



Оригинальная статья

УДК 579.861.2

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА LUKE STAPHYLOCOCCUS AUREUS В ШТАММЕ ESCHERICHIA COLI BL21(DE3)

* Абитаева Г.К.^{1,2}, Буланин Д.¹, Марченко Е.В.¹, Вангелиста Л.¹

¹Nazarbayev University School of Medicine

ул. Керей, Жанибек хандар 5/1, Нур-Султан, 010000, Казахстан

²Республиканская коллекция микроорганизмов,

ул. Ш. Уалиханова 13/1, Нур-Султан, 010000, Казахстан

*g.abitayeva@rcm.kz

АБСТРАКТ

Двухкомпонентные лейкотоксины являются важными факторами вирулентности *Staphylococcus aureus*. Несмотря на усилия, предпринятые для изучения лейкотоксинов *S. aureus*, прямой механизм действия этих токсинов во время инфекции не определен. Однако, наблюдение, что делеция *LukED* значительно ослабляет высоковирулентные штаммы *S. aureus*, подтверждает предположение, что избирательное ингибирование *LukE/D* может оказаться полезным при разработке новых аспектов борьбы с инфекцией *S. aureus*. С этой целью была проведена работа по проверке экспрессии и получении рекомбинантной формы белка *LukE* в клетках *E.coli*. Ген *lukE* был клонирован в составе вектора pET28-c(+)/GFP, содержащего ген *gfp*. Проводили экспрессию двух слитых генов, несущих гексагистидиновую метку в клетках штамма *E.coli* BL21(DE3). Было установлено, что белок 6His-GFP-LucE агрегирует в тельцах включения. Из тельц включения 6His-GFP-LucE вымывали высокомолярной мочевиной. Очистку белка 6His-GFP-LucE проводили методом металлоафинной хроматографии. Результаты исследований могут быть применены для получения рекомбинантного белка *LukE*, включая стратегии ингибирования активности токсина.

Ключевые слова: *LukE* (название гена), GFP, экспрессия, рекомбинантный белок, *E.coli*.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем общественного здравоохранения является рост случаев возникновения серьезных антибиотикорезистентных стафилококковых инфекций. Согласно отчета Центра по контролю и

профилактике болезней «Об угрозах устойчивости к антибиотикам в Соединенных Штатах Америки (США), 2019» ежегодно в США возникает более 2,8 миллиона инфекций, устойчивых к антибиотикам, в результате которых умирает более 35 000 человек. В 2017 году возникло 323 700 случаев инфицирования *S. aureus* и, по меньшей мере, 10 600 летальных исходов [1]. По данным отчета Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2014 год до 60% штаммов *S. aureus*, выделенных у пациентов (обычно кожных инфекций и респираторных заболеваний), устойчивы к метициллину, что вероятно означает неэффективность лечения стандартными антибиотиками [2]. В связи с этим ВОЗ включила метициллин-резистентные стафилококки в список микроорганизмов опасных для человечества. В Казахстане эпидемиологическая ситуация заболеваемости и смертности, связанная со *S. aureus*, мало изучена либо не представлена в открытых источниках.

Поскольку появление штаммов *S. aureus*, устойчивых к антибиотикам, представляет собой постоянно растущую глобальную угрозу [3], требуется более детальное представление о том, как возникает устойчивость к антибиотикам. Необходимо внедрение новых доклинических парадигм, учитывающих сложность генетических механизмов передачи устойчивости, динамику протекания инфекции и приспособляемость бактерий [4]. Кроме того, из-за низкого качества новых антибиотиков, и поступающих на рынок лекарств, необходимо применять альтернативные стратегии для борьбы с устойчивостью к антибиотикам, в частности с инфекциями, вызванными *S. aureus* [5].

Двухкомпонентный порообразующий лейкотоксин ED (LukED) является ключевым фактором вирулентности, используемым *S. aureus* для подавления иммунной системы хозяина, следовательно, для обеспечения его смертельной инфекционности. Клеточные компоненты, являющиеся мишенями LukED, которые определяют тропизм к токсину у нейтрофилов, макрофагов, дендритных клеток и Т-лимфоцитов, долгое время были неуловимыми. Однако исследования последних лет выявили наличие CCR5 рецептора на поверхности Т-лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток человека и мыши [6] CXCR1 и CXCR2 на поверхности нейтрофилов [7], выполняющих роль рецепторов LukED. LukE изначально связывается с CCR5, CXCR1 или CXCR2 и формируется двухкомпонентный октамер за счет мономеров LukE и LukD, которые собираются на поверхности клеток-мишеней. В дальнейшем, конформационное изменение данного октамера приводит к образованию пор, что, в конечном итоге, ведет к гибели клеток. Недавнее определение трехмерной структуры мономеров LukE и LukD [8] помогло понять молекулярные механизмы распознавания рецепторов [9] и спроецировать структуру LukED на токсин *S. aureus* HlgAB [6, 10]. Данная структура показывает сходства и раскрывает молекулярные особенности олигомеризации и формирования пор. Мутации CCR5, а также использование антагонистов CCR5 (маравирик, MVC, одобренный FDA ингибитор проникновения вируса ВИЧ-1), приводят к устойчивости к летальной инфекции, вызванной *S. aureus*. Следовательно, CCR5 является ключевым рецептором, приводящим к гибели клеток при инфекции *S. aureus*. CCL5, природный лиганд CCR5, также обладает способностью ингибировать взаимодействие LukE с CCR5.

Антагонисты CCR5, на поверхности бактериальных клеток ингибируют взаимодействие LukE с CCR5, тем самым ингибируют инфекцию патогенов, так как свойство патогена колонизировать и вторгаться в ткани хозяина зависит от его токсинов. Таким образом, вмешательство в действие патогена (антимикробная терапия) является эффективным способом профилактики или лечения бактериальных инфекций.

Целью данной работы было получение меченого GFP белка *LucE* в клетках штамма *E. coli* для изучения подавления порообразующего действия лейкотоксина *LucE*.

Материалы и методы

Ген *lukE* был синтезирован в компании MacroGen (Корея) и был представлен в составе вектора pTOP_Blunt_V2-lukE. Плазмида pGEM_T_Easy/GFPбфла использована для амплификации гена *gfp*. В качестве экспрессионного вектора использовали вектор pET28-c(+).

Создание генно-инженерных конструкций проводили с использованием ферментов нуклеинового обмена. Были использованы компетентные клетки штаммов *E. coli* DH5 α и BL21(DE3) для отбора сборки генно-инженерных конструкций и экспрессии генов, соответственно. Бактериальные штаммы *E. coli* культивировали в жидкой среде Лурия-Бертани с добавлением антибиотика канамицина.

При сборке генно-инженерных конструкций использовали реагенты производства ThermoScientific. В приготовлении буферных растворов и питательных сред использовали реагенты производства AppliChem, SigmaAldrich.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе ген *gfp* был клонирован в составе вектора pET-28c(+) по сайтам NdeI/VamHI.

Амплификацию гена *gfp* осуществляли методом полимеразной цепной реакции с использованием праймеров 5'-NdeI-*gfp* (5'-GGGAATTCATATGGTGAGCAAGGGC-3') и 3'-VamHI-GFPBud (5'-CGCGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'), обеспечивающих амплификацию гена с модифицированными концами, с сайтами под рестриктазы NdeI и VamHI. Результаты амплификации представлены на рисунке 1. Протяженность гена *gfp* составляет 737 нуклеотидов.

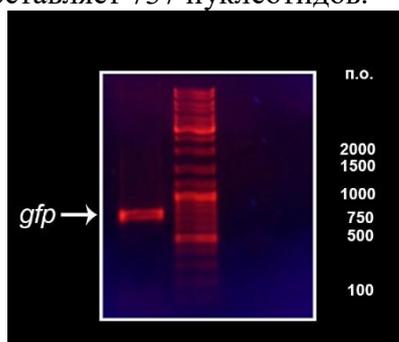


Рис. 1. Амплифицированный ген *gfp*

Полученный ПЦР-продукт был очищен от примесей с помощью хлороформной экстракции и подвергнут гидролитическому расщеплению рестриктазами NdeI и VamHI. Параллельно, данными эндонуклеазами рестрикции обрабатывали вектор pET-28c(+). Продукты очистили от примесей реакционной смеси и лигировали с помощью T4 ДНК-лигазы при +16°C, в течение 16 часов. Компетентные клетки DH5 α трансформировали лигазной смесью методом теплового шока. Отбор колоний-трансформантов проводили на 1,5% ЛБ-агаре с канамицином. ПЦР-скрининг проводили с использованием T7 праймеров. В результате был получен вектор pET-28c(+)/6His-GFP.

Амплификацию гена *lukE* с матричной ДНК рТОР_Blunt_V2-*lukE* осуществляли методом полимеразной цепной реакции с использованием праймеров EcoRI-LukEFm (5'-CGCGAATTCAATACTAATATTGAAAATATTG-3') и 3'-NotI-LukER (5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAATTATGTCSTTTCACTTTAATTTTC-3'). Полученный ПЦР продукт был очищен от примесей и был клонирован в составе вектора рЕТ-28с(+)/6His-*gfp* по сайтам EcoRI и NotI.

Отбор колоний-трансформантов проводили на 1,5% ЛБ-агаре с канамицином. ПЦР-скрининг проводили с использованием T7-праймеров. Расчетная длина общей вставки составляла 1841 п.о. На рисунке 2 представлены результаты ПЦР-скрининга.

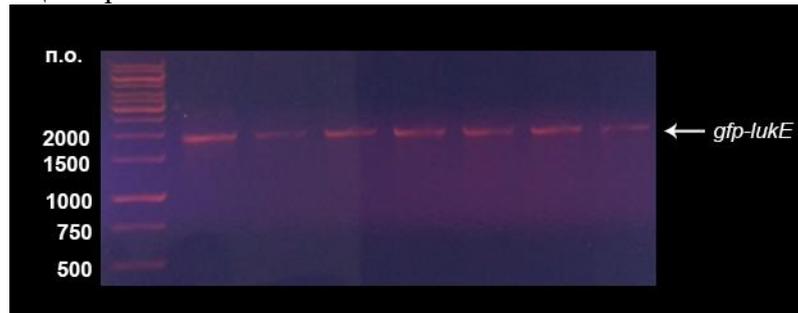


Рис. 2. Результаты ПЦР-скрининга

Как видно из рисунка – все исследуемые колонии содержали вставку в E7 регионе с требуемой протяженностью. Таким образом, была получена плазмида рЕТ28-с(+)/6His-GFP-*LukE*, плазмидная карта которой представлена на рисунке 3.

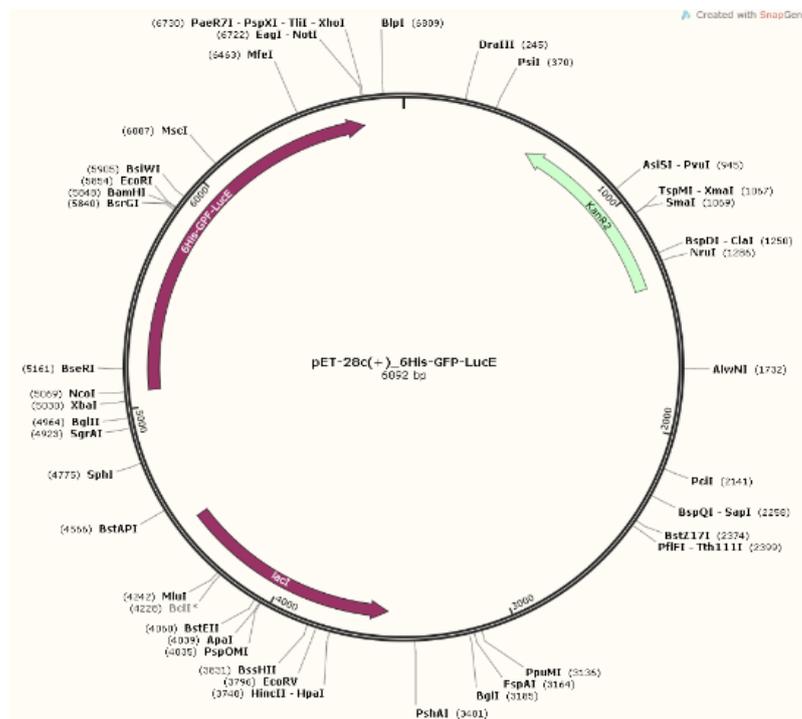


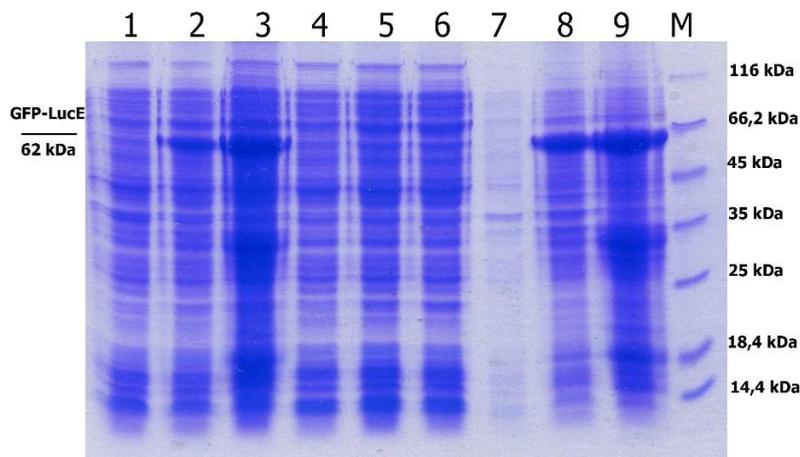
Рис. 3. Плазмидная карта вектора рЕТ-28с(+)/6His-GFP-*LucE*

В данном векторе, под контролем T7 промотора находится слитый с *gfp* ген *lukE*. Открытая рамка считывания содержит белок с расчетной массой 61,8кДа и содержащий гексагистидиновую метку.

Проверка экспрессии гена *lukE* в клетках штамма *Escherichia coli* BL21(DE3). С целью проверки степени накопления и локализации

рекомбинантного белка 6His-GFP-LucE в клетках *Escherichia coli* был проведен эксперимент по индукции данного белка. В качестве хозяйского штамма был выбран штамм BL21(DE3), характеризующийся высокой степенью накопления гетерологичного белка. Были приготовлены компетентные клетки штамма BL21(DE3), которые трансформировали вектором pET-28c(+)/6His-GFP-LucE методом электропорации. Затем трансформированную культуру высевали на твердую питательную среду с канамицином для селекции и выдерживали в течение 16 часов в суховоздушном термостате при температуре +37°C.

Единичную колонию вносили в 5 мл ЛБ-бульона с канамицином (50 мкг/мл) и растили при +37°C, 180 rpm, в шейкере в течение ночи (18 часов). Далее, 100 мкл ночной культуры вносили в 5 мл свежего ЛБ-бульона с канамицином и растили при тех же условиях в течение 4 часов. Затем, 500 мл ЛБ-бульона с канамицином и глюкозой (0,2%) инокулировали и растили до достижения оптической плотности $OD_{600}=0,6$. Собирали клетки центрифугированием (+4°C, 6000×g, 7 минут). Клетки суспендировали в свежем ЛБ-бульоне с канамицином и ИПТГ (0,5 мМ), продолжали инкубацию с ИПТГ (+37°C, 140 rpm) в течение ночи. Клетки собирали центрифугированием (+4°C, 6000×g, 7 минут) и суспендировали в буфере (20 мМ NaCl, 20 мМ HEPES-KOH pH 7.4). Клеточную массу лизировали ультразвуком, лизат разделяли на фракции путем центрифугирования (+4°C, 13000×g, 30 минут). Накопление белка 6His-GFP-LucE во фракциях анализировали электрофорезом (рисунок 4).



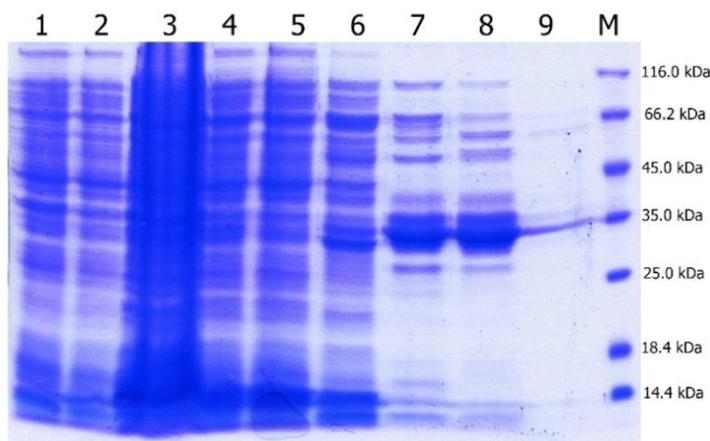
1-3 – полные экстракты; 4-6 – супернатант; 7-9 – осадок; 1,4,7 – неиндуцированная культура; 2,5,8 – 2 часа индукции ИПТГ; 3,6,9 – 16 часов индукции ИПТГ; М – белковый маркер.

Рис. 4. Проверка уровня накопления белка 6His-GFP-LucE в клетках BL21(DE3)

В результате установлено, что идет линейное накопление рекомбинантного белка 6His-GFP-LucE в клетках штамма BL21(DE3) при индукции ИПТГ.

Облучение водорастворимой фракции и осадка ультрафиолетовым светом на длине волны 312 нм показало, что флуоресцентный белок присутствует и в осадке, но и в водорастворимой фракции, хоть и в крайне незначительном количестве. С целью проверки присутствия белка 6His-GFP-LucE в водорастворимой фракции была проведена его очистка. Был приготовлен лизат клеток из 500 мл индуцированной в течение 18 часов культуры. Клетки суспендировали в 7 мл буфера (20 мМ NaCl, 20 мМ HEPES-KOH pH 7.4). Лизис проводили ферментативным способом с помощью яичной мурамидазы в концентрации 2 мг/мл при комнатной температуре в течение 30 минут. Лизат дополнительно обработали ультразвуком в импульсном режиме в течение 10 минут. Лизат центрифугировали (+4°C, 40000×g, 60 минут) и фильтровали через 0,22 мкм. Осветленный лизат наносили на колонку с Ni-NTA предварительно

уравновешанную буфером (20 мМ Hepes-KOH pH 7,4, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола). Визуально было хорошо видно, что колонка постепенно приобрела ярко зеленый цвет, характерный для флуоресцентного белка GFP. Колонку последовательно промыли буферами (20 мМ Hepes-KOH pH 7,4, 500 мМ NaCl, 20-300 мМ имидазола) с градиентом по имидазолу, элюаты собирали и анализировали электрофорезом (рисунок 5).

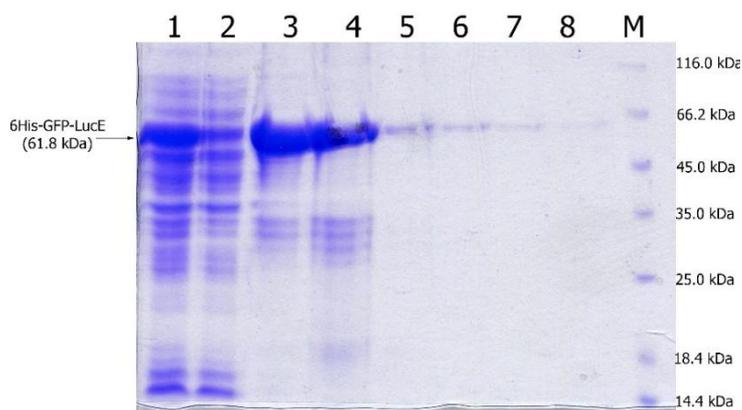


1 - полный лизат неиндуцированной культуры; 2 – осветленный лизат неиндуцированной культуры; 3 – полный лизат индуцированной культуры; 4 - осветленный лизат индуцированной культуры; 5 – flowthrough; 6 – элюат с 20 мМ Имидазола; 7 – элюат с 50 мМ Имидазола; 8 – элюат с 100 мМ Имидазола; 9 – элюат с 200 мМ Имидазола; М – белковый маркер.

Рис. 5. Очистка белка GFP-LukE на Ni-NTA из водорастворимой фракции

Как видно из рисунка 5, в элюате установлен белок с молекулярной массой менее 35 кДа, что более чем на 26 кДа меньше расчетной массы 6His-GFP-LucE и больше соответствует белку GFP, расчетная масса которого вместе с 6His-tag составляет 29,1 кДа. Вполне возможно, что вследствие протеолиза 6His-GFP-LucE белка образуется деградированный вариант, содержащий 6His-GFP фрагмент исходного белка, который и обеспечивает флуоресцентное свечение.

Из рисунка 4 следует, что большая часть рекомбинантного белка 6His-GFP-LukE агрегирует в тельца включения и скапливается в осадке в форме водонерастворимой фракции. Была проведена очистка белка GFP-LukE из телец включения с помощью мочевины. Известно, что мочевина позволяет растворять гидрофобные белки и создавая градиент концентрации мочевины можно растворить и элюировать белки из водонерастворимого лизата. В ходе эксперимента установлено, что при концентрации мочевины 5М из телец включения полностью вымывается деградированный вариант белка, а при 8 М мочевины элюирует полноценный вариант белка 6His-GFP-LucE. Растворенный в 8 М мочевины образец наносили на колонку с сорбентом Ni-NTA предварительно уравновешанную загрузочным буфером (50 мМ Tris-HCl pH7,4, 500 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 1мМ 2β-меркаптоэтанол, 8 М мочевины, 20 мМ имидазола). Как и в предыдущем случае визуально было хорошо видно, что колонка приобрела ярко зеленый цвет. Затем, колонку последовательно промыли буферами: 50 мМ Tris-HCl pH7,4, 500 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 1мМ 2β-меркаптоэтанол, 8 М мочевины, с градиентом по имидазолу (20-500 мМ), элюаты собирали и анализировали электрофорезом (рисунок 6).



1 – загрузка в колонку; 2 – фракция после колонки; 3 – элюат с 20 мМ имидазола; 4 – элюат с 50 мМ имидазола; 5 – элюат с 100 мМ имидазола; 6 – элюат с 200 мМ имидазола; 7 – элюат с 300 мМ имидазола; 8 – элюат с 500 мМ имидазола; М – белковый маркер.

Рис. 6. Очистка белка 6His-GFP-LucE на Ni-NTA из водонерастворимой фракции

Из рисунка 6 видно, что целевой белок элюировал при достаточно низкой концентрации имидазола: 20 и 50 мМ, что можно объяснить нарушением третичной структуры 6His-GFP-LucE денатурирующими свойствами высокомолярной мочевины.

Очищенный белок 6His-GFP-LucE подвергли диализу для удаления мочевины из буфера. Использовался диализный мешок с порогом отсечения 14 кДа и серия буферов следующего состава в 50 мМ фосфатном буфере с pH 7.5, 5% сахарозы, 5% глицерина, 1 мМ EDTA, 150 мМ NaCl с шагом мочевины: 7,5; 7,0; 6,5; 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,6; 3,3; 3,0; 2,7; 2,4; 2,1; 1,8; 1,6; 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0. Диализ проводили при +4°C. В результате установлено, что рефолдинг белка успешно проходит до достижения концентрации 1,2 М мочевины, но при уменьшении мочевины до концентрации 1,0 М белок агрегирует и выпадает в водонерастворимый осадок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, была получена конструкция pET28-c(+)/6His-GFP-LucE, содержащая ген LukE сшитый с геном *gfp* и гистидиновой меткой с N-конца. Проверка экспрессии целевого белка LukE в клетках штамма *E.coli* BL21(DE3) показала накопление рекомбинантного белка 6His-GFP-LucE, основная часть которого выпадает в тельца включения. При очистке белка 6His-GFP-LucE из телец включения было установлено, что белок элюировал при низкой концентрации имидазола 20 и 50 мМ, отмечался рефолдинг белка при концентрации мочевины 1,2 М.

Финансирование

Данное исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках грантового проекта № AP05134810.

ЛИТЕРАТУРА

1. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. – Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. - 2019. at www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-threats.html. <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>.
2. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. - 2014. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>
3. Bassetti M., Poulakou G., Ruppe E. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach // Intensive Care Med. - 2017.- Vol. 43, № 10. -P.1464-1475. <http://doi: 10.1007/s00134--4878-x>.
4. Sommer M.O.A, Munck C., Toft-Kehler R.V., Andersson DI. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? // Nat Rev Microbiol. - 2017. - Vol.15. - №11. - P.689-696. <http://doi: 10.1038/nrmicro.2017.75>.
5. Das S., Dasgupta A., Chopra S. Drug repurposing: a new front in the war against *Staphylococcus aureus* // Future Microbiol. - 2016. - Vol. 11. - P.1091-1099.
6. Alonzo F 3rd, Kozhaya L., Rawlings S.A., Reyes-Robles T, DuMont A.L., Myszka D.G., Landau N.R., Unutmaz D., Torres V.J. CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED // Nature. - 2013. - Vol. 493. - P.51-55.
7. Reyes-Robles T., Alonzo F 3rd, Kozhaya L., Lacy D.B., Unutmaz D., Torres V.J. *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection //Cell Host Microbe. - 2013. - Vol. 14.- P.453-459.
8. Nocadello S., Minasov G., Shuvalova L., Dubrovskaya I., Sabini E., Bagnoli F., Grandi G., Anderson WF. Crystal structures of the components of the *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED // Acta Crystallogr D Struct Biol. - 2016. - Vol. 72. - P.113-120.
9. Tam K., Schultz M., Reyes-Robles T., Vanwalscappel B., Horton J., Alonzo F 3rd, Wu B., Landau N.R., Torres V.J. *Staphylococcus aureus* Leukocidin LukED and HIV-1 gp120 Target Different Sequence Determinants on CCR5 // MBio. - 2016. - Vol.7, №6. - P. :e02024-16.
10. Badarau A., Trstenjak N., Nagy E. Structure and Function of the Two-Component Cytotoxins of *Staphylococcus aureus* - Learnings for Designing Novel Therapeutics // AdvExp Med Biol. – 2017. https://doi: 10.1007/5584_2016_200.
11. Secchi M., Grampa V., Vangelista L. Rational CCL5 mutagenesis integration in a lactobacilli platform generates HIV-1 blockers of unprecedented activity //Sci. Rep. - 2018. - Vol. 8. - №1. - P.1890.
12. Vangelista L., Longhi R., Sironi F., Pavone V., Lusso P. Critical role of the N-loop and beta1-strand hydrophobic clusters of RANTES-derived peptides in anti-HIV activity // BiochemBiophys Res Commun. - 2006. - Vol. 351. - P.664-668.
13. Vangelista L., Secchi M., Lusso P. Rational design of novel HIV-1 entry inhibitors by RANTES engineering // Vaccine. - 2008. - Vol. 26. - P. 3008-15.
14. Nisius L., Rogowski M., Vangelista L., Grzesiek S. Large-scale expression and purification of the major HIV-1 coreceptor CCR5 and characterization of its interaction with RANTES // Protein Expr Purif. - 2008. - Vol. 61. - P.155-162.
15. Secchi M., Xu Q., Lusso P., Vangelista L. The superior folding of a RANTES analogue expressed in lactobacilli as compared to mammalian cells reveals a promising system to screen new RANTES mutants // Protein Expr Purif. - 2009. - Vol. 68. - P.34-41.
16. Vangelista L., Secchi M., Liu X., Bachi A., Jia L., Xu Q., Lusso P. Engineering of *Lactobacillus jensenii* to secrete RANTES and a CCR5 antagonist analogue as live HIV-1 blockers // Antimicrob Agents Chemother. - 2010.- Vol.54. - P.2994-3001.

17. Lusso P., Vangelista L., Cimbro R., Secchi M., Sironi F., Longhi R., Faiella M., Maglio O., Pavone V. Molecular engineering of RANTES peptide mimetics with potent anti-HIV-1 activity // *FASEB J.* - 2011. - Vol. 25. - P.1230-43.
18. Secchi M., Longhi R., Vassena L., Sironi F., Grzesiek S., Lusso P., Vangelista L. Enhancement of anti-HIV-1 activity by hot spot evolution of RANTES-derived peptides // *Chem Biol.* - 2012. - Vol. 19. - P.1579-88.
19. Secchi M., Vassena L., Morin S., Schols D., Vangelista L. Combination of the CCL5-derived peptide R4.0 with different HIV-1 blockers reveals wide target compatibility and synergic cobinding to CCR5 // *Antimicrob Agents Chemother.* - 2014. - Vol. 58. - P.15-23.

REFERENCES

1. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. – Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. - 2019. at www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-threats.html. <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>.
2. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. - 2014. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>
3. Bassetti M., Poulakou G., Ruppe E. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. *Intensive Care Med.*, 2017, vol. 43, no. 10, pp.1464-1475. <http://doi: 10.1007/s00134--4878-x>.
4. Sommer M.O.A, Munck C., Toft-Kehler R.V., Andersson DI. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nat Rev Microbiol.*, 2017, vol.15, no.11, pp.689-696. <https://doi: 10.1038/nrmicro.2017.75>.
5. Das S., Dasgupta A., Chopra S. Drug repurposing: a new front in the war against *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.*, 2016, vol. 11, pp.1091-1099.
6. Alonzo F., Kozhaya L., Rawlings S.A., Reyes-Robles T, DuMont A.L., Myszka D.G., Landau N.R., Unutmaz D., Torres V.J. CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Nature*, 2013, vol. 493, pp.51-55.
7. Reyes-Robles T., Alonzo F 3rd, Kozhaya L., Lacy D.B., Unutmaz D., Torres V.J. *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection. *Cell Host Microbe*, 2013, vol. 14, pp.453-459.
8. Nocadello S., Minasov G., Shuvalova L., Dubrovskaya I., Sabini E., Bagnoli F., Grandi G., Anderson WF. Crystal structures of the components of the *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Acta Crystallogr D Struct Biol.*, 2016, vol. 72, pp.113-120.
9. Tam K., Schultz M., Reyes-Robles T., Vanwalscappel B., Horton J., Alonzo F 3rd, Wu B., Landau N.R., Torres V.J. *Staphylococcus aureus* Leukocidin LukED and HIV-1 gp120 Target Different Sequence Determinants on CCR5. *MBio.*, 2016, vol.7, no.6, pp. e02024-16.
10. Badarau A., Trstenjak N., Nagy E. Structure and Function of the Two-Component Cytotoxins of *Staphylococcus aureus* - Learnings for Designing Novel Therapeutics. *AdvExp Med Biol.*, 2017, vol. 966, pp.15-35. https://doi: 10.1007/5584_2016_200.
11. Secchi M., Grampa V., Vangelista L. Rational CCL5 mutagenesis integration in a lactobacilli platform generates HIV-1 blockers of unprecedented activity. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no.1, pp.1890.
12. Vangelista L., Longhi R., Sironi F., Pavone V., Lusso P. Critical role of the N-loop and beta1-strand hydrophobic clusters of RANTES-derived peptides in anti-HIV activity. *BiochemBiophys Res Commun.*, 2006, vol. 351, pp.664-668.

13. Vangelista L., Secchi M., Lusso P. Rational design of novel HIV-1 entry inhibitors by RANTES engineering. *Vaccine.*, 2008, vol. 26, pp. 3008-15.
14. Nisius L., Rogowski M., Vangelista L., Grzesiek S. Large-scale expression and purification of the major HIV-1 coreceptor CCR5 and characterization of its interaction with RANTES. *Protein Expr Purif.*, 2008, vol. 61, pp.155-162.
15. Secchi M., Xu Q., Lusso P., Vangelista L. The superior folding of a RANTES analogue expressed in lactobacilli as compared to mammalian cells reveals a promising system to screen new RANTES mutants. *Protein Expr Purif.*, 2009, vol. 68, pp.34-41.
16. Vangelista L., Secchi M., Liu X., Bachi A., Jia L., Xu Q., Lusso P. Engineering of *Lactobacillus jensenii* to secrete RANTES and a CCR5 antagonist analogue as live HIV-1 blockers. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2010, vol.54, pp.2994-3001.
17. Lusso P., Vangelista L., Cimbri R., Secchi M., Sironi F., Longhi R., Faiella M., Maglio O., Pavone V. Molecular engineering of RANTES peptide mimetics with potent anti-HIV-1 activity. *FASEB J.*, 2011, vol. 25, pp.1230-43.
18. Secchi M., Longhi R., Vassena L., Sironi F., Grzesiek S., Lusso P., Vangelista L. Enhancement of anti-HIV-1 activity by hot spot evolution of RANTES-derived peptides. *Chem Biol.*, 2012, vol. 19, pp.1579-88.
19. Secchi M., Vassena L., Morin S., Schols D., Vangelista L. Combination of the CCL5-derived peptide R4.0 with different HIV-1 blockers reveals wide target compatibility and synergic cobinding to CCR5. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2014, vol. 58, pp.15-23.

ESCHERICHIA COLI BL21(DE3) ШТАММЫНДАҒЫ LUKE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ГЕНІН ЭКСПРЕССИЯЛАУ

* Абитаева Г.К. ^{1,2}, Буланин Д. ¹, Марченко Е.В. ¹, Вангелиста Л. ¹

¹ Nazarbayev University School of Medicine

ул. Керей, Жәнібек хандар 5/1, Нұр-Сұлтан, 020000, Қазақстан

² ҚР БҒМ ҒК «Республикалық микроорганизмдер коллекциясы» РМК,

Ш. Уалиханов көш., 13/1, Нұр-Сұлтан, 010000, Қазақстан

* g.abitayeva@rcm.kz

ТҮЙІН

Екі компонентті лейкотоксиндер *Staphylococcus aureus* вируленттілігінің маңызды факторлары болып табылады. *S. aureus* лейкотоксиндерін зерттеуге күш салғанына қарамастан, инфекция кезінде осы токсиндердің тікелей әсер ету механизмі анықталмаған. Дегенмен, LukED делециясы *S. aureus* жоғары вирулентті штамдарын едәуір әлсірететінін байқау LukE/D селективті ингибирлеу *S. aureus* инфекциясымен күресудің жаңа аспектілерін дамытуда пайдалы болуы мүмкін деген болжамды растайды. Осы мақсатта *E. coli* жасушаларында LukE ақуызының экспрессиясын тексеру және рекомбинантты түрін алу жұмыстары жүргізілді.

LukE гені gfp гені бар pET28-с (+) / GFP векторының құрамында клондалды. *E. coli* BL21 (DE3) штаммының жасушаларында гексагистидин белгісі бар екі біріктірілген генінің экспрессиясы жасалды. bhis-GFP-LucE ақуызы қосылыс денешіктерінде жинақталатыны анықталды. bhis-GFP-LucE қосылыс денелерінен жоғары молярлы мочевиная көмегімен жуылды. Ақуыз металл-аффинді хроматография әдісі арқылы тазартылды. Зерттеу



нәтижелері рекомбинантты LukE ақуызын, соның ішінде токсин белсенділігін тежеу стратегиясын алу үшін қолданылуы мүмкін.

Негізгі сөздер: LukE, GFP, экспрессия, рекомбинантты ақуыз, *E. coli*.

EXPRESSION OF THE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* LUKE GENE IN THE *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3) STRAIN

*Abitayeva G.K.^{1,2}, Bulanin D¹., Marchenko E.V.¹, Vangelista L.¹

¹Nazarbayev University, School of Medicine

Kerey, Zhanibek Handar st. 5/1, Nur-Sultan, 020000, Kazakhstan

²Republican collection of microorganisms,

13/1, Sh. Ualikhanov str., Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan

*g.abitayeva@rcm.kz

ABSTRACT

Two-component leukotoxins are important virulence factors for *Staphylococcus aureus*. Despite efforts made to study *S. aureus* leukotoxins, the direct mechanism of action of these toxins during infection has not been determined. However, the observation that deletion of LukED significantly attenuates highly virulent *S. aureus* strains supports the hypothesis that selective inhibition of LukE / D may be useful in the development of new aspects of *S. aureus* infection control. For this purpose, this work was carried out to test the expression and obtain a recombinant form of the LukE protein in *E.coli* cells. The LukE gene was cloned into the pET28-c (+) / GFP vector containing the gfp gene. Two fused genes carrying a hexahistidine tag were expressed in cells of the *E. coli* BL21(DE3) strain. It was found that the 6His-GFP-LucE protein aggregates in inclusion bodies. 6His-GFP-LucE was washed out of inclusion bodies with high molar urea. The 6His-GFP-LucE protein was purified by metal affinity chromatography. Research results can be applied to obtain recombinant protein including strategies for inhibition of toxin activity.

Key words: LukE, GFP, expression, recombinant protein, *E. coli*.