

ТЕХНОЛОГИЯ ОТБОРА ФАГОВЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ

М.А. Фофонов (СПбГТИ(ТУ)), **А.Д. Гуцол** (СПбГТИ(ТУ)), **В.А. Касьянов** (СПбГПУ)

Научные руководители: **Д.А. Антонова** (СПбГПУ), **М.В. Якунина** (СПбГПУ).

Введение. Распространение патогенных штаммов с множественной лекарственной устойчивостью и уменьшение скорости разработки антибиотиков широкого спектра действия ставят задачу поиска альтернатив антибиотикам [1]. В качестве альтернативы рассматривалось применение литических бактериофагов, однако противоречивые данные об их эффективности и приобретение бактериями устойчивости и к ним, ограничивает возможность их применения [2]. В то же время, заражение бактериальной клетки литическими бактериофагами приводит к остановке клеточного деления, что, вероятно, связано с механизмами действия белков бактериофагов, синтезирующихся в первые минуты инфекции. Такие белки, влияющие на бактериальный рост, могут быть использованы в качестве противомикробных агентов непосредственно, или для моделирования на их основе антимикробных пептидов (АМП), которые будут воздействовать на ту же мишень, эффективнее проникая в бактериальные клетки. При этом синтез АМП, в отличие от синтеза полноразмерного белка, можно осуществить вне клеточных систем в большом количестве. Учитывая, что количество фаговых белков с неизвестной функцией очень велико, необходима технология отбора подходящих токсичных для бактериальных клеток фаговых белков для последующего моделирования на их основе перспективных АМП.

Основная часть. В данной работе была оптимизирована технология отбора токсичных фаговых белков бактериофага *phiKZ*, инфицирующего *P. aeruginosa*. Для анализа воздействия 45 белков на рост *P. aeruginosa* штамм PAO1 и *E. coli* штамм DH5 α был создан набор плазмид на основе шаттл-вектора pHERD20T, в которые под контроль арабинозного оперона помещались последовательности ДНК, кодирующие His-tag или Strep-tag для возможности последующего выделения белка с помощью хроматографии. Ген белка интереса помещался в модифицированные плазмиды методом рестрикции-лигирования, и клетки *P. aeruginosa* и *E. coli* трансформировались полученными генетическими конструкциями. Тестирование влияния фаговых белков на клеточные культуры происходило в три этапа: 1) оценка роста клеточных культур при рассеивании культур штрихом на твердой питательной среде LB с 1,5% агаром с или без добавления арабинозы; 2) анализ воздействия белков на рост клеток в жидкой питательной среде LB с или без добавления арабинозы в планшетном спектрофотометре с измерением оптической плотности не реже, чем раз в 30 минут, в течение 12 часов при 37 °С; 3) количественный подсчет погибших клеток среди > 300 клеток под флуоресцентным микроскопом раз в час в течение 4 часов при 37 °С на агарозной подложке с/без арабинозы, с добавлением красителя, окрашивающего ДНК мертвых клеток. В качестве контроля использовались клетки с плазмидой pHERD20T. В результате скрининга были отобраны 4 белка, один из которых приводит к гибели более чем половины клеток для обоих типов культур. На его основе было смоделировано несколько вариантов пептидов, 5 из которых подавляли рост *E. coli* штамма DH5 α .

Выводы. Была продемонстрирована технология скрининга фаговых белков для создания АМП. Перспективность подхода была продемонстрирована свойствами полученных АМП. В дальнейшем планируется проведение поиска мишени АМП с целью установления механизма действия.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы «Приоритет 2030» (соглашение 075-15-2023-380 от 20.02.2023).

Список использованных источников:

1. Lewis K. The Science of Antibiotic Discovery // *Cell*. 2020. Т. 181. № 1. С. 29-45. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.056 (дата обращения: 06.02.2024).
2. Egido J.E., Costa A.R., Aparicio-Maldonado C., Haas P.J., Brouns S.J.J. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance // *FEMS Microbiol Rev*. 2022. Т. 46. № 1. DOI: 10.1093/femsre/fuab048 (дата обращения: 06.02.2024).