

**Химерный белок лизостафин с альбумин-связывающим доменом,
содержащий аминокислотную последовательность, гидролизуемую
протеазами крови**

Научный руководитель – Лунин Владимир Глебович

Васина Ирина Владимировна

Сотрудник

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени
почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

E-mail: irinavasina1995@gmail.com

Бактериоцин лизостафин из группы пептидогликановых гидролаз является перспективным антибактериальным ферментом, способным лизировать клетки *Staphylococcus aureus*. Существенным недостатком, ограничивающим его применение, является небольшая молекулярная масса и, как следствие, быстрое выведение из кровотока за счет почечной фильтрации. В качестве одного из способов продления времени пребывания лизостафина в организме было опробовано добавление на его С-конец альбумин-связывающего домена G-белка *Streptococcus* spp. через короткую линкерную последовательность [2]. Однако, несмотря на значительное снижение скорости выведения химерного белка Lst-ABD из организма, было замечено падение его бактерицидной активности при образовании комплекса с альбумином. В данной работе мы исследовали возможность использования линкера, содержащего аминокислотную последовательность FNPКТР, гидролизуемую протеазами крови. Такой линкер должен одновременно обеспечить длительное пребывание в крови слабоактивного химерного белка в комплексе с альбумином и постепенное высвобождение высокоактивного лизостафина. Ранее подобный подход контроля высвобождения был успешно апробирован на примере белка GLP-1 [1].

В ходе работы был сконструирован и экспрессирован в *E. coli* химерный белок Prot1, состоящий из лизостафина, короткого глицин-серинового спейсера со встроенной последовательностью FNPКТР, альбумин-связывающего домена и шести остатков гистидина на С-конце. Полученный белок был очищен с помощью металл-аффинной хроматографии. Энзиматическая активность Prot1 оказалась близкой к нативному лизостафину в тесте на скорость расщепления пентаглицинового пептида (субстрата лизостафина). Бактериолитическая активность Prot1 в опыте с просветлением суспензии клеток *S. aureus* ATCC 29213 оказалась даже несколько выше, чем активность контрольного лизостафина (0.024 Δ OD550/мин против 0.021 Δ OD550/мин в пересчете на 100 нМ белка) или Lst-ABD (0.014 Δ OD550/мин). В присутствии альбумина активность Prot1 снижалась до 0.002 Δ OD550/мин.

Для проверки расщепления линкера между лизостафином и альбумин-связывающим доменом белок Prot1 был помечен флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 и инкубирован с 25% кроличьей сывороткой в течение 48 часов при 37°C с последующим разделением фрагментов в 12% ПААГ. Наличие нативного лизостафина без альбумин-связывающего домена было заметно уже через два часа и его количество возрастало по мере увеличения длительности инкубации, что свидетельствует о расщеплении линкера в белке Prot1.

Работа поддержана грантом РНФ № 18-15-00235.

Источники и литература

- 1) Böttger R., Knappe D., Hoffmann R. PEGylated prodrugs of antidiabetic peptides amylin and GLP-1 // J.of Controlled Release. 2018. Vol. 292, P. 58-66.
- 2) Grishin A.V., Shestak N.V., Lavrova N.A. et al. Fusion of lysostaphin to an albumin binding domain prolongs its half-life and bactericidal activity in the systemic circulation // Molecules. 2019. Vol. 24(16), 2892.