

УДК 577.181, 579.61

Генетическое программирование дрожжей для создания рекомбинантных агентов биоконтроля

С. О. Пипия^{1*}, Н. З. Мирзоева¹, М. Н. Баранова¹, И. Е. Елисеев¹, Ю. А. Мокрушина^{1,2},
О. В. Шамова³, А. Г. Габибов^{1,2}, И. В. Смирнов^{1,4}, С. С. Терехов^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

³Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197022 Россия

⁴Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478 Россия

*E-mail: pipiyasofiya@ibch.ru

Поступила в редакцию 14.12.2022

Принята к печати 21.02.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11878

РЕФЕРАТ Бактериальные инфекции, возбудители которых обладают множественной лекарственной устойчивостью, представляют серьезную проблему современной медицины, поэтому поиск и создание новых антибиотиков считаются одной из важнейших задач здравоохранения. Особый интерес вызывают антибиотики на основе антимикробных пептидов (АМП) ввиду своей генетически-кодированной природы. Отдельным преимуществом большинства АМП является прямой механизм их действия, обусловленный мембранолитическими свойствами. Низкая скорость формирования антибиотикорезистентности, связанная с механизмом действия АМП, делает перспективными разработки в данной области. Рекомбинантные технологии позволяют получать генетически программируемые продуценты АМП для масштабной наработки рекомбинантных АМП (рАМП), а также направленного создания агентов биоконтроля. В данной работе метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* были генетически модифицированы для секретируемой продукции рАМП. Показано, что конститутивная экспрессия нуклеотидной последовательности, кодирующей зрелый АМП протегрин-1, позволяет получить штамм дрожжей, эффективно ингибирующий рост грамположительных и грамотрицательных бактерий-мишеней. Антимикробный эффект наблюдался также на уровне микрокультуры при коинкапсуляции дрожжевого продуцента и репортерной бактерии в каплях микрофлюидной двойной эмульсии. Полученные результаты показывают перспективность использования разработанной системы гетерологической продукции АМП для создания эффективных агентов биоконтроля, а также скрининга антимикробной активности с применением ультравысокопроизводительных технологий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антимикробные пептиды (АМП), дрожжи *Pichia pastoris*, гетерологическая экспрессия, протегрин-1 (PG-1), микрофлюидная компартиментализация, эмульсионное микрокультивирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АМП – антимикробные пептиды; рАМП – рекомбинантные антимикробные пептиды; АР – антибиотикорезистентность; ESKAPE – группа патогенов, в которую входят *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и виды рода *Enterobacter*; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; PG-1 – протегрин-1; rPG-1 – рекомбинантный протегрин-1; GAP – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; sfGFP – зеленый флуоресцентный белок суперфолдер; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; АОХ1 – алкогольоксидаза-1.

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотикорезистентность (АР) является серьезным вызовом для мирового здравоохранения. По некоторым оценкам в 2019 году инфекции, вызванные резистентными штаммами бактерий, унесли жизни 4.95 миллиона человек [1]. Растет

и число штаммов, приобретающих резистентность к антибиотикам, в том числе последней линии защиты. Однако количество одобренных к применению в клинике новых антибиотиков с каждым годом уменьшается, что не соответствует скорости распространения АР [2], и делает необходимым по-

иск альтернативных подходов к борьбе с инфекционными заболеваниями.

Мировым сообществом выделены и объединены в акроним ESKAPE наиболее приоритетные патогены, новые подходы к борьбе с которыми необходимо разрабатывать в первую очередь [3]. К ним относятся *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и виды рода *Enterobacter*. Антимикробные пептиды (АМП) способны особенно эффективно бороться с бактериальными инфекциями, вызванными антибиотикорезистентными представителями данной группы бактерий [4]. АМП вырабатываются широким спектром организмов и обладают антибактериальной, антифунгальной и иммуномодулирующей активностями [5]. Механизмы действия и молекулярные мишени АМП отличаются от мишеней низкомолекулярных антибиотиков. АМП зачастую нацелены на мембрану, они формируют поры в липидном бислое или влияют на процессы формирования клеточной стенки, так или иначе нарушая целостность бактериальных клеток, что приводит к гибели патогена [6]. Этот механизм действия определяет более низкий уровень возникновения резистентности к АМП [7, 8].

В настоящее время количество АМП, доступных для терапевтического применения, ограничено, однако, количество АМП, проходящих стадии доклинических и клинических испытаний, растет, что подтверждает перспективность развития данного направления [9, 10]. Стоимость производства АМП с помощью твердофазного синтеза может составлять 50–400 \$ за грамм продукта, что является экономически выгодным в основном для коротких пептидов [11]. Также технологии химического синтеза не позволяют проводить широкомасштабный скрининг антимикробной активности с использованием принципов комбинаторной химии и биологии [12]. Альтернативным подходом является использование гетерологических систем рекомбинантной продукции АМП. Гетерологические системы продукции на основе митотрофных дрожжей *Pichia pastoris* позволяют легко масштабировать производство рекомбинантных биопрепаратов, минимизируя издержки на их производство [13, 14].

Агенты биоконтроля – это живые организмы (природные или модифицированные), которые способны ингибировать распространение патогенов и вредоносных организмов [15]. Чаще всего этот термин используется в контексте создания биологических пестицидов. Поскольку дрожжевые клетки не являются мишенями большинства АМП, их можно использовать для создания агентов биоконтроля, секретирующих во внеклеточную среду

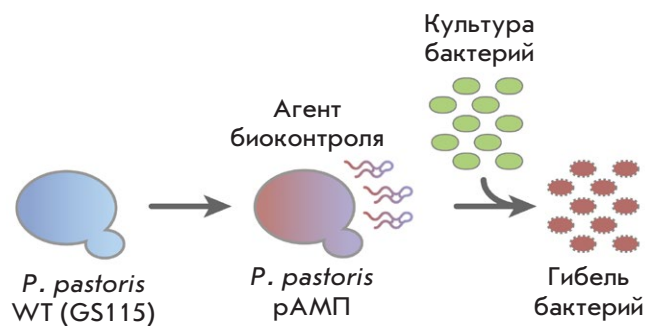


Рис. 1. Схематическое представление генетического программирования штаммов дрожжей *P. pastoris* и создания рекомбинантного агента биоконтроля. Клетки дрожжей дикого типа (*P. pastoris* WT GS115) трансфицируют генетической конструкцией для продукции секретируемой АМП; кокультивирование полученного агента биоконтроля (*P. pastoris* pAMP) с бактерией-мишенью приводит к гибели этой бактерии

активные АМП для подавления роста патогенных бактерий (рис. 1) [16] или фитопатогенных грибов [17]. Применение подобного подхода в борьбе с патогенами, в том числе из группы ESKAPE, может стать перспективным для ограничения распространения антибиотикорезистентности.

Данная работа посвящена генетическому программированию митотрофных дрожжей *P. pastoris* с целью получения рекомбинантных агентов биоконтроля, в качестве активных компонентов в которых выступает антимикробный пептид. Получена генетическая конструкция, обеспечивающая конститутивную продукцию зрелого АМП, секретируемого в культуральную среду. Дрожжи *P. pastoris*, трансфицированные данной конструкцией, проявляли антимикробную активность в отношении и грамотрицательных, и грамположительных бактерий-мишеней. Выраженный антимикробный эффект наблюдали также в эмульсионной микрокультуре, имитирующей природные микрокомпарменты. Коинкапсуляция клеток бактерии-мишени и дрожжей-продуцентов АМП в каплях микрофлюидной двойной эмульсии приводила к эффективному подавлению роста бактерий, опосредованному гетерологической продукцией pAMP – протегрина-1 (rPG-1). Разработанный подход к созданию рекомбинантных агентов биоконтроля представляет перспективную основу для дальнейшего развития альтернативных стратегий борьбы с антибиотикорезистентностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные и дрожжевые штаммы

В качестве гетерологического продуцента АМП использовали штамм *P. pastoris* GS115 (Invitrogen,

США). Антимикробную активность проверяли на штаммах бактерий *Escherichia coli* Δ lptD (любезно предоставлены И.А. Остерманом) и *Bacillus megaterium* В-512 (любезно предоставлены С.А. Дубилей). Для получения репортерного штамма *E. coli* Δ lptD sfGFP клетки *E. coli* Δ lptD трансформировали плазмидой, конститутивно экспрессирующей зеленый флуоресцентный белок sfGFP [18].

Конструирование плазмиды и трансфекция клеток дрожжей

Оптимизацию кодонов последовательности, кодирующей зрелый протегрин-1 (rPG-1), проводили с использованием программного обеспечения GeneArt GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Оптимизированную последовательность гена rPG-1 клонировали в экспрессионный вектор pGAPZalpha A (Thermo Fisher Scientific Inc.) с помощью гомологичной рекомбинации. Полученную плазмиду pGAP-PG-1 линейаризовали по сайту рестрикции AvrII и трансфицировали в клетки дрожжей с помощью электропорации [19]. Трансфицированные клоны отбирали на селективной агаризованной среде YPDS (2% пептона, 1% дрожжевого экстракта, 2% глюкозы, 1 М сорбитол, 2% агар-агара) с добавлением антибиотика зеоцина до конечной концентрации 100 мкг/мл.

Определение зон ингибирования роста бактериимишени

Для определения размера зон ингибирования роста клоны *P. pastoris* выращивали на чашках с YPD-агаром (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы, 100 мМ фосфат калия рН 6.0, 1.8% агара) в течение 2 дней при 30°C. Мягкий агар (8 г/л триптона, 2.5 г/л NaCl, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0.5% агара) расплавляли, охлаждали до 42°C и инокулировали клетки *E. coli* Δ lptD или *B. megaterium* В-512 до конечной концентрации примерно 10⁶ КОЕ/мл. Затем колонии *P. pastoris* покрывали инокулированным мягким агаром и инкубировали при 37° в течение ночи. Наличие антимикробной активности анализировали по размеру зон ингибирования роста репортерной бактерии.

Оценка содержания рекомбинантного протегрина-1 в среде культивирования

Дрожжевой штамм-продуцент rPG-1 культивировали в среде YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы, 100 мМ фосфат калия рН 6.0) в колбах-качалках при 37°C и 250 об/мин в течение 3 суток. Среду культивирования использовали для анализа антимикробной активности против бактерии-мишени *E. coli* Δ lptD методом двукратных серийных разведений. В качестве стандарта

для определения концентрации пептида использовали синтетический аналог протегрина-1, полученный с помощью твердофазного синтеза.

Инкапсуляция штаммов дрожжей и бактериимишени в капли микрофлюидной двойной эмульсии и проточная цитофлуориметрия

Репортерный штамм *E. coli* Δ lptD sfGFP, продуцирующий sfGFP под контролем промотора pJ23119, культивировали в среде YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы, 100 мМ фосфат калия рН 6.0) в колбах-качалках при 37°C и 250 об/мин до начала фазы логарифмического роста. *P. pastoris* GS115 и rPG-1 культивировали в среде YPD в колбах-качалках при 30°C и 180 об/мин в течение 16 ч. Затем клеточные культуры фильтровали с использованием 40 мкм клеточных фильтров (Greiner Bio-One, Германия) и разбавляли до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0.45$ (заселенность (λ) ~ 5 клеток на каплю) для *E. coli* Δ lptD и $OD_{600} = 1.5$ (заселенность (λ) ~ 1 клетка на каплю) для штаммов дрожжей. Затем клетки инкапсулировали в капли микрофлюидной двойной эмульсии (МДЭ) с использованием 20 мкм микрофлюидных чипов, полученных методом мягкой литографии, как описано ранее [20]. Заполненные капли МДЭ культивировали при 30°C в инкубаторе, насыщенном водяным паром. После инкубации в течение 24 ч сигнал флуоресценции от капель МДЭ анализировали с помощью проточного цитофлуориметра Novocyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences Inc., США). Капли визуализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti (Nikon, Япония) со стандартным фильтром FITC. Эксперимент по кокультивированию дрожжей и бактерий в 96-луночном планшете проводили в среде YPD со стартовой оптической плотностью $OD_{600} = 0.25$ для дрожжей и $OD_{600} = 0.005$ для *E. coli* Δ lptD sfGFP. Планшет инкубировали при 30°C и постоянном перемешивании. Рост целевой бактерии оценивали путем подсчета колоний после посева на агаризованную среду серийных десятикратных разведений кокультуры. Измерения проводили в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Антимикробные пептиды как эффективные антимикробные агенты

Антимикробные пептиды могут сочетать в себе высокую антимикробную эффективность с широким спектром антимикробной активности. В табл. 1 приведены результаты анализа опубликованных данных об антимикробной активности ряда высокоактивных АМП.

Таблица 1. Антибиотическая активность панели репрезентативных высокоэффективных АМП

Чувствительные бактерии	МИК, мкг/мл				
	протегрин-1	ареницин-1	темпорин L	плевроцидин	мелиттин
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.5–4	нд	16	4–8	4–64
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.25	4	4	1–2	0.25–0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	2–4	16	16–32	2–8
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	2–4	2–4	4–16	1–4
<i>Candida albicans</i>	2	24	8	нд	25

*нд – нет данных; данные МИК протегрин-1 адаптированы из [21], ареницина-1 – из [22, 23], темпорина L – [24], плевроцидина – [25], мелиттина – [26–29].

Высокоэффективные АМП можно найти среди представителей различных структурных классов. Протегрин-1 и ареницин-1 относятся к бета-шпигельным АМП, тогда как темпорин L, плевроцидин и мелиттин обладают альфа-спиральной структурой. Несмотря на отличия во вторичной структуре, они проявляют широкий спектр антимикробной активности, эффективно воздействуя в том числе и на патогены, относящиеся к группе ESKAPE, а также на оппортунистические патогенные грибы, такие, как *Candida albicans*.

Среди представленных пептидов протегрин-1 (PG-1) характеризуется низкой минимальной ингибирующей концентрацией (МИК), а также обладает широким спектром активности, в том числе и в отношении патогенов группы ESKAPE. Таким образом, принимая во внимание высокую антимикробную активность PG-1, было решено использовать его аминокислотную последовательность для создания агента биоконтроля на основе метилотрофных дрожжей *P. pastoris*.

Генетическое программирование дрожжей

Протегрин-1 состоит из 18 аминокислотных остатков и содержит две внутримолекулярные дисульфидные связи, поддерживающие бета-шпигельную структуру (рис. 2А). В отличие от рекомбинантного протегринина, природный пептид содержит амидированный С-концевой остаток аргинина. Отсутствие модификации на С-конце может влиять на стабильность и активность АМП, однако эффективная продукция рекомбинантного протегринина-1 (rPG-1) *in situ* в гетерологической системе способна минимизировать подобные эффекты.

Нуклеотидная последовательность гена протегринина-1 *P. pastoris* GS115 была оптимизирована в соответствии с частотой использования кодонов и клонирована в челночный экспрессионный вектор rGAPZalpha A. Полученная генетическая конструкция rGAP-PG-1 обеспечивала конститутивную продукцию протегринина-1 за счет сильного

конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAP), а секрецию во внеклеточную среду обеспечивала сигнальная последовательность альфа-фактора дрожжей (рис. 2Б). Созданный штамм дрожжей rPG-1, трансфицированный плазмидой rGAP-PG-1, секретировал зрелый пептид во внеклеточную среду и формировал четкие зоны ингибирования роста репортерных штаммов грамположительных (*B. megaterium*) и грамотрицательных (*E. coli ΔlptD*) бактерий (рис. 2В).

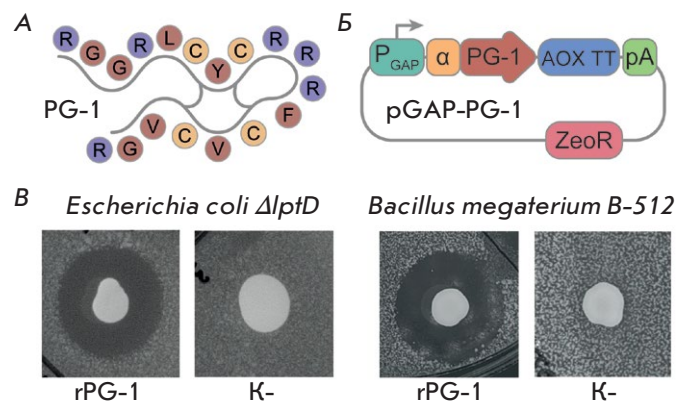


Рис. 2. Генетическое программирование дрожжей *P. pastoris*. А – схема строения протегринина-1 (фиолетовым обозначены положительно заряженные аминокислотные остатки, красным – незаряженные, желтым – остатки цистеина; Б – схема генетической конструкции для продукции протегринина-1 в дрожжах: P_{GAP} – промотор гена глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAP), α – сигнальная последовательность альфа-фактора, PG-1 – кодон-оптимизированная последовательность протегринина-1, AOX TT – AOX1-терминатор транскрипции, pA – сигнал полиаденилирования, ZeoR – устойчивость к зеоцину; В – тест антимикробной активности штамма продуцента протегринина (rPG-1) и контрольных дрожжей, продуцирующих флуоресцентный белок mCherry (К-). Диаметр зон ингибирования роста – 12 и 14 мм для репортерных бактерий *E. coli ΔlptD* и *B. megaterium* соответственно

Уровень продукции rPG-1 клетками дрожжей оценивали по значениям антимикробной активности среды культивирования против репортерной бактерии *E. coli ΔlptD*. В качестве стандарта использовали химически синтезированный аналог rPG-1. Концентрация rPG-1 в среде культивирования равна 540 нг/мл.

Таким образом, показана возможность реконструкции искусственной антимикробной активности в клетках *P. pastoris*, продуцирующих rPG-1.

Кокультивирование в каплях микрофлюидной двойной эмульсии

Эффективные агенты биоконтроля способны ограничивать распространение патогенных микроорганизмов, против которых они направлены. Зачастую конкуренция микроорганизмов происходит в рамках определенных микрокомпарментов среды обитания, будь то почвенные сообщества или микробиота кишечника [30]. Таким образом, при создании агентов биоконтроля и пробиотических организмов необходимо оценить их способность ингибировать рост целевых бактерий в микрокомпартаментах и при численном преимуществе последних. Капли двойной эмульсии, сгенерированные с помощью микрофлюидных технологий, позволяют заключить клетки эффекторных дрожжей с репортерным штаммом бактерии и оценить их антибиотические

свойства. Подобная модель в дальнейшем может быть модифицирована для проведения широкомасштабных скринингов антимикробной активности.

В рамках данной работы рекомбинантный штамм дрожжей, продуцирующий протегрин (rPG-1), был коинкапсулирован в капли микрофлюидной двойной эмульсии с репортерными клетками *E. coli ΔlptD sfGFP*, конститутивно продуцирующими зеленый флуоресцентный белок sfGFP (рис. 3А). В качестве контроля использовали коинкапсуляцию *E. coli ΔlptD sfGFP* с дрожжами дикого типа (GS115) и инкапсуляцию *E. coli ΔlptD sfGFP* без дрожжей. Антимикробную активность рекомбинантных штаммов дрожжей *P. pastoris* детектировали по гибели или пролиферации репортерной бактерии-мишени и сопутствующей флуоресценции sfGFP в каплях микрофлюидной двойной эмульсии.

После инкубации в течение 24 ч капли анализировали с помощью проточного цитофлуориметра. Коинкапсуляция бактерии-мишени со штаммом дрожжей rPG-1 приводила к снижению сигнала флуоресценции репортера по сравнению с каплями, в которых *E. coli ΔlptD sfGFP* были инкапсулированы отдельно или вместе с контрольным штаммом GS115 (рис. 3Б). Снижение уровня флуоресценции в каплях свидетельствовало о подавлении роста клеток *E. coli ΔlptD sfGFP* в присутствии дрожжей rPG-1. В то же время дрожжи GS115 не оказыва-

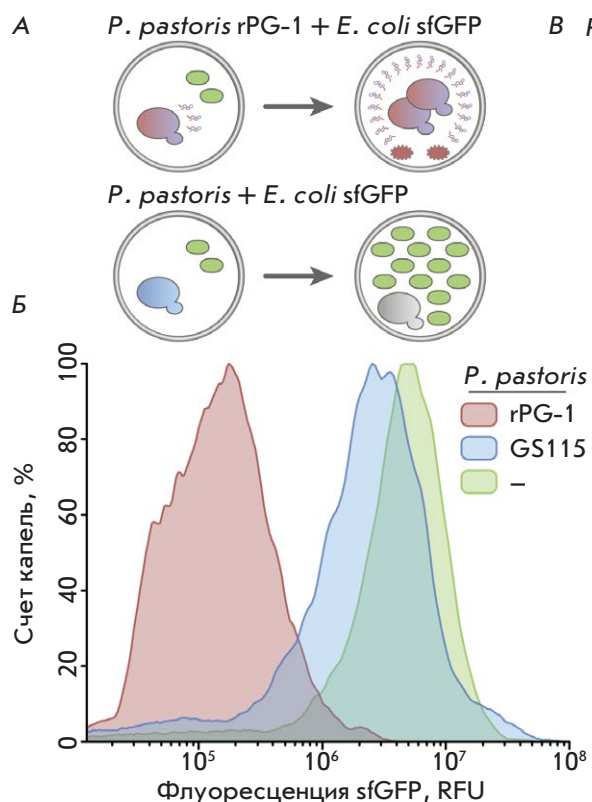
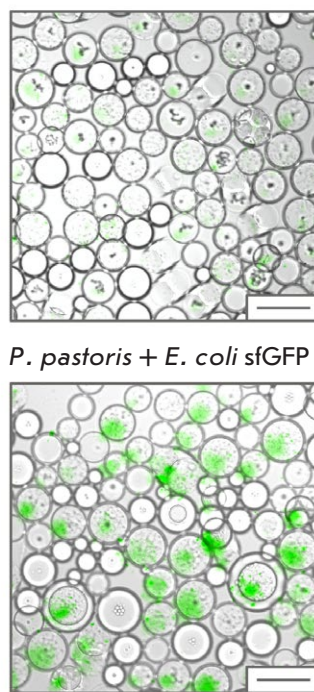


Рис. 3. Анализ антимикробных свойств рекомбинантного агента биоконтроля.



А — схема кокультивирования эффекторных дрожжей с бактерией-мишенью в каплях двойной эмульсии. Б — результаты проточной цитофлуориметрии капель после кокультивирования: цветом отмечено распределение сигнала флуоресценции *E. coli ΔlptD sfGFP* инкапсулированных со штаммом rPG-1 (красный), с контрольными дрожжами *P. pastoris* GS115 (синий), без дрожжей (зеленый). В — микроскопия капель микрофлюидной двойной эмульсии при инкапсуляции бактерии-мишени *E. coli sfGFP* с эффекторными дрожжами *P. pastoris* rPG-1 и с контрольными клетками *P. pastoris* GS115. Шкала делений — 50 мкм

ли значительного влияния на пролиферацию *E. coli* Δ lptD sfGFP, что приводило к увеличению сигнала флуоресценции в соответствующих каплях.

Микроскопия образцов после инкубации показала высокоэффективное подавление роста репортерного штамма *E. coli* Δ lptD sfGFP, сопровождающееся пролиферацией *P. pastoris* rPG-1 (рис. 3B). В то же время коинкапсуляция репортерной бактерии с контрольным штаммом GS115 приводила к преобладанию капель, заполненных размножившимися клетками бактерии-репортера (рис. 3B). Подобный эффект сохранялся и при совместном культивировании эффекторных дрожжей с целевой бактерией в 96-луночной планшете. В суспензии *P. pastoris* rPG-1 подавлялся рост *E. coli* Δ lptD sfGFP, в отличие от контрольных дрожжей *P. pastoris* GS115.

Таким образом, созданные дрожжи-продуценты rPG-1 способны ингибировать рост целевой бактерии в совместной культуре уже на первые сутки инкубации. Полученные результаты могут быть имплементированы для разработки пробиотических организмов на основе дрожжей-продуцентов рАМП и создания программируемых рекомбинантных агентов биоконтроля.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стремительное распространение антибиотикорезистентности серьезно осложняет борьбу с инфекционными заболеваниями. Появление бактериальных штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) еще сильнее уменьшает число доступных схем терапии. Таким образом, остро стоит вопрос о поиске альтернативных антимикробных соединений. Антимикробные пептиды способны стать источником новых антимикробных препаратов, поскольку обладают активностью против широкого спектра патогенов, в том числе ассоциированных с множественной лекарственной устойчивостью [31].

АМП включают представителей различных структурных классов. Среди них выделяют бета-шпильки, альфа-спирали, линейные, комбинированные, а также циклические пептиды [32]. Широкая структурная вариабельность АМП позволяет реализовывать разные механизмы воздействия на бактериальные клетки, влияя на спектр антимикробной активности. Технологии рационального дизайна позволяют провести тонкую настройку физико-химических свойств АМП и получить пептид с улучшенными показателями активности и токсичности [33]. Таким образом, АМП создают пластичную основу для получения эффективных антимикробных препаратов.

Протегрин-1, относящийся к бета-шпильчатым АМП, состоит из 18 аминокислотных остатков и содержит две внутримолекулярные дисульфидные

связи. Он проявляет широкую антимикробную активность за счет взаимодействия с бактериальной мембраной и формирования в ней пор [34, 35]. Принимая во внимание высокие показатели антимикробной активности и широкий спектр чувствительных к нему патогенов, протегрин-1 был выбран в качестве активного компонента для создания рекомбинантного агента биоконтроля.

Гетерологическая продукция АМП представляет важную биотехнологическую задачу, а также служит основой для создания систем широкомасштабного скрининга антимикробных соединений. Метилотрофные дрожжи *P. pastoris* широко используются в биотехнологии, поскольку позволяют за короткое время получать рекомбинантные белки с высоким выходом [13, 14]. Наиболее широко используется получение рекомбинантных белков под контролем промотора алкогольоксидазы-1 (АОХ1), индуцируемого метанолом [36]. Однако метанол легко воспламеняется и относится к токсичным веществам, к тому же индуцированная экспрессия не позволяет оценить конкурентные характеристики рекомбинантных дрожжей *in vivo*. В нашей работе синтез антимикробного пептида в клетках *P. pastoris* осуществлялся под контролем сильного конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAP). Это позволило получить рекомбинантный штамм дрожжей, способный эффективно ингибировать рост грамположительных (*B. megaterium*) и грамотрицательных (*E. coli* Δ lptD) бактериальных мишеней.

Агенты биоконтроля способны ингибировать рост патогенных организмов, против которых они направлены [15]. Для эффективной защиты от патогенов агенты биоконтроля должны обладать способностью конкурировать с этими патогенами в рамках ограниченного количества ресурсов и пространства. В данной работе такие условия моделировали посредством микрокомпартиментализации бактериальной мишени и дрожжевого эффектора в каплях микрофлюидной двойной эмульсии, и при инкапсуляции создавалось численное преимущество бактериальных клеток над дрожжевыми. Установлено, что штамм дрожжей, секретирующий рекомбинантный протегрин-1 (rPG-1) в культуральную среду, уже в первые сутки после инкапсуляции способен эффективно подавлять рост бактерии-мишени. За счет конститутивной продукции rPG-1 рекомбинантные дрожжи обладают постоянной антимикробной активностью, они способны контролировать рост микроорганизмов без необходимости в добавлении индуктора. Таким образом, в результате генетического программирования дрожжей *P. pastoris* создан рекомбинантный агент биоконтроля, способный ин-

гибировать рост бактерии-мишени в условиях конкуренции за пространство и питательные вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования на основе метило-трофных дрожжей *P. pastoris* создан рекомбинантный агент биоконтроля, активным компонентом которого выступает рАМП протегрин-1. Полученный штамм дрожжей ингибировал рост репортерной мишени как на агаризованной среде, так и в условиях кокультивирования в каплях микрофлюидной

двойной эмульсии. Разработанная стратегия получения рекомбинантных агентов биоконтроля является важным этапом создания альтернативных способов борьбы с патогенами. Кроме того, рассмотренные подходы могут применяться для поиска новых антимикробных соединений с использованием технологий глубокого функционального профилирования [37]. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-14-00357).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Murray C.J.L., Ikuta K.S., Sharara F., Swetschinski L., Robles Aguilar G., Gray A., Han C., Bisignano C., Rao P., Wool E., et al. // *Lancet*. 2022. V. 399. № 10325. P. 629–655.
- Chahine E.B., Dougherty J.A., Thornby K.-A., Guirguis E.H. // *Ann. Pharmacother*. 2022. V. 56. № 4. P. 441–462.
- Oliveira D.M.P.D., Forde B.M., Kidd T.J., Harris P.N.A., Schembri M.A., Beatson S.A., Paterson D.L., Walker M.J. // *Clin. Microbiol. Rev*. 2020. V. 33. № 3. P. e00181–00119.
- Lin Q., Deslouches B., Montelaro R.C., Di Y.P. // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2018. V. 52. № 5. P. 667–672.
- Mookherjee N., Anderson M.A., Haagsman H.P., Davidson D.J. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2020. V. 19. № 5. P. 311–332.
- Mahlapu M., Håkansson J., Ringstad L., Björn C. // *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2016. V. 6. № 194. P. 1–20.
- Spohn R., Daruka L., Lázár V., Martins A., Vidovics F., Grézal G., Méhi O., Kintses B., Számel M., Jangir P.K., et al. // *Nat. Commun*. 2019. V. 10. № 1. P. 4538.
- Assoni L., Milani B., Carvalho M.R., Nepomuceno L.N., Waz N.T., Guerra M.E.S., Converso T.R., Darrieux M. // *Front. Microbiol*. 2020. V. 11. № 593215. P. 1–20.
- Zhu Y., Hao W., Wang X., Ouyang J., Deng X., Yu H., Wang Y. // *Med. Res. Rev*. 2022. V. 42. № 4. P. 1377–1422.
- Moretta A., Scieuzo C., Petrone A.M., Salvia R., Manniello M.D., Franco A., Lucchetti D., Vassallo A., Vogel H., Sgambato A., et al. // *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2021. V. 11. № 668632. P. 1–26.
- Tucker A.T., Leonard S.P., DuBois C.D., Knauf G.A., Cunningham A.L., Wilke C.O., Trent M.S., Davies B.W. // *Cell*. 2018. V. 172. № 3. P. 618–628.e613.
- Popa C., Shi X., Ruiz T., Ferrer P., Coca M. // *Front. Microbiol*. 2019. V. 10. № 1472. P. 1–13.
- Chen X., Li J., Sun H., Li S., Chen T., Liu G., Dyson P. // *Sci. Rep*. 2017. V. 7. № 1. P. 14543.
- Stenberg J.A., Sundh I., Becher P.G., Björkman C., Dubey M., Egan P.A., Friberg H., Gil J.F., Jensen D.F., Jonsson M., et al. // *J. Pest Sci*. 2021. V. 94. № 3. P. 665–676.
- Pipiya S.O., Mokrushina Y.A., Gabibov A.G., Smirnov I.V., Terekhov S.S. // *Antibiotics*. 2020. V. 9. № 9. P. 527.
- Huang Y., Gao L., Lin M., Yu T. // *Postharvest. Biol. Technol*. 2021. V. 171. № 11. P. 1298.
- Baranova M.N., Babikova P.A., Kudzhaev A.M., Mokrushina Y.A., Belozerova O.A., Yunin M.A., Kovalchuk S., Gabibov A.G., Smirnov I.V., Terekhov S.S. // *Antibiotics*. 2021. V. 10. № 10. P. 1161.
- Wu S., Letchworth G.J. // *BioTechniques*. 2004. V. 36. № 1. P. 152–154.
- Terekhov S.S., Smirnov I.V., Stepanova A.V., Bobik T.V., Mokrushina Y.A., Ponomarenko N.A., Belogurov A.A., Rubtsova M.P., Kartseva O.V., Gomzikova M.O., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. № 10. P. 2550–2555.
- Edwards I.A., Elliott A.G., Kavanagh A.M., Zuegg J., Blaskovich M.A.T., Cooper M.A. // *ACS Infect. Dis*. 2016. V. 2. № 6. P. 442–450.
- Orlov D.S., Shamova O.V., Eliseev I.E., Zharkova M.S., Chakchir O.B., Antcheva N., Zachariev S., Pantelev P.V., Kokryakov V.N., Ovchinnikova T.V., et al. // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17. № 6. P. 376.
- Park C., Cho J., Lee J., Lee D.G. // *Biotechnol. Lett*. 2011. V. 33. № 1. P. 185–189.
- Manzo G., Ferguson P.M., Hind C.K., Clifford M., Gustilo V.B., Ali H., Bansal S.S., Bui T.T., Drake A.F., Atkinson R.A., et al. // *Sci. Rep*. 2019. V. 9. № 1. P. 10934.
- Manzo G., Hind C.K., Ferguson P.M., Amison R.T., Hodgson-Casson A.C., Ciazynska K.A., Weller B.J., Clarke M., Lam C., Man R.C.H., et al. // *Commun. Biol*. 2020. V. 3. № 1. P. 697.
- Dosler S., Karaaslan E., Alev Gerceker A. // *J. Chemother*. 2016. V. 28. № 2. P. 95–103.
- Akbari R., Hakemi-Vala M., Pashaie F., Bevalian P., Hashemi A., Pooshang Bagheri K. // *Microb. Drug Resist*. 2018. V. 25. № 2. P. 193–202.
- Jang W.S., Kim C.H., Kim K.N., Park S.Y., Lee J.H., Son S.M., Lee I.H. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003. V. 47. № 8. P. 2481–2486.
- Sung W.S., Park S.H., Lee D.G. // *FEBS Lett*. 2008. V. 582. № 16. P. 2463–2466.
- Donaldson G.P., Lee S.M., Mazmanian S.K. // *Nat. Rev. Microbiol*. 2016. V. 14. № 1. P. 20–32.
- Park S.C., Park Y., Hahm K.S. // *Int. J. Mol. Sci*. 2011. V. 12. № 9. P. 5971–5992.
- Huan Y., Kong Q., Mou H., Yi H. // *Front. Microbiol*. 2020. V. 11. № 582779. P. 1–21.
- Elliott A.G., Huang J.X., Neve S., Zuegg J., Edwards I.A., Cain A.K., Boinett C.J., Barquist L., Lundberg C.V., Steen J., et al. // *Nat. Commun*. 2020. V. 11. № 1. P. 3184.
- Bolinteanu D., Hazrati E., Davis H.T., Lehrer R.I., Kaznessis Y.N. // *Peptides*. 2010. V. 31. № 1. P. 1–8.
- Fahrner R.L., Dieckmann T., Harwig S.S., Lehrer R.I., Eisenberg D., Feigon J. // *Chem. Biol*. 1996. V. 3. № 7. P. 543–550.
- Karbalaei M., Rezaee S.A., Farsiani H. // *J. Cell. Physiol*. 2020. V. 235. № 9. P. 5867–5881.
- Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V., Samoilov A.E., Manolov A.I., Nazarov A.S., Danilov D.V., Dubiley S.A., Osterman I.A., Rubtsova M.P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 38. P. 9551–9556.