

МОДИФИКАЦИЯ ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА ДЛЯ СИНТЕЗА АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

Глухова К.А., Кляшторный В.Г., Мельник Б.С.

Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пушкино, 142290, РФ; e-mail: gkseniya@gmail.com

Поступила в редакцию: 22.06.2018

Аннотация. В настоящее время антимикробные пептиды являются конкурентоспособной альтернативой классическим антибиотикам. Их широкое использование ограничивается рядом проблем, связанных с наработкой токсичных пептидов в клетках *E. coli* и их доставкой в целевой сайт в организме. В данной работе проверена идея, которая помогла бы решить эти проблемы. Мы предположили, что зеленый флуоресцентный белок можно использовать как контейнер для «хранения» антибактериального пептида. Изначально, внутри бочонка зеленого флуоресцентного белка «спрятана» альфа-спираль, на которой образуется хромофор. В самой альфа-спирали есть гидрофильные аминокислоты, рядом, в середине бочонка, множество молекул связанной воды. Поэтому, мы предположили, что центральная альфа-спираль зеленого флуоресцентного белка может быть заменена на альфа-спиральный антибактериальный пептид. Реализация такой идеи достаточно сложна и на первом этапе возникают несколько вопросов, без ответа на которые невозможна дальнейшая работа в намеченном направлении. Будет ли зеленый флуоресцентный белок с замененной альфа-спиралью сворачиваться? Возможно ли при этом образование хромофора? Токсична ли такая конструкция для клетки? В данной работе была выполнена модификация зеленого флуоресцентного белка. Центральная альфа-спираль была заменена на последовательность антимикробного пептида бактенецина. Результаты наших экспериментов показывают, что такой химерный (мутантный) белок компактен, растворим, не токсичен для клетки. Однако он сильно дестабилизирован, вероятно, поэтому не образуется хромофор. Полученные результаты показывают, что идея об использовании зеленого флуоресцентного белка как «контейнера» для небольших пептидов вполне может быть реализована.

Ключевые слова: *зеленый флуоресцентный белок, антимикробные пептиды, бактенецин, молекулярная динамика.*

Антимикробные пептиды (АМП) представляют амфипатические молекулы, состоящие в основном из положительно заряженных и гидрофобных аминокислот. АМП взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфолипидами плазматической мембраны бактерий и формируют поры в мембране, что приводит к потере мембранного потенциала и в итоге к гибели клетки. Действие пептидов направленно на широкий ряд патогенов, таких, как бактерии, грибы, вирусы [1]. Исследование и внедрение АМП в терапевтическую практику ограничиваются рядом проблем, связанных с их производством и применением. Так, антибактериальная активность затрудняет их продукцию в бактериальной культуре. Альтернативные способы получения (эукариотические продуценты, химический синтез или очистка из природных источников) значительно повышают затраты на производство. Современные подходы основаны на снижении токсичности АМП за счет синтеза в неактивной форме. Для этого пептиды нарабатывают в бактериальной культуре в виде химерных белков, где вспомогательный белок или пептид (тиоредоксин, SUMO, PurF и др.) нейтрализуют действие АМП [2].

Другая проблема связана с быстрой деградацией пептидов после введения в организм. Для решения этой проблемы предложены варианты защиты пептидов от протеолиза путем инкапсуляции в липосомах или полимерных частицах [3].

Оптимальным решением обеих проблем может быть применение носителя для АМП, устойчивого к действию протеаз и способного полностью изолировать пептид от окружающей среды во время синтеза и доставки пептида в целевой сайт организма. С этой точки зрения, зеленый флуоресцентный белок GFP представляется одним из наиболее перспективных объектов. GFP состоит из 238 аминокислот, свернутых в серию 6 альфа-спиралей и 11 бета-слоев, соединенных петлями. Антипараллельные бета-слои образуют цилиндр, внутри которого располагается альфа-спираль с хромофором. Считается, что бочонок из бета-слоев служит защитой для хромофора от ингибиторов и протеаз [4]. Известно, что GFP устойчив к действию протеаз [5]. Несмотря на плотную упаковку, внутри белка есть свободное пространство, в котором обнаруживаются молекулы воды [6]. Также, внутри GFP могут задерживаться ионы солей [7]. Микроокружение хромофора богато заряженными остатками и некоторые из них ответственны за удержание ионов внутри «бочонка».

Особенности структуры GFP позволили нам предположить, что центральную альфа-спираль этого белка можно попытаться заменить на альфа-спиральный чужеродный пептид. Ранее Kent и соавт. уже была сделана попытка заменить центральную альфа-спираль GFP похожей спиралью другого GFP-подобного белка. В результате авторам удалось «переставить» спирали разных белков. При этом белки оставались структурированными, и наблюдалась флуоресценция созревших хромофоров [8]. Данные результаты подтверждают наше предположение.

Для замены альфа-спирали мы выбрали пептид бактенецин. Он относится к группе антимикробных пептидов, синтезируется нейтрофилами и активен против грамотрицательных бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* [9]. Выбор основывался на длине и расположении гидрофильных и гидрофобных аминокислот в аминокислотной последовательности бактенецина.

Создание полноценной системы синтеза и доставки антимикробных пептидов, пригодной для практического использования, является трудоемкой, многостадийной задачей. Целью данной работы была проверка возможности создания такой системы на основе GFP, где синтезированный токсичный пептид изолирован от окружающей среды внутри белка.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн гибридного белка выполнен с помощью программы RasMol (<http://www.rasmol.org>).

Оптимизация последовательности гибридного белка выполнена с помощью метода молекулярной динамики программой Gromacs 4.5.3 [10], силовые поля Charmm27. В качестве стартовой модели для молекулярной динамики использовали пространственную структуру 1B9C [11] из банка белковых структур (PDB: <https://www.rcsb.org/>). Полученная модель помещалась в орторомбический водный бокс размером 65 x 65 x 65 Å, содержащий молекулы воды типа TIP3P. Водный бокс выстраивали так, чтобы от крайних атомов в каждом из направлений до края водного бокса расстояние составляло, по крайней мере, 12 Å. Для проверки качества полученных параметров использовали сравнение стереохимических показателей структуры, полученных после 270 нс молекулярной динамики. По ходу траекторий не наблюдалось значительных отклонений координат белка от стартовой конформации. Структура GFP флуктуировала в районе своего равновесного положения. Среднеквадратичные отклонения для всех атомов системы не превышали 3 Å (не более 2 Å для Ca-атомов белков) по ходу всех траекторий.

Для анализа влияния мутаций на структуру белка рассчитали 300 нс молекулярно-динамические траектории при постоянной температуре 300 К и давлении 1 атм. Все расчеты проводили с использованием ресурсов Межведомственного суперкомпьютерного центра (МСС РАН, www.jscc.ru). Координаты системы сохраняли и анализировали каждую 1 пс.

Фрагмент ДНК, кодирующий гибридный белок GFP-бактенецин, синтезировали с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами. Фрагмент кДНК клонировали в экспрессионном векторе pET28a по сайтам рестрикции Nde I и EcoRI. Направленный мутагенез выполнен, как описано ранее [7].

Рекомбинантные белки были наработаны в клетках *E. coli* штамм BL21(DE3). Синтез белка индуцировали добавлением изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозидом (ИПТГ) до конечной концентрации 0,1 мМ при ОП культуры 0,5 ОЕ. Клетки культивировали в течение 16 ч при 18 °С. Клеточные осадки ресуспендировали в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Branson Sonifier (Германия). Клеточные лизаты центрифугировали при 20 тыс. g в течение 30 мин. Супернатант и осадок анализировали с помощью ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы был сконструирован гибридный белок GFP-бактенецин, где часть аминокислот внутренней альфа-спирали GFP заменена на аминокислоты бактенецина. При этом в последовательность бактенецина были добавлены три аминокислоты S, Y, G, которые в зеленом флуоресцентном белке образуют хромофор. На рисунке 1 показана структура GFP, а также последовательности бактенецина, альфа-спирали GFP и гибридного белка GFP-бактенецин. В последовательностях бактенецина и GFP видно (рис. 1Б) очень похожее расположение и чередование гидрофильных и гидрофобных аминокислот, характерное для альфа-спиралей глобулярных водорастворимых белков.

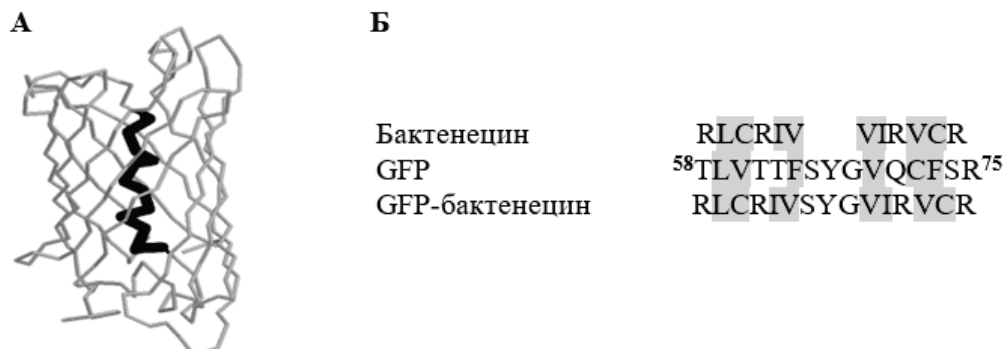


Рисунок 1. А. Структура GFP. Черным цветом выделена альфа-спираль; Б. Выравнивание последовательностей альфа-спирали GFP, гибридного белка GFP-бактенецин и бактенецина. Серым цветом отмечены гидрофобные аминокислоты

Тем не менее, вставка бактенецина вместо центральной альфа-спирали, которую мы спроектировали, меняет большинство аминокислот в самой середине зеленого флуоресцентного белка (рис 1А). Поэтому, первой задачей нашей работы было выяснить, возможно ли принципиально сворачивание GFP с множественными заменами в центральной альфа-спирали.

Гибридный белок наработали в бактериальной культуре *E. coli*. Было установлено, что белок GFP-бактенецин синтезируется в значительном количестве и не токсичен для культуры-продуцента. При этом клетки не флуоресцировали, то есть в гибридном белке не образовывался хромофор. После ультразвуковой дезинтеграции клеток-продуцентов GFP-бактенецин обнаруживался во фракции нерастворимого белка (рис. 2). Это свидетельствует о том, что GFP-бактенецин нестабилен и агрегирует (модификация приводит к нарушению сворачивания и агрегации).

Поскольку GFP дикого типа сильно агрегирует при повышенной температуре или в присутствии денатурантов [4, 12], мы предположили, что причиной агрегации химерного белка может быть дестабилизация структуры. Для поиска мутаций, которые стабилизируют GFP-бактенецин, улучшат его сворачивание и, тем самым, уменьшат агрегацию, было выполнено моделирование пространственной структуры GFP методом молекулярной динамики. Анализ структуры белка GFP-бактенецин методом молекулярной динамики и сравнение ее со структурой белка дикого типа показали, что замены трех аминокислот вполне могли бы стабилизировать этот белок.

Мы провели моделирование структуры белка с заменами F8D, I167D, Q177E, которое показало, что выбранные замены действительно улучшают компактность белка и, возможно, стабилизируют его. На рисунке 3 показана структура белка GFP-бактенецин (рис. 3А) смоделированная методом молекулярной динамики и структура белка GFP-бактенецин с дополнительными стабилизирующими мутациями F8D, I167D, Q177E (рис. 3Б). Видно, что структура белка GFP-бактенецин «разрушается» по сравнению с белком дикого типа. Моделирование белка GFP-бактенецин с дополнительными мутациями показало, что выбранные мутации могут стабилизировать структуру белка.

В результате был сконструирован оптимизированный вариант GFP-бактенецин с аминокислотными заменами F8D, I167D, Q177E, стабилизирующими структуру белка. В процессе наработки в бактериальной культуре оптимизированный белок не оказывал токсического действия на клетки. В отличие от предыдущего варианта оптимизированный белок обнаруживался во фракции растворимого белка после ультразвуковой дезинтеграции клеток (рис. 3В). Таким образом, введенные замены стабилизировали структуру белка и снизили агрегацию. К сожалению, ни клеточная культура, ни выделенный белок (из фракции растворимых белков) не флуоресцировали. Это свидетельствует о том, что в модифицированном GFP не образуется хромофор.

Тем не менее, полученные результаты говорят о том, что GFP вполне может быть использован как «контейнер» для токсичных пептидов. Экспериментальные (в этой работе и [7]) и теоретические исследования, выполненные с помощью метода молекулярной динамики, показывают, что изменения в центральной альфа-спирали и замена внутри белка большого числа гидрофильных или гидрофобных аминокислот дестабилизируют белок, но не «запрещают» такому белку приобрести компактную структуру, близкую к структуре белка дикого типа.

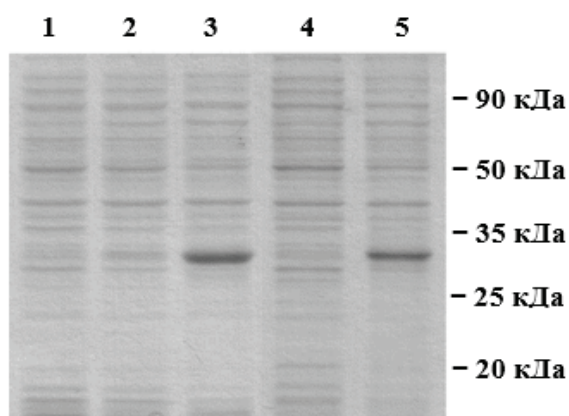


Рисунок 2. Электрофореграмма образцов клеток, продуцирующих GFP-бактенецин: 1. Клетки до индукции синтеза белка; 2. Клетки через 2 ч после индукции синтеза белка; 3. Клетки через 4 ч после индукции синтеза белка; 4. Фракция растворимого белка; 5. Фракция нерастворимого белка

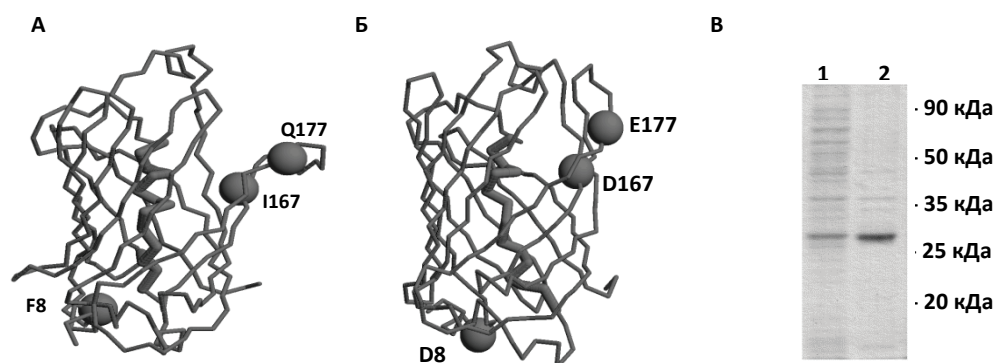


Рисунок 3. А. Структура белка GFP-бактенецин смоделированная методом молекулярной динамики; Б. Оптимизированная структура белка GFP-бактенецин; В. Электрофореграмма образцов клеток, продуцирующих GFP-бактенецин. 1. Клетки до индукции синтеза белка; 2. Клетки через 4 ч после индукции синтеза белка; 3. Фракция растворимого белка; 4. Фракция нерастворимого белка

Авторы выражают благодарность Глухову Анатолию Сергеевичу за помощь в конструировании экспрессионных векторов. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00313.

Список литературы / References:

- Hancock R.E., Haney E.F., Gill E.E. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol*, 2016, vol. 16, pp. 321-334.
- Li Y. Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* *Biotechnol. Appl. Biochem*, 2009, vol. 54, pp. 1-9.
- Urbán P., Valle-Delgado J.J., Moles E., Marques J., Díez C., Fernández-Busquets X. Nanotools for the delivery of antimicrobial peptides. *Curr Drug Targets*, 2012, vol. 13, pp. 1158-1172.
- Tsien R.Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998, vol. 67, pp. 509-544.
- Bokman S.H., Ward W.W. Renaturation of *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, vol. 101, pp. 1372-1380.
- Ormö M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 1996, vol. 273, pp. 1392-1395.
- Glukhova K. F., Marchenkov V.V., Melnik T. N., Melnik B. S. Isoforms of green fluorescent protein differ from each other in solvent molecules 'trapped' inside this protein. *J Biomol Struct Dyn*, 2017, vol. 35, pp. 1215-1225.
- Kent K.P., Oltrogge L.M., Boxer S. G. Synthetic Control of Green Fluorescent Protein *J Am Chem Soc*, 2009, vol. 131, pp. 15988-15989.
- Wu M., Hancock R.E. Interaction of the Cyclic Antimicrobial Cationic Peptide Bactenecin with the Outer and Cytoplasmic Membrane, *J Biol Chem*, 1999, vol. 274, pp. 29-35.
- Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 2015, vol. 1, pp. 19-25.
- Battistutta R., Negro A., Zanotti, G. Crystal structure and refolding properties of the mutant F99S/M153T/V163A of the green fluorescent protein. *Proteins*, 2000, vol. 41, pp. 429-437.
- Stepanenko O. V., Stepanenko O. V., Kuznetsova I. M., Verkhusha V. V., Turoverov K. K. Beta-Barrel Scaffold of Fluorescent Proteins: Folding, Stability and Role in Chromophore Formation. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2013, vol. 302, pp. 221-278.

MODIFICATION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN FOR SYNTHESIS OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES**Glukhova K.A., Kljashtorny V. G., Melnik B.S.**Institute of protein research *RAS**Institutskaya Str., 4, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: gkseniya@gmail.com*

Abstract. At present antimicrobial peptides are a competitive alternative to classic antibiotics. Their wide use is limited to a number of problems associated with the generation of toxic peptides in *E. coli* cells and their delivery to the target site in the organism. We have verified the idea that could help solving this problem. We proposed that green fluorescent protein can be used as a container for “storage” of an antibacterial peptide. An alpha-helix on which a chromophore is formed is initially “hidden” inside the barrel of green fluorescent protein. The alpha-helix itself contains hydrophobic amino acids, and nearby in the center of the barrel there are many bound water molecules. Therefore we suggested that the central alpha-helix of green fluorescent protein can be substituted for an antibacterial peptide. It is rather difficult to realize this idea, and at the first stage there appear several issues without solving which it is impossible to continue the studies as required. Will green fluorescent protein with the substituted alpha-helix fold? Can the chromophore be formed in this case? Is this construction toxic to the cell? We modified green fluorescent protein. The central alpha-helix was substituted by the sequence of antimicrobial peptide batenecin. The results of our experiments show that such a chimera (mutant) protein is compact, soluble, nontoxic to the cell. However it is strongly destabilized, which may be a reason why the chromophore is not formed. Our results demonstrate that the idea to use green fluorescent protein as a “container” for small peptides is quite realizable.

Key words: *green fluorescent protein, antibacterial peptides, batenecin, molecular dynamics.*