

4. Mwinikione Mwinjihija. An overview of selected *lux*-marked biosensors and its application as a tool to ecotoxicological analysis. In: *Biosensors: Properties, Materials and Applications*. Editors: R. Comeaux, P. Novotny. Nova Science Publishers, Inc., 2009, pp. 1-24.

5. Levin B.R., Baquero F., Johnsen P.J. A model-guided analysis and perspective on the evolution and epidemiology of antibiotic resistance and its future. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, vol. 19, pp. 83-89.

6. Craig MacLean R., San Millan A. Microbial Evolution: Towards Resolving the Plasmid Paradox. *Current Biology*, 2015, pp. 764-767.

7. Yano H., Wegrzyn K., Loftie-Eaton W., Johnson J., Deckert G.E., Rogers L.M., Konieczny I., Top E.M. Evolved plasmid-host interactions reduce plasmid interference cost. *Mol. Microbiol.*, 2016, vol. 101, pp. 743-756.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИРОДНЫХ И ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ

Сафронюк С.Л., Кацев А.М.

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»

бульв. Ленина, 5/7, г. Симферополь, 295051, РФ

e-mail: pharmalab01@mail.ru

Аннотация. В работе изучали биологическую активность лекарственных веществ с использованием биоломинесцентных аналитических технологий (БАТ) на основе природных и генно-инженерных светящихся бактерий. По результатам тестирования природных бактерий на чувствительность к антибиотикам был выбран наиболее перспективный тест-штамм *Photobacterium leiognathi* Sh1. Показана применимость БАТ для анализа антибактериальных препаратов на примере гентамицина сульфата ($ЭК_{50}$ и $ЭК_{100}$ для которые составили 0,2 мг/мл и 0,4 мг/мл соответственно), тетрациклина гидрохлорида ($ЭК_{50} = 0,027$ мг/мл и $ЭК_{100} = 0,1$ мг/мл) и бензилпенициллина натриевой соли ($ЭК_{50}$ и $ЭК_{100}$ равные 0,8 мг/мл и больше чем 1 мг/мл, соответственно). Определено, что наиболее выраженной специфической (антибактериальной) активностью обладает тетрациклина гидрохлорид, производное полифункционального гидронафтаценового соединения.

Проведен биоломинесцентный анализ лекарственных веществ других фармакологических групп, который выявил наличие веществ-ингибиторов свечения бактерий, а также группу препаратов, не влияющих на бактериальную люминесценцию. Сравнение структуры этих соединений и их биологической активности выявило наиболее вероятные фармакофоры (фенотиазин, триметиламин, триэтиламин, 1-пропиламин и др.), ответственные за их неспецифическую антибактериальную активность.

Показана применимость биотеста на хроническое действие с использованием морских светящихся бактерий, а также рекомбинантных биорепортерных штаммов на основе *Escherichia coli* (LUX) для более детального анализа биологической активности лекарственных веществ.

Ключевые слова: биотестирование, биологическая активность, лекарственные препараты, светящиеся бактерии, *Photobacterium leiognathi* Sh1.

NEW APPROACHES TO STUDY BIOLOGICAL ACTIVITY OF DRUGS WITH THE USE OF NATURAL AND RECOMBINANT BIOLUMINESCENT TEST-BACTERIA

Safronyuk S.L., Katsev A.M.

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU

Lenin Avenue, 5/7, Simferopol, 295051

e-mail: pharmalab01@mail.ru

Abstract. The biological activity of drugs was studied using bioluminescent analytical technologies (BAT), based on natural and genetically engineered luminescent bacteria. The most promising test-strain *Photobacterium leiognathi* Sh1 was revealed by means of the estimation of three bacteria species on the sensitivity to antibiotics. The applicability of BAT for the analysis of antibacterial drugs was shown on the base of gentamicin sulfate (EC_{50} and EC_{100} for which they were 0.2 mg / ml and 0.4 mg / ml, respectively), tetracycline hydrochloride ($EC_{50} = 0.027$ mg / ml and $EC_{100} = 0.1$ mg / ml) and benzylpenicillin sodium salt (EC_{50} and EC_{100} equal to 0.8 mg / ml and more than 1 mg / ml, respectively). Specifically, tetracycline hydrochloride, the derivative of the polyfunctional hydronaphthacene compound, was shown to have the most pronounced specific (antibacterial) activity.

Bioluminescent analysis of medicinal substances of other pharmacological groups showed both the presence of substances-inhibitors of bacterial luminescence and a group of drugs that do not affect bacterial luminescence. A comparison of the compounds' structure and their biological activity, defined the most probable pharmacophores (phenothiazine, trimethylamine, triethylamine, 1-propylamine, etc.) responsible for their nonspecific antibacterial activity.

The applicability of BAT on the base of marine luminescent bacteria for chronic biological effect study as well as on the recombinant bioreporter strains, based on *Escherichia coli* (LUX), were shown for further detailed analysis of the biological activity of drugs.

Key words: biotesting, biological activity, drugs, luminescent bacteria, *Photobacterium leiognathi* Sh1.

Введение.

В мире проводится множество исследований по определению специфической и неспецифической биологической активности веществ с использованием как теоретических, так и практических подходов [1-3]. Одним из современных направлений в этой области могут выступать биолюминесцентные или биохемилюминесцентные аналитические технологии (БАТ), включающие в себя методы, основанные на регистрации люминесценции, вызванной биологическими или химическими процессами как *in vitro*, так и *in vivo*. К БАТ относятся хемилюминесцентные тесты с использованием люминола, люцигенина или люцифераз, а также биотестирование с использованием природных и генно-инженерных светящихся бактерий. Данные подходы обладают такими преимуществами как простота в использовании, чувствительность и экспрессность [4]. Кроме того, биотестирование с использованием люминесцентных микроорганизмов позволяет оценивать биологическую активность веществ и их смесей, не зависимо от механизма действия [4].

Цель работы: оценить применимость БАТ на основе природных светящихся бактерий для изучения биологической активности лекарственных препаратов в зависимости от химического строения.

Материалы и методы.

В работе исследовали антибиотики: бензилпенициллин-КМП (ОАО "Киевмедпрепарат"), гентамицина сульфат (ООО "Фармацевтическая компания "Здоровье") и тетрациклина гидрохлорид (ОАО "Киевмедпрепарат"), а также лекарственные препараты других фармакологических групп: аминазин (Валента Фармацевтика ОАО), анальгин (Санитас), атропин (Эргофарма), галоперидол (Мосхимфармпрепараты им. Н. А. Семашко), димедрол (ОВХФП "Биостимулятор"), димексид (ДМСО, Йодные технологии и маркетинг), лидокаин-гидрохлорид (ООО "Фармацевтическая компания "здоровье"), лобелина гидрохлорид (ЗАО "Дарница"), новокаин (РУП «БЗМП»), дротаверин (Chinoin Pharmaceutical and Chemical Works Co.), папаверина гидрохлорид (ЗАО "Дарница"), пиполфен (ЭГИС), пирацетам ("Органика" (Новокузнецовск)), скополамина гидробромид (RocheHaltbar) и ультракаин (Авентис Фарма Дойчланд Гмбх).

Биологическую активность препаратов изучали с помощью БАТ на основе природных светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей [5-7] и чувствительных к действию лекарственных препаратов [8]. В работе использовали люминесцентные тест-штаммы *Photobacterium leiognathi* Sh1, *Allivibrio fischeri* F1 и *Vibrio harveyi* Ms3 из коллекции светящихся бактерий Медицинской академии имени С.И. Георгиевского. Культивирование бактерий проводили при 25⁰С на жидких и плотных питательных средах M001 и M002 (HiMedia, Индия) с 3%-м содержанием натрия хлорида [9].

Действие образцов на тест-системы определяли путем внесения в ячейки 96-луночного планшета по 0,24 мл смеси, содержащей различные концентрации тестируемых веществ, жидкую питательную среду (1:40) и 0,01 мл бактериальной суспензии. Планшеты термостатировали (ТС-80М, Россия) при 25⁰С в течение 15 мин, после чего регистрировали интенсивность биолюминесценции с помощью микропланшетного люминометра LuMate 4400 (Awareness Technology, Inc.). Результаты измерений представляли в виде зависимости интенсивности биолюминесценции (I%, см. формулу 1) от концентрации вещества [8].

$$I\% = I_i / I_0 \times 100\% , \tag{1}$$

где I_i – интенсивность биолюминесценции в присутствии вещества; I₀ – интенсивность биолюминесценции бактерий в контроле.

Активности препаратов в отношении бактерий оценивали по таким параметрам как: эффективная концентрация препарата, снижающая свечения микроорганизмов на 50% (ЭК₅₀) и минимальная концентрация вещества, приводящая к снижению люминесценции на 100% (ЭК₁₀₀). Обработка результатов, а также построение диаграмм проводилась с помощью программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение.

На первом этапе провели поиск наиболее оптимального тест-штамма среди морских светящихся бактерий *P. leiognathi* Sh1, *A. fischeri* F1 и *V. harveyi* Ms3 для изучения биологической активности лекарственных препаратов. Для этого оценили интенсивность биолюминесценции суспензий фотобактерий в зависимости от концентрации антибиотика широкого спектра действия – гентамицина сульфата (см. рис. 1). Относительная погрешность результатов определения биолюминесценции не превышала 5%.

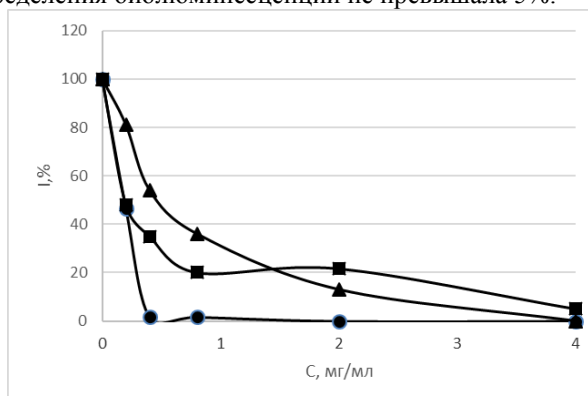


Рисунок 1 – Влияние гентамицина сульфата на биолюминесценцию \blacksquare –*P. leiognathi* Sh1, \blacksquare –*A. fischeri* F1 и \blacktriangle –*V. harveyi* Ms3

По результатам тестирования было установлено, что увеличение концентрации антибиотика в пробе вызывало снижение свечения бактерий, аналогичное для всех трех штаммов. Ингибирование бактериальной биолюминесценции под действием гентамицина, как и его антибиотическое действие, определяется содержанием в его структуре аминоциклического кольца, взаимодействующего с рибосомой, что приводит к нарушению биосинтеза белков в бактериальной клетке [11]. Концентрации антибиотика, действующие на свечение *P. leiognathi* Sh1, *A. fischeri* F1 и *V. harveyi* Ms3, составили ЭК₅₀: 0,2 мг/мл, 0,2 мг/мл и 0,45 мг/мл, а ЭК₁₀₀: 0,4 мг/мл, более 4 мг/мл и 4 мг/мл, соответственно. Полученные данные позволили выбрать тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 для дальнейших исследований, как наиболее чувствительный для анализа биологической активности.

На следующем этапе работы изучили биологическую активность других антибиотиков: тетрациклина гидрохлорида и бензилпенициллина натриевой соли, в сравнении с гентамицином, с использованием БАТ на основе выбранного тест-штамма (см. рис. 2). Тетрациклина гидрохлорид обладал сильным ингибирующим действием на бактериальную биолюминесценцию [10], сходным с действием гентамицина сульфата. ЭК₅₀ и ЭК₁₀₀ для тетрациклина составили 0,027 мг/мл и 0,1 мг/мл, соответственно. Его антибактериальный эффект определяется наличием в структуре полифункционального гидронафтаценового соединения, ингибитора некоторых этапов биосинтеза белка [11]. Следует отметить, что тетрациклин, который влияет на более ранний этап биосинтеза белка, характеризовался более низкими, по сравнению с гентамицином, значениями ЭК₅₀ (в семь раз ниже) и ЭК₁₀₀ (в четыре раза). Бензилпенициллин также обладал сильным ингибирующим действием на бактериальную люминесценцию, однако его эффект отмечался при более высоких значениях эффективных концентраций: 0,8 мг/мл (ЭК₅₀) и >1,0 мг/мл (ЭК₁₀₀).

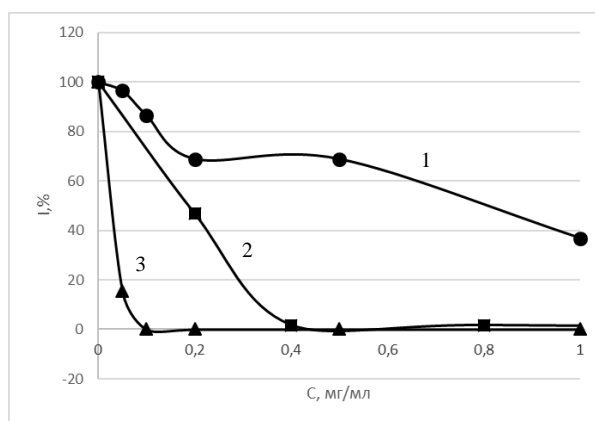


Рисунок 2 – Влияние антибиотиков на биолюминесценцию *P. leiognathi* Sh1:
1 – бензилпенициллин-КМП; 2 – гентамицина сульфат; 3 – тетрациклина гидрохлорид

Исследование действия лекарственных препаратов других фармакологических групп (не относящихся к антибиотикам) на биолюминесценцию *P. leiognathi* Sh1 позволило разделить их на три основные группы, аналогично [10,12]. К сильным ингибиторам люминесценции были отнесены аминазин, дротаверин, папаверин, пипольфен, галоперидол (см. рис. 3), ингибиторы люминесценции - димедрол, лидокаин, новокаин и ультракаин (см. рис. 4) и вещества, не влияющие на люминесценцию тест-объектов – димексид, атропин, лобелин, парацетам, скополамин и строфантин (см. рис. 5).

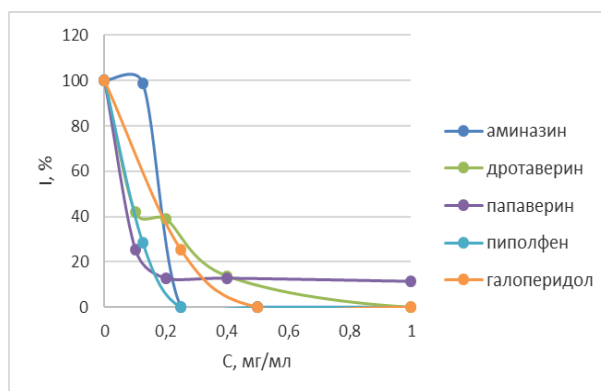


Рисунок 3 – Сильные ингибиторы люминесценции бактерий

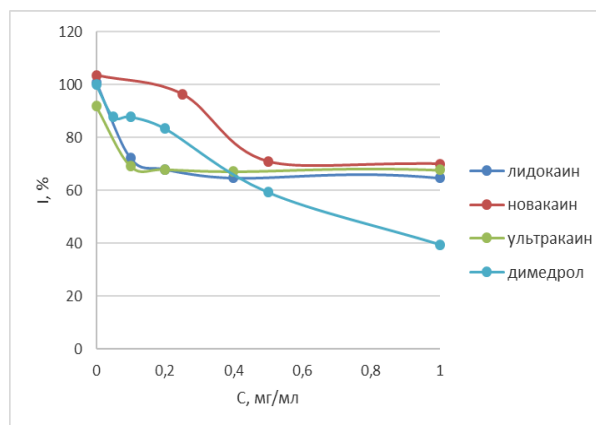


Рисунок 4 – Ингибиторы люминесценции бактерий

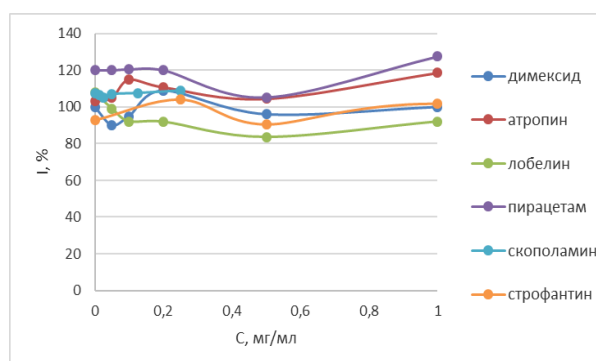


Рисунок 5 – Вещества, не оказывающие влияния на люминесценцию бактерий

Лекарственные вещества - сильные ингибиторы люминесценции в эксперименте характеризовались ЭК₅₀ менее 0,2 мг/мл и ЭК₁₀₀ менее 1 мг/мл, что близко к соответствующим параметрам антибиотиков. Анализ их структуры показал, что аминазин и пипольфен относятся к производным фенотиазина, который является токсичным соединением и используется как основа для синтеза инсектицидов [13]. Препараты дротаверин и папаверин содержат орто-диметоксифенол, предшественником которого является гваякол, обладающий антисептическими свойствами. Галоперидол в своей структуре имеет радикалы: хлорфенил, применяемый при синтезе пестицидов, и фторфенил - один из заместителей при синтезе противоопухолевых препаратов.

Вторая группа веществ-ингибиторов свечения характеризовалась значениями ЭК₅₀ 0,75-1,0 мг/мл. При этом ЭК₁₀₀ в исследуемом диапазоне концентраций выявить не удалось. Её представитель, димедрол в своей структуре содержит дифенилметан, производные которого служат пестицидами, фунгицидами и бактерицидами. Другой структурный компонент, диметилэтиламин, является гомологом триэтиламина, используемого в производстве гербицидов [14]. Последний (радикал триэтиламина) содержится в структуре лидокаина и новокаина. Ультракаин является производным 2-тиофенкарбоновой кислоты, которая используется в качестве отбеливателя, а 3-пропиламинбутаноновый радикал проявляет свойства гербицида.

Остальные препараты не содержали в своей структуре фрагментов (фармакофоров) с естественным антибиотическим действием и не оказывали значительного влияния на бактериальную биолюминесценцию (см. рис. 5). Так, например, ДМСО, который не влиял на свечение *P. leiognathi* Sh1, часто используется в качестве растворителя образцов при биотестировании на природных светящихся бактериях [15].

Таким образом, для лекарственных препаратов, которые не относились к антибиотикам, ингибирующее действие на биолюминесценцию бактерий проявлялось при наличии в структуре определенных фармакофорных групп, обладающих биоцидными свойствами. При этом наиболее сильное действие лекарственного вещества проявлялось, когда такая группа была основным элементом его структуры и снижалось в 5 и более раз, если фармакофор присутствовал в качестве заместителя.

Проведенные исследования показали возможность применения БАТ на основе природного биолюминесцентного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 для определения различных видов биологической активности лекарственных веществ. Данный подход позволяет выявить вещества с антибактериальной и/или неспецифической антибиотической активностями. Более детальное изучение биологических эффектов лекарственных веществ может осуществляться с использованием других БАТ, что подтверждается результатами проведенного биотестирования хронического действия на морских светящихся бактериях (неопубликованные данные), а также данными по использованию биорепортерных рекомбинантных штаммов *E. coli* (LUX) для выявления специфических механизмов антибиотической активности. Разработанные БАТ были использованы авторами при фармацевтическом скрининге вновь синтезированных производных 1,2,4-триазинохиназолин-2-онов с целью поиска соединений-кандидатов для создания новых лекарственных препаратов [12,16].

Выводы.

1. В ходе изучения влияния гентамицина сульфата на биолюминесценцию трех видов морских светящихся бактерий вывели штамм *P. leiognathi* Sh1, как наиболее чувствительный к действию антибиотика.

2. Действие лекарственных веществ-антибиотиков на биолюминесценцию тест-бактерий проявлялось в ее ингибировании в зависимости от структуры и механизма антибиотической активности. ЭК₅₀ тетрациклина гидрохлорида была в семь раз ниже, чем концентрация гентамицина и в тридцать раз ниже, чем бензилпенициллина.

3. По влиянию на бактериальную биолюминесценцию лекарственные вещества, не относящиеся к антибиотикам, были разделены на три группы: сильные ингибиторы люминесценции (ЭК₅₀ менее 0,2 мг/мл): аминазин, дротаверин, папаверин, пипольфен, галоперидол; ингибиторы люминесценции (ЭК₅₀ 0,75-1,0 мг/мл): димедрол, лидокаин, новакаин, ультракаин и вещества, не влияющие на бактериальную люминесценцию: димексид, атропин, лобелин, парацетам, скополамин и строфантин.

4. Анализ структуры и биологической активности лекарственных веществ не антибиотического действия выявил наиболее вероятные фармакофорные группы (фенотиазин, дифенилметан, триэтиламин, 1-пропиламин и др.), отвечающие за ингибирование бактериальной биолюминесценции и их неспецифическую антибиотическую активность.

5. Показана применимость БАТ на основе люминесцентных бактерий для анализа лекарственных веществ на наличие как специфической, так и неспецифической антибиотической активности.

Список литературы / References:

1. Waseem H., Williams M.R., Stedtfeld T., Chai B., Stedtfeld R.D., Cole J.R., Tiedje J.M., Hashsham S.A. Virulence factor activity relationships (VFARs): a bioinformatics perspective. *Environ Sci Process Impacts*, 2017, vol. 19, no. 3, pp. 247-260.

2. McBride D., Krekel T., Hsueh K., Durkin M.J. Pharmacokinetic drug evaluation of tedizolid for the treatment of skin infections. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, 2017, vol. 13, no. 3, pp. 331-337.

3. Григорьев В.Ю., Раздольский А.Н., Загребин А.О., Тонкопий В.Д., Раевский О.А. Классификационные QSAR модели острой токсичности органических соединений по отношению к *daphnia magna*. *Химико-фармацевтический журнал*, 2014, № 4, с. 21-24. [Grigoriev V.Yu., Razdolsky A.N., Zagrebina A.O., Tonkopiya V.D., Raevskiy O.A. Classification QSAR models of acute toxicity of organic compounds with respect to *daphnia magna*. *The Chemical-Pharmaceutical Journal*, 2014, vol. 4, pp. 21-24. (In Russ.)]

4. Neale P.A., Leusch F.D.L., Escher B.I. Applying mixture toxicity modelling to predict bacterial bioluminescence inhibition by non-specifically acting pharmaceuticals and specifically acting antibiotics. *Chemosphere*, 2017, vol. 173, pp. 387-394.

5. Кацев А.М., Макемсон Дж. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из черного и азовского морей. *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского Серия «Биология, химия»*, 2006, т. 19 (58), № 4, с. 111-116. [Katsev A.M., Makamson J. Identification of luminous bacteria isolated from the Black and Azov Seas. *Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V.I. Vernadsky. Series "Biology, Chemistry."*, 2006, vol. 19 (58), no. 4, pp. 111-116. (In Russ.)]

6. Мальгина В.Ю., Кацев А.М. Светящиеся бактерии Черного и Азовского морей. *Экология моря*, 2003, т. 64, с. 18-23. [Malygina V.Yu., Katsev A.M. Glowing bacteria of the Black and Azov Seas. *Ecology of the Sea*, 2003, vol. 64, pp. 18-23. (In Russ.)]

7. Кацев А.М. Некоторые характеристики Черноморских светящихся бактерий и их прикладное значение. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2002, № 2, с. 189-192. [Katsev A.M. Some characteristics of the Black Sea luminous bacteria and their applied value. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2002, no. 2, pp. 189-192. (In Russ.)]

8. Кацев А.М., Сафронюк С.Л., Цокало И.Е., Шереметьева А.В., Стародуб Н.Ф. Оценка применимости биолюминесцентного анализа при определении активности лекарственных препаратов. *Ветеринарная биотехнология*, 2013, № 22, с. 188-195. [Katsev A.M., Safronyuk S.L., Tsokalo I.E., Sheremetyeva A.V., Starodub N.F. Evaluation of the applicability of bioluminescent analysis in determining the activity of drugs. *Veterinary Biotechnology*, 2013, vol. 22, pp. 188-195. (In Russ.)]

9. Bolelli L., Ferri E.N., Girotti S. The management and exploitation of naturally light-emitting bacteria as a flexible analytical tool: A tutorial. *Anal Chim Acta*, 2016, pp. 22-35.

10. Дерябин Д.Г. *Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты*. Наука, 2009, 245 с. [Deryabin D.G. Bacterial Bioluminescence: Fundamental and Applied Aspects. *Science*, 2009, pp. 245. (In Russ.)]

11. Chandra H., Bishnoi P., Yadav A., Patni B., Mishra A.P., Nautiyal A.R. Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with SpЭKial Emphasis on Plant-Based Antimicrobials. *Plants (Basel)*, 2017, vol. 6, no. 2, pii: E16.

12. Сафронюк С.Л., Крамарь Т.В., Назаренко М.В. Оценка влияния заместителей в гетерофункциональных производных 1,2,4-триазинохинолинтоиуксусной кислоты на биолюминесценцию бактерий. *Вестник Томского государственного университета. Химия*, 2016, № 4 (6), с. 39-49. [Safronyuk S.L., Kramar T.V., Nazarenko M.V. Estimation of the influence of substituents in hetero-functional derivatives of 1,2,4-triazinoquinazolinoacetic acid on the bioluminescence of bacteria. *Bulletin of Tomsk State University. Chemistry*, 2016, no. 4 (6), pp. 39-49. (In Russ.)]

13. Саломатин Е.М. Токсическое действие производных феноптиазина и методы их определения в биологических жидкостях. *Судебно-медицинская экспертиза*, 1966, № 1, с. 18-21. [Salomatin E.M. Toxic effect of phenothiazine derivatives and methods for their determination in biological fluids. *Forensic medical examination*, 1966, no. 1, pp. 18-21. (In Russ.)]
14. Ashford R.D. *Ashford's Dictionary of Industrial Chemicals*. 3rd. 2011, P. 9362.
15. Кацев А.М., Шандровская А.С., Абдураманова Э.Р. Оптимизация выбора органических растворителей для проведения скринингового биотестирования лекарственных веществ. *Запорожский медицинский журнал*, 2011, т. 13, № 1, с. 083-086. [Katsev A.M., Shandrovskaia A.S., Abduramanova E.R. Optimization of the choice of organic solvents for screening biotesting of drugs. *Zaporozhye Medical Journal*, 2011, vol. 13, no. 1, pp. 083-086. (In Russ.)]
16. Nosulenko I.S., Voskoboynik Y.U., Berest G.G., Safronyuk S.L., Kovalenko S.I., Kamyshnyi O.M., Polishchuk N.M., Sinyak R.S., Katsev A.V. Synthesis and antimicrobial activity of 6-Thioxo-6,7-dihydro-2H-[1,2,4]triazino [2,3-c]-quinazolin-2-one derivatives. *Scientia Pharmaceutica*, 2014, vol. 82, iss. 3, pp. 483-500.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТРОЙНОЙ ЗАМЕНЫ ASP9ALA/VAL43ARG/TYR55TRP В БЕЛКЕ HFQ НА ЕГО СТРУКТУРУ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ

Леконцева Н.В., Кутузова К.А., Филимонов В.В., Балобанов В.А., Никулин А.Д.

Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пущино, 142290, РФ

e-mail: natalja-lekontseva@rambler.ru

Аннотация. Белок Hfq из *Pseudomonas aeruginosa* является РНК-связывающим белком, принимающим участие во многих процессах, связанных с транскрипцией и трансляцией РНК. Он принадлежит к структурному семейству Sm-подобных белков (Sm-like proteins – Lsm) и формирует в растворе и кристаллах гомогексамеры. Несмотря на то, что белок выделен из мезофильной бактерии, он обладает экстремальной термостабильностью. Методом микрокалориметрии показано, что Hfq начинает плавиться при температурах выше 120°C при нейтральных значениях pH и предложена схема плавления белка с промежуточным состоянием в виде мономера белка. Для подтверждения этой гипотезы решено получить белок в мономерной форме, внося существенное изменение в межсубъединичный интерфейс посредством комплексной замены аминокислотных остатков Asp9, Val43 и Tyr55. Степень олигомеризации полученного белка оценена методами динамического рассеяния света, «околонативного» электрофореза и гель-фильтрацией.

Ключевые слова: Hfq, Sm-подобные белки, олигомеризация, динамическое рассеяние света.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SUBSTITUTION ASP9ALA/VAL43ARG/TYR55TRP ON HFQ PROTEIN STRUCTURE AND STABILITY

Lekontseva N.V., Kutuzova K.A., Filimonov V.V., Balobanov V.A., Nikulin A.D.

Institute of protein research RAS

Institutskaya Str., 4, Pushchino, 142290, Russia

e-mail: natalja-lekontseva@rambler.ru

Abstract. Hfq from *Pseudomonas aeruginosa* is a posttranslational regulator of gene expression that binds small noncoding RNAs (sRNA) and promotes their interaction with mRNAs. It belongs to the widespread Sm/Lsm (Sm-like) protein family and forms hexamers in crystals and solution. In spite of the mesophilic source Hfq possess extremely high thermostability. Measurements of the protein stability by microcalorimetry showed the transition midpoint for Hfq was about 120°C at neutral pH. A model for a temperature-induced unfolding of the Hfq hexamers which includes dissociation to monomers and their subsequent unfolding was suggested. To confirm this hypothesis it was necessary to obtain Hfq monomer by complex substitution of amino acids Asp9, Val43 and Tyr55, which organized inter-monomer hydrogen bonds in the protein hexamer. The obtained mutant form of the Hfq was studied by semi-native electrophoresis, size-exclusion chromatography and dynamic light scattering.

Key words: Hfq, Sm-like proteins, oligomerization, semi-native electrophoresis, dynamic light scattering

Белок Hfq является высококонсервативным экстремально термостабильным белком с молекулярной массой около 10 кДа. Впервые был обнаружен в 1968 году как клеточный белок *Escherichia coli* HF-I (Host factor I), участвующий в репликативном цикле бактериофага Q β [1]. Последующие 20 лет работы с белком Hfq были направлены на исследование его РНК-связывающих свойств [2]. И только в 1990-х годах стала понятна его роль в экспрессии генов: он принимает участие во многих процессах, связанных с транскрипцией и трансляцией РНК. Структурно белок Hfq принадлежит к семейству Sm-подобных (или Lsm) белков, которые были обнаружены во всех доменах жизни [3]. Представители данного семейства имеют сходную первичную и третичную структуры, но четвертичная структура белков из различных доменов жизни отличается разным количеством мономеров. Для бактериальных белков характерны пространственные структуры гомогексамерного типа, для архейных белков – гомогептамерного типа, а эукариотические в основном представлены гетерогептамерами [4]. Формирование четвертичной структуры происходит за счет образования “сквозного” β -листа, благодаря объединению β 4- и β 5-