



УДК 615.331, 577.188

# БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ДВУХКОМПОНЕНТНОГО ЛАНТИБИОТИКА ЛИХЕНИЦИДИНА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ

© 2024 г. Д. В. Антошина\*, С. В. Баландин\*, \*\*, А. А. Тагаев\*,  
А. А. Потемкина\*, \*\*, Т. В. Овчинникова\*, \*\*, #

\* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\* Физтех-школа биологической и медицинской физики, Московский физико-технический институт  
(национальный исследовательский университет),  
Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

Поступила в редакцию 10.03.2024 г.

После доработки 21.03.2024 г.

Принята к публикации 22.03.2024 г.

Лантибиотики представляют собой семейство рибосомально синтезируемых бактериальных антимикробных пептидов, которые подвергаются посттрансляционной модификации с образованием остатков лантионина (Lan) и метиллантионина (MeLan). Лантибиотики рассматриваются как перспективные средства для борьбы с антибиотикорезистентными бактериальными инфекциями. В настоящей работе представлен биотехнологический способ получения двух компонентов лантибиотика лихеницидина из *Bacillus licheniformis* B-511 – Lch $\alpha$  и Lch $\beta$ . Разработана система, позволяющая проводить в клетках *Escherichia coli* коэкспрессию генов lchA1 или lchA2, кодирующих предшественники  $\alpha$ - или  $\beta$ -компонентов, соответственно, с генами lchM1 или lchM2 модифицирующих ферментов LchM1 и LchM2. Разработанная система гетерологичной экспрессии и очистки позволила получить с высоким выходом посттрансляционно модифицированный рекомбинантный Lch $\beta$ , полностью идентичный природному пептиду по структуре и биологической активности.

*Ключевые слова:* антибиотики, антимикробные пептиды, бактериоцины, лантибиотики, рекомбинантные пептиды, биотехнология

**DOI:** 10.31857/S0132342324040081, **EDN:** MWYNGK

## ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день поиск и разработка новых антимикробных препаратов выступают критически важными из-за широкого распространения заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными инфекциями. Несмотря на успехи в создании синтетических антибиотиков, большой интерес представляют природные защитные соединения, в частности, антимикробные пептиды

(АМП) и их аналоги. АМП обнаружены в различных природных источниках – от бактерий до млекопитающих – и играют важную роль в регулировании микробных сообществ и иммунной защите многоклеточных организмов, обеспечивая им невосприимчивость к патогенным микроорганизмам.

Бактериоцины – рибосомально синтезируемые АМП [1, 2], продуцируемые многими грамположительными и грамотрицательными бактериями,

Сокращения: АМП – антимикробные пептиды.

# Автор для связи: (эл. почта: ovch@ibch.ru).

а также археями. В настоящее время известно несколько систем классификации бактериоцинов, основанных на различиях в химической структуре, биологической активности и механизмах действия [3]. Небольшие термостабильные бактериоцины молекулярной массой менее 10 кДа подразделяют на два класса. К классу I относят бактериоцины, содержащие посттрансляционные модификации, а к классу II — немодифицируемые пептиды. Среди посттрансляционно модифицируемых бактериоцинов наиболее многочисленное и хорошо исследованное семейство составляют лантибиотики, многие из которых имеют потенциал медицинского применения в качестве эффективных антимикробных средств [4]. Характерной особенностью лантибиотиков является наличие таких нетипичных аминокислотных остатков, как лантионин (Lan, Ala-S-Ala) и метиллантионин (MeLan, Abu-S-Ala), которые образуются в результате циклизации при взаимодействии дегидратированных остатков Ser (2,3-дегидроаланин, Dha) и Thr (2,3-дегидробутирин, Dhb) с остатками Cys с образованием тиоэфирных связей при участии специфических модифицирующих ферментов [1]. В зависимости от структуры и механизма ферментативного катализа при формировании тиоэфирных связей лантипептиды подразделяются на четыре класса, при этом большинство лантипептидов с антибиотической активностью (лантибиотиков) относятся к классам I и II [5]. Лантибиотики класса I и их типичный представитель низин — широко используемый пищевой консервант E234 — претерпевают посттрансляционную модификацию при участии двух различных ферментов: LanB, осуществляющего дегидратацию остатков Ser и Thr, и LanC, катализирующего циклизацию с образованием тиоэфирных связей. Модификацию лантибиотиков класса II осуществляет один бифункциональный фермент — LanM.

Среди лантибиотиков класса II отдельную подгруппу составляют двухкомпонентные лантибиотики [1, 5]. Данные пептиды отличаются тем, что функционируют в виде двух отдельных компонентов ( $\alpha$  и  $\beta$ ), каждый из которых кодируется отдельным геном (*lanA1* и *lanA2*) и модифицируется при участии особого фермента (LanM1 или LanM2). Каждый из компонентов обладает самостоятельной антимикробной активностью, однако антимикробный эффект значительно возрастает при их совместном синер-

гическом действии. На сегодняшний день известно 13 представителей двухкомпонентных лантибиотиков: лактицин 3147 [6], стафилококцин [7], плантарицин W [8], ВНТ [9], Smb [10], лихеницидин [11–14], галодурацин [15], энтероцин W [16], флавецин [17], бицереуцин [18], тузин [19], формицин [20] и розеоцин [21]. Ранее нами был выделен двухкомпонентный лантибиотик лихеницидин из *Bacillus licheniformis* VK21, состоящий из компонентов Lch $\alpha$  и Lch $\beta$  и обладающий активностью в отношении грамположительных бактерий в наномолярном диапазоне концентраций [12]. Нами была установлена структура обоих компонентов лихеницидина [12] и исследован механизм действия Lch $\alpha$  [14]. Строение зрелых компонентов Lch $\alpha$  и Lch $\beta$ , схематичное представление их посттрансляционной модификации, а также структурная организация кластера генов биосинтеза лихеницидина изображены на рис. 1.

Ввиду сложности процесса созревания лантибиотиков и многостадийности внесения посттрансляционных модификаций природными системами биосинтеза получение достаточных количеств полностью модифицированных пептидов даже для их первоначальных структурно-функциональных исследований зачастую становится нетривиальной задачей. Во многих случаях выход зрелых лантибиотиков при очистке из культур природных продуцентов измеряется микрограммами на 1 л культуральной жидкости. Разработка биотехнологических систем для получения рекомбинантных лантибиотиков может позволить решить эту проблему, а также дать в руки исследователей удобный инструмент для дальнейшего изучения этих перспективных антимикробных соединений. Известны системы гетерологичной экспрессии генов лантибиотиков (в первую очередь, принадлежащих к классу I) на основе *Lactococcus lactis* и *Bacillus subtilis*. В ряде работ [22, 23] была показана возможность получения лантибиотиков лихеницидина и галодурацина в гетерологичной системе на основе *E. coli*. Однако, указанная методика получения рекомбинантного лихеницидина включает последовательные стадии экстракции примесей и целевого пептида органическими растворителями, что повышает её трудоемкость и лишает универсальности, необходимой для препаративной наработки и очистки потенциального прототипа фармацевтической субстанции. Настоящая ра-

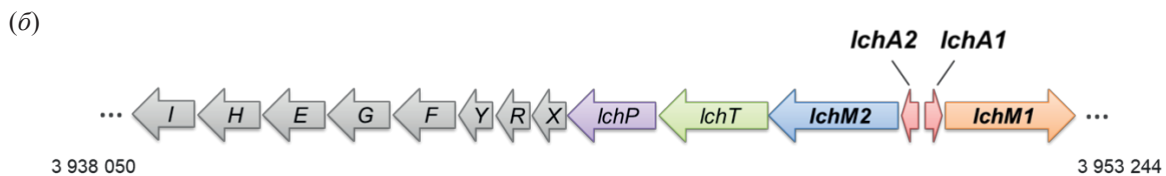
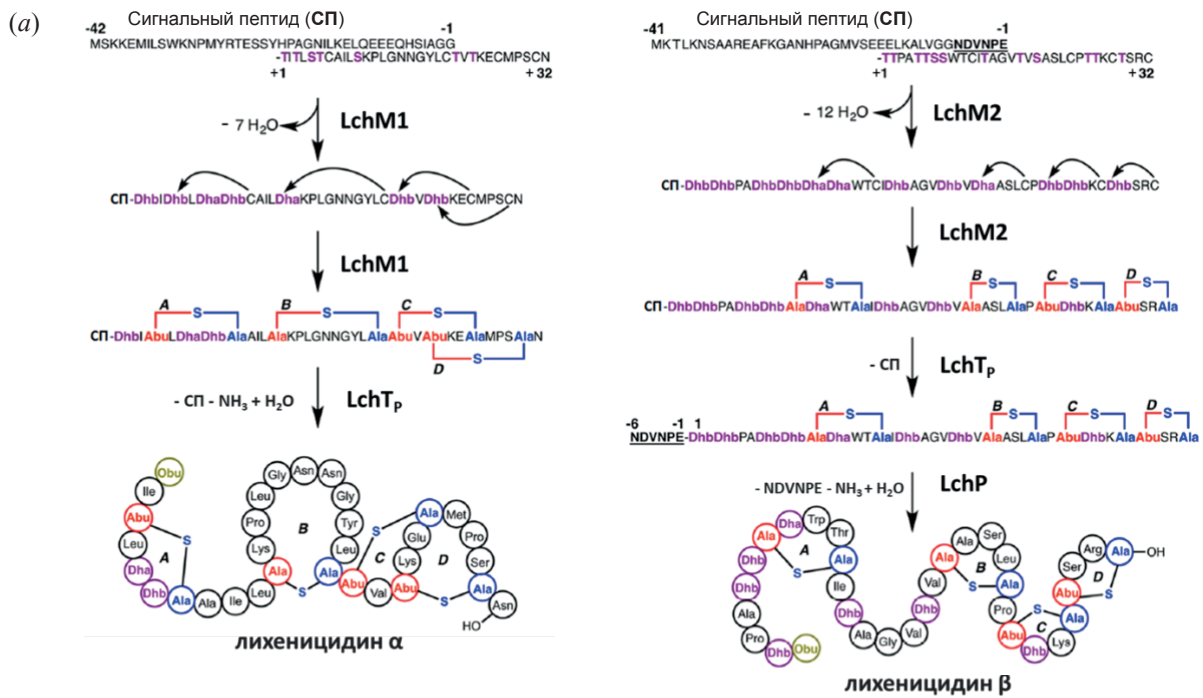


Рис. 1. (а) Схема биосинтеза и модификации компонентов лихеницидина [4]; (б) структурная организация кластера биосинтеза лихеницидина из *B. licheniformis* VK21 [12].

бота посвящена разработке биотехнологического способа получения рекомбинантного двухкомпонентного лантибиотика лихеницидина из *B. licheniformis* В-511 в гетерологичной системе экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Разработка биотехнологического способа получения посттрансляционно модифицированных компонентов лихеницидина

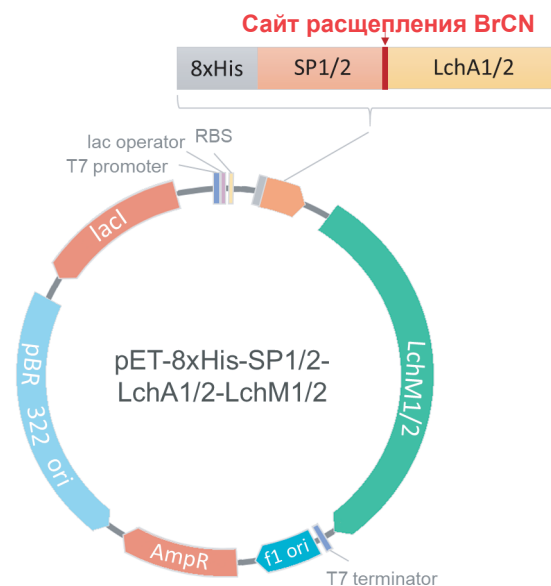
Необходимость разработки способа получения рекомбинантного лихеницидина была обусловлена низкими выходами, которые наблюдались при очистке его компонентов из штаммов *B. licheniformis* VK21 и В-511 (порядка 0.1 мг/л для Lchα и 0,01 мг/л для Lchβ). В ходе данного исследования мы разработали биотехнологическую систему, которая позволяет получать реком-

бинантные посттрансляционно модифицированные компоненты лихеницидина путём гетерологичной экспрессии в штамме *E. coli* BL21(DE3). Для этого нами были спроектированы и получены конструкции на основе плазмид серии pET, в которые были встроены последовательности генов, кодирующих предшественники компонентов лихеницидина (SP1LchA1 и SP2LchA2), включая сигнальные последовательности SP1 и SP2, и гены ферментов для их модификации (LchM1 и LchM2). Синтез полинуклеотидных последовательностей, кодирующих компоненты лихеницидина, проводили методом ПЦР путём амплификации целевых генов на матрице геномной ДНК штамма *B. licheniformis* В-511, идентичного штамму ATCC 14580. Сравнение штаммов *B. licheniformis* VK21 и В-511 показало, что они имеют одинаковые гены *lchA1*, *lchA2* и *lchM2* и неболь-

шие отличия в гене *lchM1*, которые сводятся к заменам в пяти положениях (Val373Ala, Leu707Phe, Ile771Val, Lys818Arg, Leu946Phe). Как нами было установлено, эти замены не оказывают значительного влияния на активность фермента, поскольку указанные мутации локализованы в участках структуры фермента, отдаленных от каталитических центров дегидратации и циклизации. Каждую из полученных нуклеотидных последовательностей встраивали в вектор методом гомологичной рекомбинации *in vivo* в клетках *E. coli* DH10B. Остатки Met в структуре предшественника каждого из пептидов заменяли на Leu, что позволило использовать реакцию с бромцианом для удаления гистидиновой метки и сигнальной части пропептида. Дополнительные модификации обеих нуклеотидных последовательностей (введение мутаций в гены пептидов и ферментов, удаление гена белка-носителя) осуществляли методом сайт-направленного мутагенеза с использованием амплификации полноразмерной плазмиды методом обратной ПЦР с мутагенизирующими праймерами [24]. Дальнейшую рециклизацию осуществляли путём гомологичной рекомбинации. В ходе оптимизации системы экспрессии рекомбинантных компонентов лихеницидина было показано, что присутствие белка-носителя тиоредоксина (TrxL), повышающего растворимость и выход гибридных белков, не препятствует осуществлению модификаций предшественников компонентов лихеницидина ферментами LchM1 и LchM2. Однако, наличие белка-носителя в смеси продуктов реакции с бромцианом затрудняло очистку зрелых компонентов лихеницидина из-за близких значений времени удерживания белков на колонке при проведении обращённо-фазовой ВЭЖХ (офВЭЖХ), вследствие чего было решено отказаться от его использования. Схема экспрессионных плазмид для получения рекомбинантных компонентов лихеницидина представлена на рис. 2.

#### Гетерологичная экспрессия и модификация компонентов лихеницидина в *E. coli*

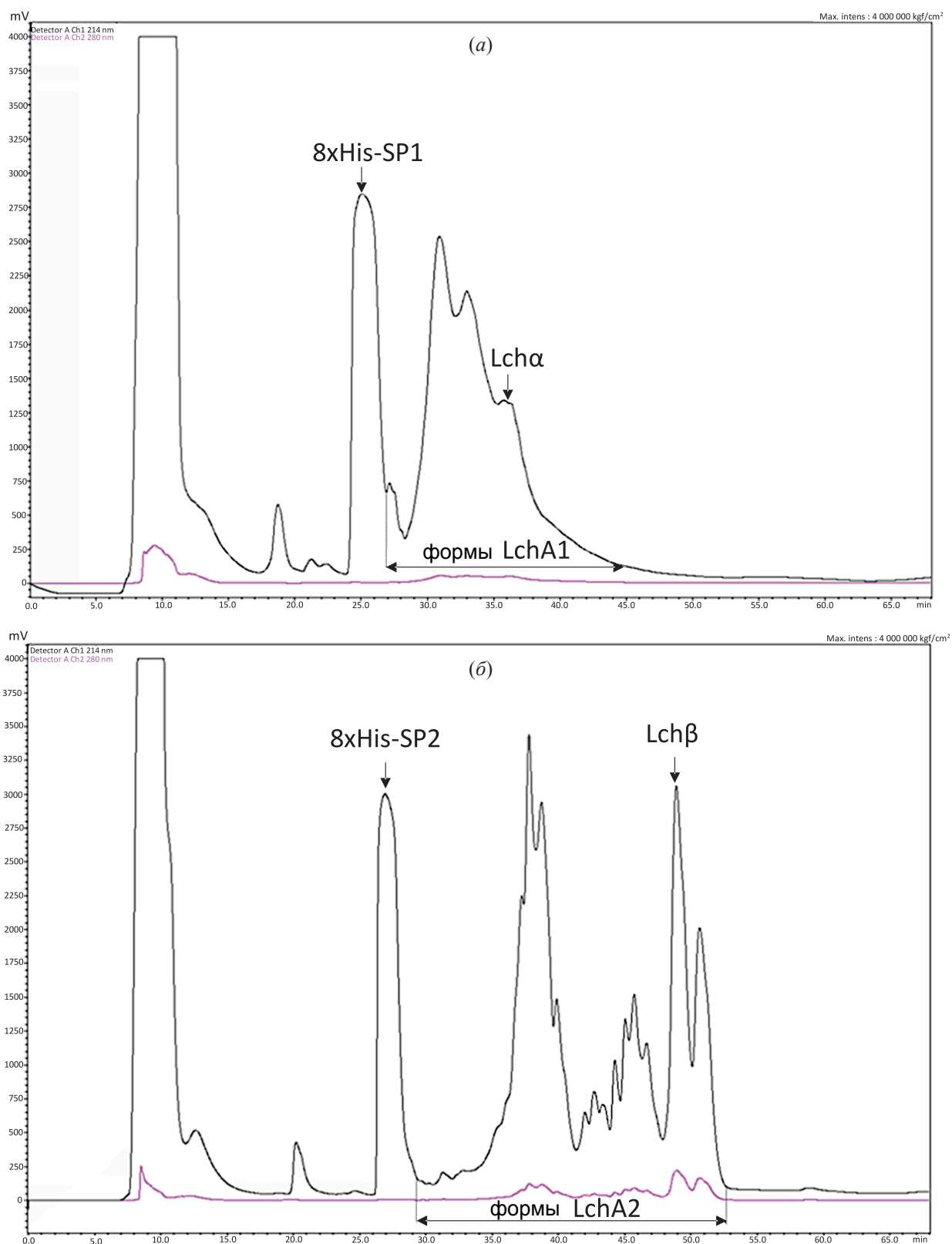
Для получения каждого из пептидов проводили трансформацию Ca<sup>2+</sup>-компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3) соответствующей плазмидой и дальнейшую коэкспрессию каждого из пред-



**Рис. 2.** Схематичное представление экспрессионных плазмид для получения рекомбинантных компонентов лихеницидина.

шественников компонентов лихеницидина и соответствующего ему модифицирующего фермента. При этом биосинтез, модификация и накопление компонентов происходили в цитоплазме клеток *E. coli*. Очистка включала в себя металлохелатную хроматографию в денатурирующих условиях, отщепление олигогистидиновой метки и сигнальной части пропептида с помощью реакции с бромцианом в кислой среде и разделение продуктов реакции с помощью офВЭЖХ. Важно отметить, что в ходе совместной экспрессии предшественника пептида с ферментом его модификации синтезировался набор модифицированных форм с разной степенью зрелости (с различным числом фосфорилированных и дегидратированных остатков и тиоэфирных связей), имеющих различные времена удерживания на колонке при разделении методом офВЭЖХ. Хроматограммы очистки рекомбинантных компонентов Lch $\alpha$  и Lch $\beta$ , а также масс-спектрометрический анализ фракций, предположительно содержащих целевые зрелые пептиды, представлены на рис. 3 и 4.

Как видно из хроматограммы и масс-спектра фракции, содержащей Lch $\alpha$ , в ходе коэкспрессии значительная часть пептида оставалась в немо-



**Рис. 3.** Хроматограммы очистки полученных рекомбинантных компонентов лихеницидина с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ. (а) – Lch $\alpha$  и другие незрелые формы LchA1, (б) – Lch $\beta$  и другие незрелые формы LchA2.

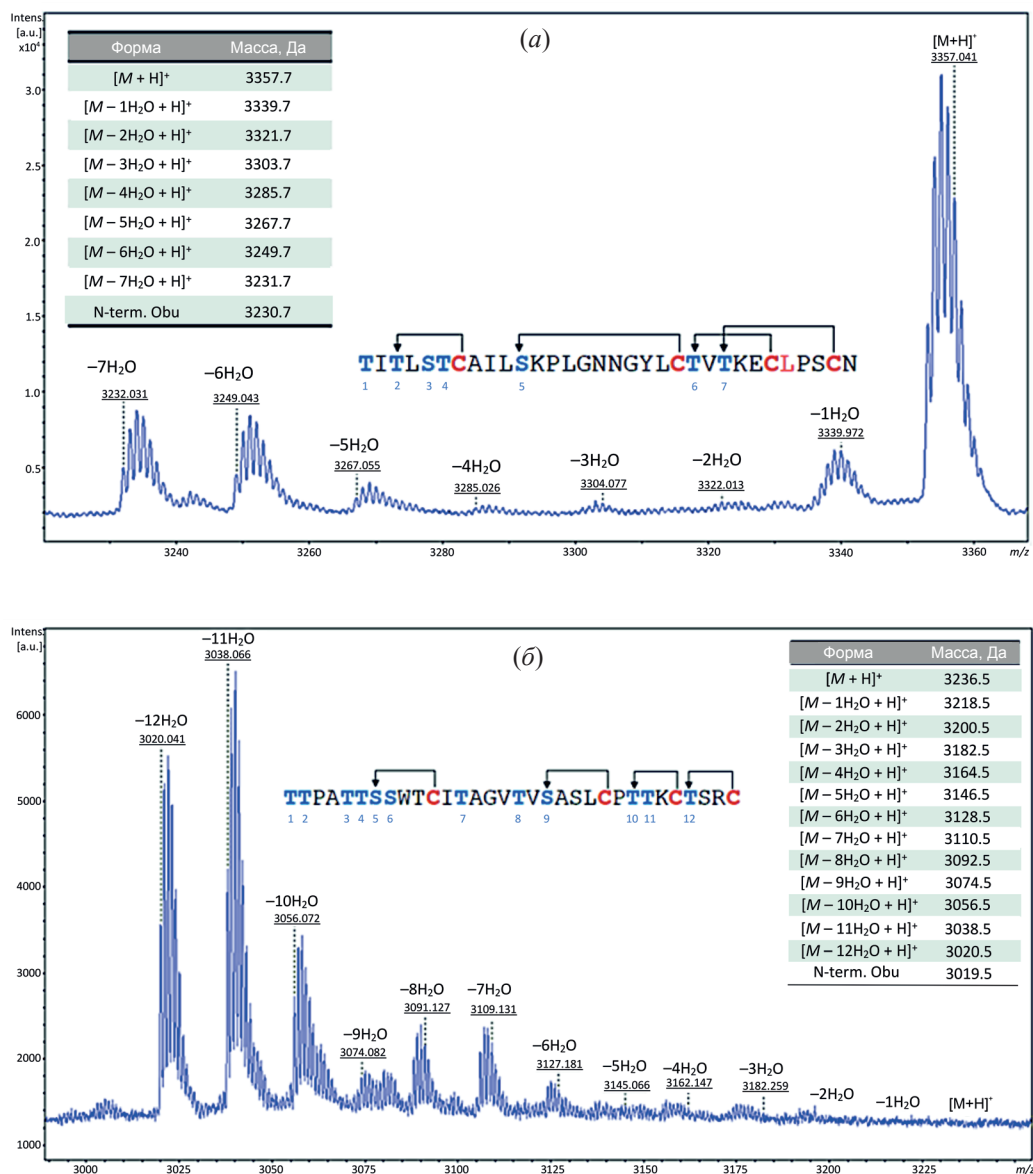


Рис. 4. МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ полученных рекомбинантных компонентов лишеницидина. (а) – LchA1, (б) – LchA2. (а) – Lch $\alpha$  и другие незрелые формы LchA1; (б) – Lch $\beta$  и другие незрелые формы LchA2.

дифицированной форме. Лишь небольшая фракция имела в своей структуре все семь необходимых дегидратаций. Исходя из предположения, что низкая модифицирующая активность фермента LchM1 могла быть связана с низкой стабильностью его мРНК, мы повторили эксперимент с использованием штамма *E. coli* BL21 Star (DE3), мутантного по гену РНКазы E. При этом уровень экспрессии гена *lchM1* значительно повысился, что привело к возрастанию суммарной доли полностью дегидратированной ( $-7\text{H}_2\text{O}$ ) и предшествующей ей

( $-6\text{H}_2\text{O}$ ) форм Lch $\alpha$ . Тем не менее, оставшаяся часть пептида все ещё была представлена преимущественно недегидратированной формой. Варьирование условий коэкспрессии генов *lchA1* и *lchM1* (введение осмолитов в состав питательной среды, снижение температуры инкубации до  $16^\circ\text{C}$ , использование аутоиндукции лактозой, изменение продолжительности культивирования) также не привело к повышению выхода зрелой формы пептида Lch $\alpha$ .

Напротив, рекомбинантный компонент Lch $\beta$  был получен нами в аналогичной системе экспрессии с высоким выходом, составившим около 4 мг с 1 л культуры. На стадии оФВЭЖХ был получен ряд пиков (рис. 4б), среди которых с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии удалось выявить фракцию, содержащую пептид с молекулярной массой, соответствующей природному  $\beta$ -компоненту лихеницидина ( $M_{расч} \sim 3019.5$  Да). Идентичность структуры полученного рекомбинантного Lch $\beta$  с природным была подтверждена с помощью ЯМР-спектроскопии (данные не приведены). Таким образом, ферментативная активность LchM2 в полученной системе обеспечивает эффективное отщепление 12 молекул воды от предшественника пептида и образование четырех внутримолекулярных тиоэфирных связей.

Получение природных  $\alpha$ - и  $\beta$ -компонентов лихеницидина из *B. licheniformis* В-511 проводили по ранее описанной нами методике [12]. Хроматограмма очистки пептидов с помощью оФВЭЖХ и МАЛДИ масс-спектрометрический анализ полученных фракций пептидов представлены на рис. 5.

Дополнительным подтверждением идентичности рекомбинантных компонентов природному лихеницидину стали результаты тестирования их антимикробной активности. Из-за малого количества получаемой зрелой формы Lch $\alpha$ , ее активность была протестирована только в отношении штамма *Listeria monocytogenes* EGD методом диффузии в твёрдую агаризованную среду, в результате чего была обнаружена зона ингибирования, свидетельствующая о наличии антимикробных свойств. Полученная зрелая форма рекомбинантного Lch $\beta$  проявила антимикробную активность в аналогичном тесте только в отношении штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и не была активной в отношении других тестируемых штаммов бактерий. Однако в тестах методом серийных разведений в жидкой среде рекомбинантный Lch $\beta$  показал активность в отношении других штаммов бактерий (табл. 1). Кроме того, рекомбинантный Lch $\beta$  продемонстрировал синергизм при совместном действии с природным  $\alpha$ -компонентом лихеницидина в отношении *L. monocytogenes* EGD (рис. 6) по результатам тестирования в твёрдой агаризованной и в жидкой среде (табл. 1).

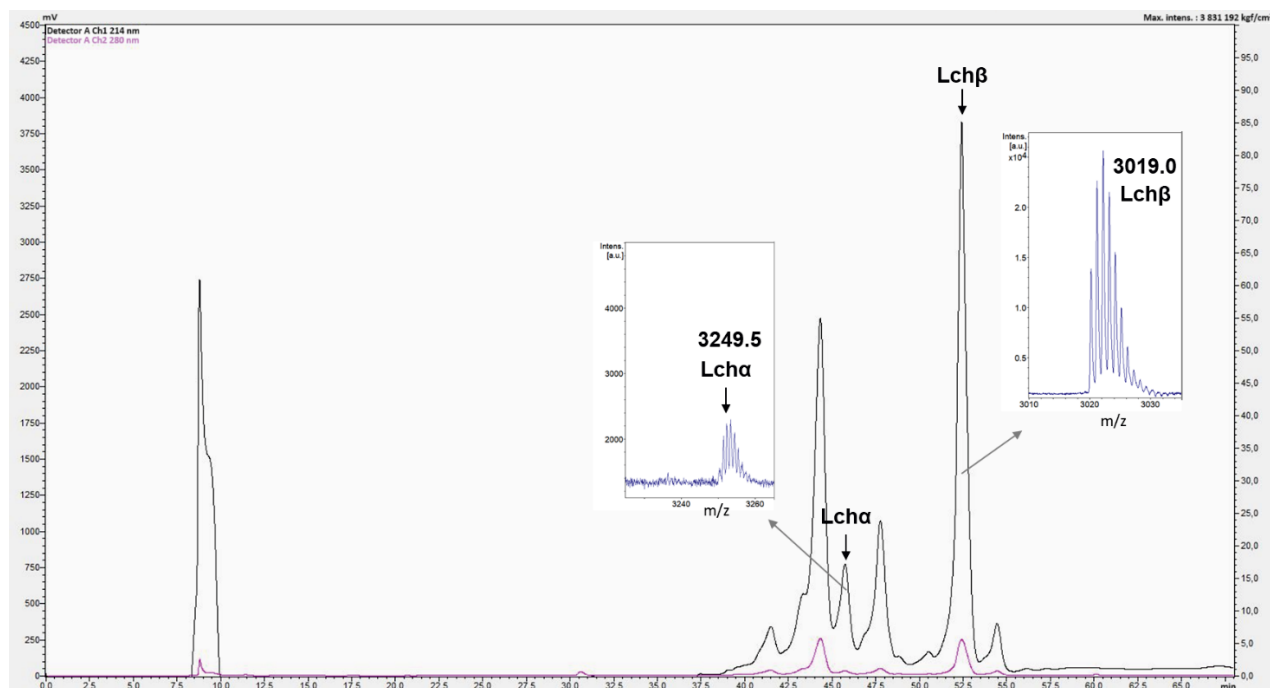
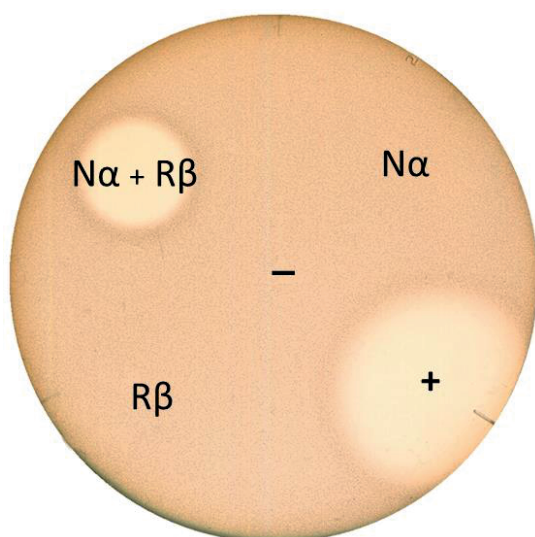


Рис. 5. Хроматограмма очистки природного лихеницидина с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ и МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ выделенных природных компонентов лихеницидина.

**Таблица 1.** Антимикробная активность полученных компонентов лихеницидина в отношении чувствительных тест-штаммов бактерий

Тестируемый штамм	МИК, мкМ					
	Rβ	Nβ	Na	Na + Nβ	Na + Rβ	Низин
<i>Micrococcus luteus</i> Ac-2229	> 128	> 32	4	0.125 + 0.125	0.25 + 0.25	0.0156
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	> 128	> 32	>16	2 + 2	2 + 2	0.0625
<i>Bacillus subtilis</i> B-886	32	32	32	1 + 1	2 + 2	0.0313
<i>Mycobacterium phlei</i> Ac-1221	32	32	16	4 + 4	4 + 4	0.25

\* Na – природный Lch $\alpha$ ; N $\beta$  – природный Lch $\beta$ ; R $\beta$  – рекомбинантный Lch $\beta$ ; МИК – минимальная ингибирующая концентрация.



**Рис. 6.** Синергическое действие эквимольной смеси природного Lch $\alpha$  (Na) и рекомбинантного Lch $\beta$  (R $\beta$ ) в отношении *L. monocytogenes* EGD (суммарная концентрация смеси пептидов – 1.0 мкг; концентрация Na или R $\beta$  – 1.0 мкг; (+) контроль – тетрациклин в концентрации 1.0 мкг; (–) контроль – 5% ацетонитрил, 0.1% трифторуксусная кислота.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Получение плазмидных конструкций.** Для получения нуклеотидных последовательностей, кодирующих предшественники компонентов лантибиотика лихеницидина LchA1 и LchA2 и модифицирующие их ферменты LchM1 и LchM2, соответственно, проводили амплификацию их генов на матрице геномной ДНК природного продуцента *B. licheniformis* B-511 (GeneBank:

AAU25566.1, AFR74837.1, ADM36019.1, AAU42939.1) с помощью ПЦР. Синтезированные нуклеотидные последовательности встраивали в вектор pET-8xHis-TrxL из коллекции УНЦ ИБХ РАН методом гомологичной рекомбинации *in vivo* [24] в клетках *E. coli* DH10B. В случае *lchA1* с помощью ПЦР синтезировали мутантный ген, кодирующий предшественник  $\alpha$ -компонента лихеницидина LchA1 с заменой остатков M5L и M13L в сигнальной части, а также M28L в модифицируемой части пептида. Использованные в работе последовательности олигонуклеотидных праймеров приведены в табл. 2. Правильность сборки полученных плазмидных конструкций оценивали с помощью секвенирования по Сэнгеру (ЗАО «Евроген»). Для повышения достоверности полученных данных каждый клонированный фрагмент секвенировали дважды в противоположных направлениях.

**Получение рекомбинантных компонентов лихеницидина.** Штаммы-продуценты рекомбинантных компонентов лихеницидина получали путем трансформации Ca<sup>2+</sup>-компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3) плазмидой, кодирующей октагистидин-меченый препропептид и фермент его модификации. Трансформированные клетки выращивали в течение 16 ч при 37°C в 10 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 20 мМ глюкозы и вносили в 1.0 л среды LB для экспрессии, содержащей 20 мМ глюкозы, 1 мМ MgSO<sub>4</sub> и 100 мкг/мл ампициллина. Культивирование осуществляли в термостатируемом шейкере при



**Таблица 2.** Последовательности олигонуклеотидных праймеров для ПЦР

№	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Назначение
1	ACGGATCCTCAAAAAAGGAACTGATTCTTTCATGGAAAAATCC TCTGTATCGCACTGAATCTTCT	Получение ампликона SP1LchA1_M13L-LchM1
2	TTCSTTTTTTGAGGATCCGTGATG	
3	ACGGATCCTCAAAAAAGGAACTGATT CTTTCATGGAAAAATCCTCTGTATCGC ACTGAATCTTCT	
4	CAGTTCSTTTTTTGAGGATCCGTGAT	
5	CCTCGACGCTAACCTGGCCGGATCCCATCA CCACCACCATCACGGAAAAACACTGAAAAATTC	Получение ампликона SP2LchA2-LchM2
6	ACGGAAAAACACTGAAAAATTCAGCTGCCCGTG AAGCCTTCAAAGGAGCCAATCATCCGG	
7	AGGAGCCAATCATCCGGCAGGGCTGGTTTCCGA AGAGGAATTGAAAGCTTTGGTAGGAGG	
8	TTGAAAGCTTTGGTAGGAGGAAATGACGTCAAT CCTGAAATGACAACCTCTGCTACAACC	
9	GTGGTGGTGGTGTCTCGAGAGAATTCTCACCTGCCCGTC	

37°C, 220 об/мин в течение 2–3 ч до плотности 0.8–1.0 OD<sub>600</sub>/мл, после чего добавляли индуктор изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0.2 мМ. Продолжали инкубацию клеточной культуры при температуре 30°C, 220 об/мин в течение 3–4 ч. Клеточную массу осаждали центрифугированием при скорости 4000 об/мин и температуре 4°C в течение 10 мин. Полученный клеточный осадок замораживали и хранили при температуре минус 20°C.

**Выделение и очистка рекомбинантных компонентов лихеницидина. Металлохелатная хроматография.** Клеточный осадок гомогенизировали с помощью ручного стеклянного гомогенизатора до однородной суспензии в буфере А для металлохелатной хроматографии (6 М гуанидина гидрохлорид, 100 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 мМ имидазол, рН 7.8), добавляя 9 мл буфера на 1 г осадка. Далее проводили ультразвуковой лизис полученной клеточной суспензии на льду в циклическом режиме (400 Дж на 1 мл суспензии). Центрифугировали лизат при скорости 17000 об/мин (30000 g) и температуре 4°C в течение 30 мин.

Гибридные белки, содержащие модифицированные предшественники пептидов Lch $\alpha$  и Lch $\beta$ , N-концевую октагистидиновую метку (8xHis) и сигнальный пептид (SP1 или SP2), очищали в денатурирующих условиях с помощью Ni<sup>2+</sup>-металлохелатной аффинной хроматографии на колонке (d = 1 см, h = 8 см), содержащей сорбент Ni-сефарозу 6 Fast Flow (GE Healthcare, США). Очистку проводили при нормальном давлении и скорости потока буферных растворов 1 мл/мин. Элюцию пептидов проводили с помощью буфера В для металлохелатной хроматографии (6 М гуанидина гидрохлорид, 100 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 мМ имидазол, рН 7.8). Время выхода гибридного белка детектировали по изменению оптического поглощения при длине волны 280 нм.

**Отщепление вспомогательных аминокислотных последовательностей.** Расщепление гибридного белка по остатку метионина, введенному между сигнальной последовательностью и зрелым пептидом, осуществляли с помощью реакции с бромцианом в кислой среде. К 1 мл элюата в буфере В для металлохелатной хроматографии до-

бавляли 50 мкл 50% раствора бромциана, достигая приблизительно 100-кратного молярного избытка по отношению к остаткам метионина в составе белка, и 54 мкл концентрированной HCl (до расчетного значения pH ~ 1.0). Смесь инкубировали в темноте в течение 16–20 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением двукратного объема воды. Образец упаривали до исходного объема на вакуумном концентраторе SpeedVac в течение 3 ч для удаления избытка бромциана и HCl. Полученные образцы титровали 4 M NaOH до значения pH 4.0.

**Обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (офВЭЖХ).** Финальную очистку рекомбинантных пептидов проводили с помощью офВЭЖХ на колонке Reprosil-Pur C18-AQ ( $d = 5$  мкм,  $250 \times 10$  мм) в системе буферов A1 (5% ацетонитрил, 0.1% трифторуксусная кислота) и B1 (80% ацетонитрил, 0.1% трифторуксусная кислота). Разделение смеси продуктов проводили при скорости потока 2 мл/мин в градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 80% буфера B1. Время выхода пептида детектировали по изменению оптического поглощения элюата при 214 и 280 нм. Собранные фракции элюата, соответствующие пикам целевых пептидов на хроматограмме, собирали и упаривали досуха на вакуумном концентраторе SpeedVac. При необходимости проводили повторную очистку с помощью офВЭЖХ на отдельной колонке Reprosil-Pur C18-AQ в тех же условиях.

Уровень экспрессии гибридных белков и ферментов LchM1 и LchM2, степень расщепления бромцианом и качество хроматографической очистки контролировали с помощью белкового электрофореза в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле.

**Получение и выделение природного лихеницидина.** Получение и очистку лихеницидина из природного продуцента *B. licheniformis* B-511 и его дальнейшую очистку проводили по ранее описанной нами методике [12].

Культуру клеток *B. licheniformis* B-511 выращивали на чашке с LB-агаром при 37°C в течении 18 ч, затем клетки переносили в 50-миллилитровую пробирку с 10 мл минимальной среды M9 (4.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.85 mM NaCl, 1.87 mM

NH<sub>4</sub>Cl) и проводили культивирование в течение 18 ч на роторной качалке при 37°C и скорости вращения 220 об/мин. Препаративное культивирование проводили в двухлитровых колбах. В каждую колбу добавляли по 160 мл минимальной среды M9 и по 1–2 мл ночной культуры клеток. Проводили культивирование в течение 18 ч на роторной качалке при 37°C и скорости вращения 220 об/мин. Состав ростовой среды M9 с добавками: (4.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.85 mM NaCl, 1.87 mM NH<sub>4</sub>Cl), 20 mM глюкоза, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.001% тиамин, 10 мкМ FeCl<sub>3</sub>, 0.00004% среда «2-3-1» (2% триптон, 3% дрожжевой экстракт, 1% NaCl).

По окончании культивирования клетки отделяли центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин. К 1 л супернатанта добавляли 400 мл *n*-бутанола и проводили однократную экстракцию в течение 16 ч. Водную фазу удаляли с помощью делительной воронки, а полученный экстракт упаривали досуха на роторном испарителе. Перерастворяли образец в 50 мл буфера A2 (30 mM ацетат аммония, pH 5.6, 30% ацетонитрил) и наносили на колонку с носителем Диасорб-100-C8 ( $2.5 \times 10$  см), уравновешенную буфером A2, при скорости потока 2 мл/мин. Элюцию проводили 50 мл буфера B2 (30 mM ацетат аммония, pH 5.6, 80% ацетонитрил) при скорости потока 2 мл/мин. Полученный элюат упаривали на роторном испарителе досуха и перерастворяли в 3 мл 50% метанола. Финальную очистку компонентов природного лихеницидина проводили с помощью офВЭЖХ, как было описано выше для рекомбинантного пептида.

**Анализ структуры полученных пептидов. МАЛДИ-масс-спектрометрия.** Масс-спектрометрический анализ полученных пептидов проводили на МАЛДИ-времяпролетном масс-спектрометре Reflex III (Bruker Daltonics, Германия), оснащённом УФ-лазером с рабочей длиной волны 337 нм. В качестве матрицы использовали 10 мг/мл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в 20% ацетонитриле, содержащем 0.1% ТФУ.

**ЯМР-спектроскопия.** Сопоставление структуры рекомбинантного и природного β-компонентов лихеницидина проводилось в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН. Спектры ЯМР измеряли на спектрометрах AVANCE-III 600 и AVANCE-III 800, ос-

нащенных криогенно охлаждаемыми зондами (Bruker, Германия). Отнесение сигналов  $^1\text{H}$  было получено по стандартной методике с использованием 2D-спектров  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY и  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY.

#### Тестирование антимикробной активности.

Первичный скрининг антимикробной активности компонентов лихеницидина и их эквимольной смеси осуществляли методом диффузии в твердую агаризованную среду, содержащую тестовый штамм бактерий. Тест-культуру бактерий выращивали в 10 мл жидкой питательной среды при  $37^\circ\text{C}$  до достижения оптической плотности  $\text{OD}_{600} \sim 1.0$ . Аликвоту полученной культуры добавляли к 10 мл расплавленного и охлажденного до  $40^\circ\text{C}$  агара в той же питательной среде до расчётного значения  $\text{OD}_{600} 0.001$  (приблизительно  $2 \times 10^5$  КОЕ/мл). Приготовленные растворы заливали в чашки Петри. На поверхность застывшего агара наносили от 0.5 до 10 мкг тестируемых веществ. В качестве положительного контроля использовали антибиотики ампициллин или тетрациклин. Чашки инкубировали в термостате в течение 24 ч при  $37^\circ\text{C}$ .

Антимикробную активность пептидов также определяли методом двойных серийных разведений в жидкой питательной среде. Тестирование проводили в стерильных 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах (Eppendorf, Германия) в среде Мюллера-Хинтон (МН) (Sigma-Aldrich, США). Тест-культуры выращивали в жидкой питательной среде LB или МН при  $37^\circ\text{C}$  до достижения оптической плотности  $\text{OD}_{600} \sim 1.0$ , после чего разбавляли двухкратной средой МН до конечной концентрацией клеток  $10^6$  КОЕ/мл. Двойные серийные разведения исследуемых растворов компонентов лихеницидина проводили в лунках планшета в объёме 50 мкл в 0.1% стерильном растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) для предотвращения нежелательной сорбции пептидов. После этого в лунки вносили по 50 мкл приготовленных растворов бактериальных тест-культур и инкубировали планшет в течение 24 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$  и перемешивании со скоростью 950 об/мин. Значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) определяли как минимальную концентрацию пептида, при которой не наблюдалось видимого роста бактериальной культуры. Бактериальный рост оцени-

вали визуально. При необходимости дополнительно добавляли в лунки по 20 мкг/мл хромогенного субстрата резазурина (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали планшет в течение 2 ч при  $37^\circ\text{C}$  и перемешивании со скоростью 950 об/мин. Эксперименты по определению МИК проводили в трехкратной повторности.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка способов биотехнологического получения лантибиотиков является необходимым условием для проведения всесторонних исследований этих антимикробных соединений как перспективных прототипов новых лекарственных средств. Создание гетерологичных суперпродуктов на основе микроорганизмов, в которых гены лантибиотиков экспрессируются в контролируемых условиях, облегчает исследование механизмов их биосинтеза и секреции, а также изучение субстратной специфичности модифицирующих ферментов. В дальнейшем это позволит расширить область применения данных природных биосинтетических систем. Разработанный нами биотехнологический способ получения рекомбинантных компонентов лантибиотика лихеницидина одновременно демонстрирует возможности, которые открывает данный подход, и трудности на пути его реализации, которые могут быть связаны с особенностями конкретных ферментов или их субстратов. Достигнутые выходы рекомбинантного пептида Lch $\beta$  позволяют предположить, что модифицирующий фермент LchM2 может быть использован для модификации альтернативных субстратов и для получения других лантипептидов класса II в бактериальных системах экспрессии.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-14-00380 (<https://rscf.ru/project/22-14-00380/>).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Антошина Д.В. и Баландин С.В. собрали и проанализировали литературные и экспериментальные данные, а также подготовили начальную версию рукописи. Антошина Д.В., Баландин С.В., Тагаев А.А., Потемкина А.А. принимали участие в проведении экспериментов. Овчинникова Т.В. сформулировала концепцию, обеспечила координацию и финансирование работ, провела анализ экспериментальных данных, осуществила редактирование и подготовку рукописи к публикации.

Окончательный вариант рукописи был утвержден всеми авторами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Drider D., Rebuffat S.* Prokaryotic Antimicrobial Peptides. From Genes to Applications / Springer. 2011. P. 1–451.
2. *Antoshina D.V., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V.* // Biochemistry (Moscow). 2022. V. 87. P. 1387–1403. <https://doi.org/10.1134/S0006297922110165>
3. *Zimina M., Babich O., Prosekov A., Sukhikh S., Ivanova S., Shevchenko M., Noskova S.* // Antibiotics (Basel). 2020. V. 9. P. 553–574. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090553>
4. *Field D., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.* // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01363>
5. *Repka L.M., Chekan J.R., Nair S.K., van der Donk W.A.* // Chem. Rev. 2017. V. 11. P. 5457–5520. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00591>
6. *Ryan M.P., Rea M.C., Hill C., Ross R.P.* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 612–619. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.612-619.1996>
7. *Navaratna M.A., Sahl H.G., Tagg J.R.* // Infect. Immun. 1999. V. 67. P. 4268–4271. <https://doi.org/10.1128/iai.67.8.4268-4271.1999>
8. *Holo H., Jeknic Z., Daeschel M., Stevanovic S., Nes I.F.* // Microbiology (Reading). 2001. V. 147. P. 643–651. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-3-643>
9. *Hyink O., Balakrishnan M., Tagg J.R.* // FEMS Microbiol. Lett. 2005. V. 252. P. 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.003>
10. *Yonezawa H., Kuramitsu H.K.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. V. 49. P. 541–548. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.541-548.2005>
11. *Begley M., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.* // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 5451–5460. <https://doi.org/10.1128/aem.00730-09>
12. *Shenkarev Z.O., Finkina E.I., Nurmukhamedova E.K., Balandin S.V., Mineev K.S., Nadezhdin K.D., Yakimenko Z.A., Tagaev A.A., Temirov Y.V., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V.* // Biochem. 2010. V. 49. P. 6462–6472. <https://doi.org/10.1021/bi100871b>
13. *Barbosa J.C., Gonçalves S., Makowski M., Silva Í.C., Caetano T., Schneider T., Mösker E., Süßmuth R.D., Santos N.C., Mendo S.* // Coll. Surf. B Biointerfaces. 2022. V. 211. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112308>
14. *Panina I.S., Balandin S.V., Tsarev A.V., Chugunov A.O., Tagaev A.A., Finkina E.I., Antoshina D.V., Sheremeteva E.V., Paramonov A.S., Rickmeyer J., Bierbaum G., Efremov R.G., Shenkarev Z.O., Ovchinnikova T.V.* // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 1332. <https://doi.org/10.3390/ijms24021332>
15. *McClerren A.L., Cooper L.E., Quan C., Thomas P.M., Kelleher N.L., van der Donk W.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2006. V. 103. P. 17243–17248. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606088103>
16. *Sawa N., Wilaipun P., Kinoshita S., Zendo T., Leela-watcharamas V., Nakayama J., Sonomoto K.* // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 900–903. <https://doi.org/10.1128/aem.06497-11>
17. *Zhao X., van der Donk W.A.* // Cell Chem. Biol. 2016. V. 23. P. 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.11.014>
18. *Huo L., van der Donk W.A.* // J. Am. Chem. Soc. 2016. V. 138. P. 5254–5257. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b02513>
19. *Xin B., Zheng J., Liu H., Li J., Ruan L., Peng D., Sajid M., Sun M.* // Front Microbiol. 2016. V. 7. P. 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01115>
20. *Collins F.W.J., O'Connor P.M., O'Sullivan O., Rea M.C., Hill C., Ross R.P.* // Microbiology (Reading). 2016. V. 162. P. 1662–1671. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000340>
21. *Singh M., Chaudhary S., Sareen D.* // Mol. Microbiol. 2020. V. 113. P. 326–337. <https://doi.org/10.1111/mmi.14419>
22. *Caetano T., Krawczyk J.M., Mösker E., Süßmuth R.D., Mendo S.* // Chem. Biol. 2011. V. 18. P. 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.11.010>
23. *Caetano T., Barbosa J., Mösker E., Süßmuth R.D., Mendo S.* // Res Microbiol. 2014. V. 165. P. 600–604. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.006>
24. *Jones D.H., Howard B.H.* // BioTechniques. 1991. V. 10. P. 62–66.

# Biotechnological Production of the Recombinant Two-Component Lantibiotic Lichenicidin in the Bacterial Expression System

D. V. Antoshina\*, S. V. Balandin\*, \*\*, A. A. Tagaev\*,  
A. A. Potemkina\*, \*\*, and T. V. Ovchinnikova\*, \*\*, #

# Phone: +7 (495) 336-44-44; e-mail: ovch@ibch.ru

\* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\* Phystech School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology  
(National Research University),  
Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141700 Russia

Lantibiotics are a family of bacterial antimicrobial peptides synthesized by ribosomes that undergo post-translational modification to form lanthionine (Lan) and methyllanthionine (MeLan) residues. Lantibiotics are considered promising agents for combating antibiotic-resistant bacterial infections. This paper presents a biotechnological method for obtaining two components of the lantibiotic lichenicidin from *Bacillus licheniformis* B-511 – Lch $\alpha$  and Lch $\beta$ . A system has been developed that allows co-expression of the lchA1 or lchA2 genes, encoding the precursors of the  $\alpha$ - or  $\beta$ -components, respectively, with the lchM1 or lchM2 genes of the modifying enzymes LchM1 and LchM2 in *Escherichia coli* cells. The developed system of heterologous expression and purification made it possible to obtain, with high yield, post-translationally modified recombinant Lch $\beta$ , completely identical to the natural peptide in structure and biological activity.

*Keywords:* antibiotics, antimicrobial peptides, bacteriocins, lantibiotics, recombinant peptides, biotechnology