



УДК 539.14.43:577.18:579.264:577.322.4

ВЫДЕЛЕНИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА АНТИБИОТИКА ЛОЛОАТИНА А

© 2002 г. С. А. Крачковский***, А. Г. Соболев**, Т. В. Овчинникова*, А. А. Тагаев*,
З. А. Якименко*, Р. Р. Азизбеян***, Н. И. Кузнецова***,
Т. Н. Шамшина***, А. С. Арсеньев*

* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

** Московский физико-технический институт, Долгопрудный Московской обл.;

*** Государственный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Поступила в редакцию 27.07.2001 г. Принята к печати 14.08.2001 г.

Из штамма IGM52 грамположительных спорообразующих бактерий *Brevibacillus laterosporus* выделен пептидный антибиотик, обладающий цианолитической активностью. Методом ¹H-ЯМР-спектроскопии показано, что по химической структуре выделенный антибиотик идентичен лолоатину А – циклическому декапептиду cyclo(-Asn-Asp-Tyr-Val-Orn-Leu-DTyr-Pro-Phe-DPhe-). Определена пространственная структура лолоатина А в растворе.

Ключевые слова: пептидный антибиотик; циклопептид; лолоатин; ЯМР.

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость к антибиотикам становится глобальной проблемой. Ряд заболеваний, возбудители которых метициллинрезистентные стафилококки, ванкомицинрезистентные энтерококки, стрептококки, псевдомонады, кишечная палочка и т.д., практически не поддаются лечению [1]. В связи с этим всевозрастающий интерес проявляется к пептидам бактериального происхождения с широким спектром антибиотического действия, анализ физико-химических, структурных и функциональных свойств которых может послужить основанием для создания новых эффективных препаратов.

Настоящая работа посвящена выделению, изучению биологических свойств и установлению пространственной структуры пептидного антибиотика, синтезируемого штаммом *Brevibacillus laterosporus* IGM52 и обладающего активностью против цианобактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм IGM52, вызывающий лизис цианобактерий, был выделен в ГосНИИгенетика. По морфологическим и биохимическим характеристикам по Берджи [2] он был идентифицирован как

Автор для переписки (тел.: (095) 330-74-83; эл. почта: sobol@nmr.ru).

штамм грамположительных спорообразующих бактерий *B. laterosporus*.

Антибактериальная активность штамма IGM52 проявлялась при внесении культуральной жидкости (КЖ) в суспензию клеток цианобактерий и контролировалась измерением оптического поглощения инкубационной смеси (см. “Эксперимент. часть”). Существенное снижение оптического поглощения наблюдалось уже через 24 ч (табл. 1). Было установлено, что основная цианолитическая активность штамма IGM52 локализована в осадке после центрифугирования культуральной жидкости.

Индивидуальный антибактериальный пептид, определяющий цианолитическую активность штамма IGM52, был выделен нами из осадка культуральной жидкости спиртовой экстракцией и последовательной ВЭЖХ на двух колонках. Методом ¹H-ЯМР-спектроскопии было установлено, что он идентичен запатентованному антибиотiku лолоатину А [3].

На основании анализа ЯМР-спектров COSY, TOCSY и ROESY при помощи стандартной процедуры [4] проведено полное отнесение сигналов протонов исследуемого образца (табл. 2), которое соответствует аминокислотной последовательности cyclo(-Asn-Asp-Tyr-Val-Orn-Leu-DTyr-Pro-Phe-DPhe-). При масс-спектрометрическом анализе выделенного пептида был обнаружен пик с *m/z* 1273.5, соответствующий молекулярному иону лолоатина А.

Таблица 1. Цианолитическая активность ($A_{\text{ост}}$ (%) после 24 ч инкубации) культуральной жидкости (КЖ) штамма IGM52 и образцов лолоатина А на разных стадиях очистки

Образец	Цианобактерии	
	<i>Nostoc</i>	<i>Anabaena</i>
КЖ	24.88	27.25
Супернатант после центрифугирования КЖ	97.57	89.83
Осадок (H ₂ O)*	28.10	29.02
Спиртовой экстракт осадка**	22.87	23.14
Лолоатин А***	20.91	21.11
Контроль	114.28	115.62

* Цианолитическую активность определяли после ресуспендирования осадка в объеме H₂O, равном исходному объему КЖ.

** Цианолитическую активность определяли после растворения кристаллов в объеме 5% этанола, равном исходному объему КЖ.

*** Объединенная фракция после последовательной ВЭЖХ на двух колонках растворена в объеме 5% этанола, равном исходному объему КЖ.

В спектрах ¹H-ЯМР были измерены константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) vicинальных протонов H-NC^α-H и H-C^αC^β-H и коэффициенты температурной зависимости химических сдвигов сигналов протонов NH ($\Delta\delta/\Delta T$, табл. 2).

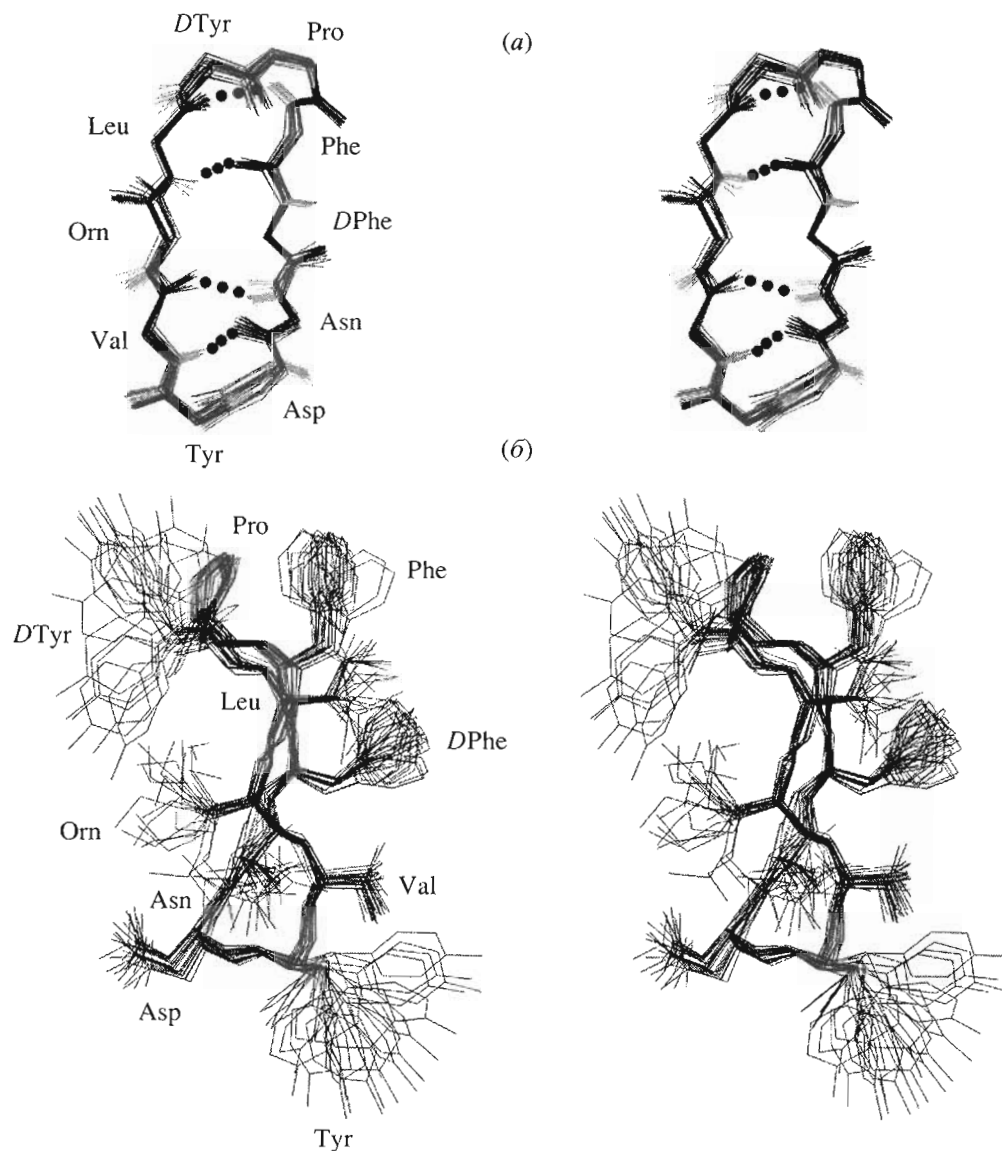
Для расчета пространственной структуры лолоатина А по данным спектроскопии ¹H-ЯМР использовались 78 ограничений сверху на межпротонные расстояния, полученных из анализа интенсивностей кросс-пиков в спектре ROESY. Амидные протоны, участвующие в образовании внутримолекулярных водородных связей (ВМВС), определяли на основании величин $\Delta\delta/\Delta T$ протонов NH. Малые значения $\Delta\delta/\Delta T$ амидных протонов трех остатков Val, Leu и Phe свидетельствуют об их участии в ВМВС. Акцепторы ВМВС были определены в процессе расчета пространственной структуры и, аналогично работе [5], введены дополнительные ограничения на расстояния $d(O,N)$, $d(O,H^N)$, $d(C,N)$ и $d(C,H^N)$, учитывающие образование ВМВС HN(Val)⋯CO(Asn), HN(Leu)⋯CO(Phe) и HN(Phe)⋯CO(Leu). При расчете пространственной структуры (см. ниже) было выявлено, что пространственное расположение атомов H^N, N^α

Таблица 2. Химические сдвиги сигналов протонов, КССВ $^3J_{\text{HN}, \text{H}^\alpha}$ и $^3J_{\text{H}^\alpha, \text{H}^\beta}$ (30°C) и температурные коэффициенты химических сдвигов сигналов протонов NH ($\Delta\delta/\Delta T$) лолоатина А в метаноле-*d*₃ (pH 8.4, 5–45°C)

Остаток аминокислоты	δ , м. д. (± 0.1)						$^3J_{\text{HN}, \text{H}^\alpha}$	$^3J_{\text{H}^\alpha, \text{H}^\beta}$	$\Delta\delta/\Delta T \times 10^{-3}$, м. д./°C
	H ^N	H ^α	H ^{β*}	H ^γ	H ^δ	H ^ε			
Asn	9.45	4.84	3.31		7.26		7.9	10.1	4.0
			3.51		8.14			5.8	
Asp	8.53	4.52	2.61				3.4	3.7	5.4
			2.32					10.5	
Tyr	8.77	4.74	3.24**		7.07	6.71	9.4		5.1
Val	8.01	4.90	2.35	1.26**			9.1	2.5	1.4
Orn	9.10	5.63	2.26	1.94**	3.05**		9.1	6.7	6.9
			2.09					6.7	
Leu	8.66	4.96	1.84	1.82	1.24**		9.4		0.6
			1.62						
DТyr	9.37	4.54	3.18**		7.19	6.85	<4		7.7
Pro		4.34	1.65	1.25	3.51				
			1.53	0.63	2.42				
Phe	7.70	4.72	2.61		7.31	7.38	8.7	2.6	2.6
			2.45					6.2	
DPhe	8.89	5.99	3.41		7.37	7.47	10.2	2.6	6.3
			3.02					10.5	

* Выделенное жирным шрифтом значение химического сдвига сигнала соответствует протону H^{β3}.

** Если для двух протонов метиленовой группы или двух метильных групп указано одно значение химического сдвига, то соответствующие сигналы вырождены в спектре.



Стереοизображение суперпозиции 24 структур лолоатина А: (а) показаны тяжелые атомы основной цепи и протоны NH, связи NH выделены серым цветом, водородные связи обозначены тремя точками; (б) показаны все тяжелые атомы.

остатка Asn и C, O остатка Val благоприятствует образованию ВМВС $\text{HN(Asn)}\cdots\text{CO(Val)}$. Промежуточное значение $\Delta\delta/\Delta T$ протона NH остатка Asp также указывает на его участие в ВМВС. Поэтому при расчете финального набора пространственных структур были добавлены ограничения на эту ВМВС.

Анализ ${}^3J_{\text{HN}, \text{H}^\alpha}$ и ${}^3J_{\text{H}^\alpha, \text{H}^\beta}$ (табл. 2) позволил ввести девять ограничений на торсионные углы φ и шесть ограничений на углы χ^1 . Значения ${}^3J_{\text{H}^\alpha, \text{H}^\beta}$ остатков Asp и DPhe в совокупности с ЯЭО-контактами однозначно определяют углы χ^1 для этих остатков как -60 и 60° соответственно. ${}^3J_{\text{H}^\alpha, \text{H}^\beta}$ ос-

татка Val свидетельствует о двух возможных значениях угла χ^1 : 60 и/или -60° . Анализ величин ${}^3J_{\text{H}^\alpha, \text{H}^\beta}$ и ЯЭО остатков Asn и Phe дает стереоспецифическое отнесение β -протонов этих остатков и выделяет по два приблизительно равнонаселенных ротамера угла χ^1 (для Asn $\chi^1 - 60; 180^\circ$ и для Phe $\chi^1 \pm 60^\circ$).

Расчет пространственной структуры лолоатина А проводили при помощи программы DYANA-1.5 [6]. Для учета цикличности пептида вводились жесткие ограничения на расстояния $d(\text{C}^\alpha\text{C})$, $d(\text{NC})$, $d(\text{NO})$, $d(\text{NC}^\alpha)$, удовлетворяющие соответствующим параметрам для ковалентной пептидной связи между атомами основной цепи N(Asn) и C(DPhe). На рисунке показана суперпозиция 24

структур лолоатина А с наименьшими штрафными функциями (среднеквадратичные отклонения (RMSD) положений атомов по набору 24 структур для атомов основной цепи и для всех тяжелых атомов равны 0.44 ± 0.18 и 1.88 ± 0.32 Å соответственно). В данных структурах ни одно ограничение не нарушается больше чем на 5° для углов, на 0.2 Å для расстояний и на 0.1 Å для радиусов Ван-дер-Ваальса.

Лолоатин А стабилизирован четырьмя внутримолекулярными водородными связями NH(Asn)⋯CO(Val), NH(Val)⋯CO(Asn), NH(Leu)⋯CO(Phe) и NH(Phe)⋯CO(Leu). Боковые цепи остатков Orn и DTrp находятся по одну сторону от плоскости, образованной основной цепью пептида, а гидрофобные боковые цепи остатков Trp, Val, Leu, Phe и DPhe – по другую сторону, боковые цепи остатков Asn и Asp лежат в плоскости основной цепи молекулы. Боковые цепи остатков Trp, Orn и DTrp свободно вращаются вокруг связи C^α–C^β, в то время как для боковых цепей остальных остатков существуют определенные наиболее выгодные конформации.

Интересно отметить, что в условиях эксперимента (30°C, pH 8.4) сигналы амидных протонов остатков Orn, Leu и DTrp были уширены по сравнению с сигналами амидных протонов остальных остатков. При варьировании температуры в диапазоне от 5 до 45°C или четырехкратном понижении концентрации пептида не наблюдалось изменения ширины данных сигналов. Сужение сигналов происходило при подкислении раствора муравьиной кислотой до pH 2. Анализ pH-зависимости химических сдвигов сигналов амидных протонов лолоатина А в диапазоне pH 2–8.4 (данные не приведены) показал, что это сужение вызвано протонированием γ-карбоксылной группы остатка Asp. По-видимому, уширение сигналов указанных протонов связано с кулоновским взаимодействием ε-аминогруппы остатка Orn с карбоксылной группой остатка Asp.

По своему химическому и пространственному строению лолоатин А очень похож на лолоатин В [7], а также на другие антибиотики тироцидиновой группы (тироцидины А, В, С и грамицидин S) [8]. Однако возможное при физиологических значениях pH взаимодействие ε-аминогруппы остатка Orn с карбоксылной группой остатка Asp может вызвать деформацию плоскости циклопептида и в свою очередь повлиять на распределение зарядов и гидрофобных боковых цепей на поверхности молекулы. Перечисленные особенности строения, по-видимому, и определяют отличие лолоатина А по биологической активности от других антибиотиков тироцидиновой группы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Определение антибактериальной активности.

Антибактериальная активность штамма IGM52 проявлялась при внесении культуральной жидкости (КЖ) в суспензию клеток цианобактерий. Штамм цианобактерий *Nostoc ssp.* 29411 получен из коллекции ИМЕТ, Иена, ФРГ, *Anabaena ssp.* 5781 из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Штаммы цианобактерий *Nostoc* и *Anabaena* культивировали в течение 2 недель при 25°C в среде BG-11 [9] при круглосуточном освещении. К 2.5 мл суспензии культуры цианобактерий (A_{590} 1.0) добавляли 0.5 мл испытуемого образца антибиотика и измеряли оптическое поглощение при 590 нм в нулевой момент времени (A_{590}^0). В контрольных опытах к суспензии цианобактерий добавляли 0.5 мл 5% этанола. Инкубационную смесь выдерживали при 25°C и круглосуточном освещении, измеряя оптическое поглощение (A_{590}^t) через 2, 24 и 72 ч инкубации. Цианолитическую активность (%) оценивали по падению оптического поглощения инкубационной смеси в испытуемый момент времени и рассчитывали по формуле:

$$A_{\text{ост}} = A_{590}^t / A_{590}^0 \times 100.$$

Выделение и очистка лолоатина А. Штамм IGM52 (ГосНИИгенетика) культивировали в жидкой питательной среде NBY [10] 72 ч при 30°C на круговой качалке (260 об/мин). КЖ центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин, полученную надосадочную жидкость отбрасывали, а к осадку добавляли 10-кратный объем этанола. Спиртовую экстракцию антибиотика из осадка продолжали при встряхивании в течение 20 ч при комнатной температуре. Спиртовой экстракт центрифугировали 15 мин при 10000 g, осадок отбрасывали, раствор упаривали при 56°C до получения кристаллов. Для определения цианолитической активности полученные кристаллы растворяли в объеме 5% этанола, равном исходному объему КЖ. При выделении антибиотика методом спиртовой экстракции достигалась его очистка без потери цианолитической активности.

Дальнейшую очистку антибиотика проводили по следующей методике. 30 мг полученных кристаллов растворяли в 1 мл этанола. Раствор (по 10 мкл) фракционировали с помощью ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке Delta Pak C-18, 300 Å, 20 мкм (19 × 300 мм, Waters) при скорости потока 2 мл/мин в линейном градиенте (от 0 до 100%) раствора Б (метанол–ацетонитрил–вода, 75 : 22.5 : 2.5) в растворе А (метанол–ацетонитрил–вода, 60 : 5 : 35) за 100 мин и затем в растворе Б в течение 20 мин. Фракции, проявляющие антибактериальную активность, объединяли, упаривали досуха и растворяли в 1 мл этанола. Далее раствор (по 10 мкл) наносили на обращенно-фазовую ко-

лонку Vydas C-18, 300 Å, 5 мкм (4.6 × 250 мм, Vydas). Элюцию осуществляли при скорости потока 0.5 мл/мин в линейном градиенте (от 10 до 100%) раствора Б в растворе А (см. выше) за 60 мин и затем в растворе Б в течение 20 мин. Объединенную активную фракцию упаривали. Для определения цианолитической активности остаток растворяли в 5% этаноле в объеме, равном исходному объему КЖ.

Масс-спектрометрический анализ (MALDI) лолоатина А проводили на масс-спектрометре VISION 2000 (ThermoBioAnalysis, Великобритания). В качестве матрицы использовали 0.15 М 2,5-дигидроксibenзойную кислоту в смеси, содержащей 25% метанол и 0.1% трифторуксусную кислоту. Исследуемый образец облучали УФ-лазером с длиной волны 337 нм и максимальной энергией 250 мкДж в импульсном режиме с частотой 3 нс. Мощность лазера 63%, число лазерных ударов 25.

Спектры ¹H-ЯМР лолоатина А, растворенного в дейтерометаноле (1.7 мг/600 мкл, рН 8.4, 30°C, если специально не оговорено), получены на спектрометре Varian Unity 600 с рабочей частотой 600 МГц.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть работы, выполненная в ГосНИИгенетика, поддерживалась Министерством энергетики США.

Исследование структуры лолоатина А методом ЯМР поддерживалось Министерством науки и технологии Российской Федерации (проект № 96-03-08) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 00-04-55024).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Edmond M.B., Ober J.F., Weinbaum D.L., Pfaller M.A., Hwang T., Sanford M.D., Wenzel R.P. // *Clinical Infections Diseases*. 1995. V. 20. P. 1126–1133.
2. Claus D., Berkeley R.C.W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimor: Williams and Wilkins Company, 1984.
3. U.S. Patent № 5962407, 1999.
4. Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. New York: John Wiley Sons, 1986.
5. Jaravine V.A., Nolde D.E., Reibarkh M.J., Korolkova Y.V., Kozlov S.A., Pluzhnikov K.A., Grishin E.V., Arseniev A.S. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 1223–1232.
6. Guntert P., Mumenthaler C., Wüthrich K. // *Mol. Biol.* 1995. V. 273. P. 283–298.
7. Gerard J., Haden P., Kelly M.T., Andersen R.J. // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 7201–7204.
8. Kuo M.C., Gibbons W.A. // *Biophys J.* 1980. V. 32. P. 807–836.
9. Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Basire G. // *Bacteriol. Rev.* 1971. V. 35. P. 171–205.
10. Thorne C.B. // *J. Virol.* 1968. V. 2. P. 657–662.

Isolation, Biological Properties, and Spatial Structure of Antibiotic Loloatin A

S. A. Krachkovskii^{1,2}, A. G. Sobol'^{1, #}, T. V. Ovchinnikova¹, A. A. Tagaev¹, Z. A. Yakimenko¹, R. R. Azizbekyan³, N. I. Kuznetsova³, T. N. Shamshina³, and A. S. Arseniev¹

[#] Phone: +7 (095) 330-7483; e-mail: sobol@nmr.ru

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskii per. 9, Dolgoprudnyi, Moscow oblast, 141700 Russia

³ State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Pervyi Doroznyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia

Peptide antibiotic with cyanolytic activity was isolated from the IGM52 strain of the *Brevibacillus laterosporus* Gram-positive spore-forming bacteria. By ¹H NMR spectroscopy, this antibiotic was identified as loloatin A, a cyclic decapeptide cyclo(-Asn-Asp-Tyr-Val-Orn-Leu-DTyr-Pro-Phe-DPhe-). The spatial structure of loloatin A in solution was determined. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: cyclopeptide, loloatin, NMR, peptide antibiotic