - кандидат биологических наук, научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, e-mail: avasilchenko@gmail.com).