



Институт биофизики клетки РАН (ФИЦ ПНЦБИ РАН)
Сколковский институт науки и технологий
University of Lancaster
Институт проблем передачи информации РАН



Школа Молекулярной и Теоретической Биологии 2020

Поиск низкомолекулярных лигандов, ингибирующих формирование биопленок *E. coli*

Т. А. Бессонова

А.А. Рыбина

К.Леи Б. Батиста

Ф.Е. Кагакин

А.А. Киричко

М.И. Никельшпарг

М.С. Новикова

А.В. Палачанина

И.В. Рандошкин

Я.В. Боганцев

А.Д. Казнадзей

М. Н. Тутукина



School of molecular
and theoretical biology

Supported by



Skoltech

Сколковский институт науки и технологий



Институт проблем
передачи информации
им. А. А. Харкевича
Российской академии
наук

Гастроэнтерит ←

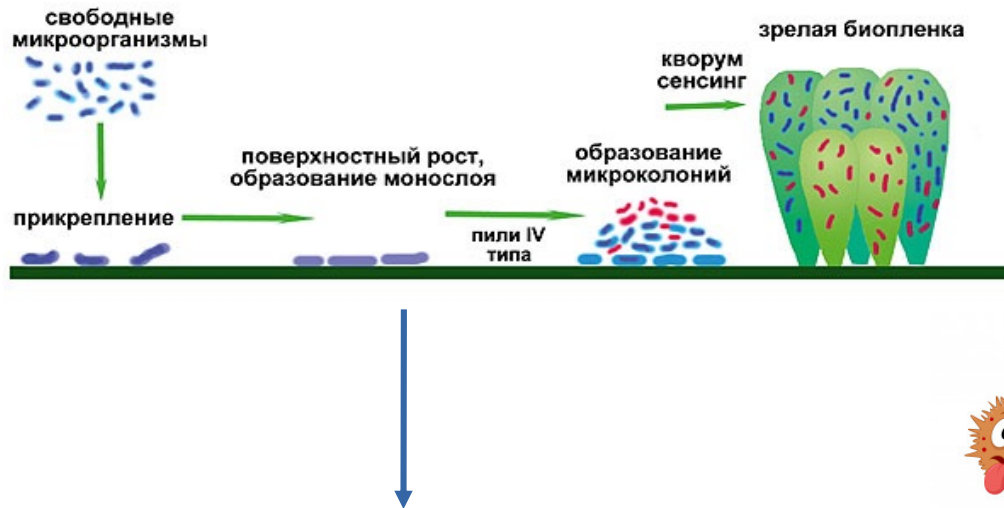
Неонатальный менингит ←

Болезнь Крона ←

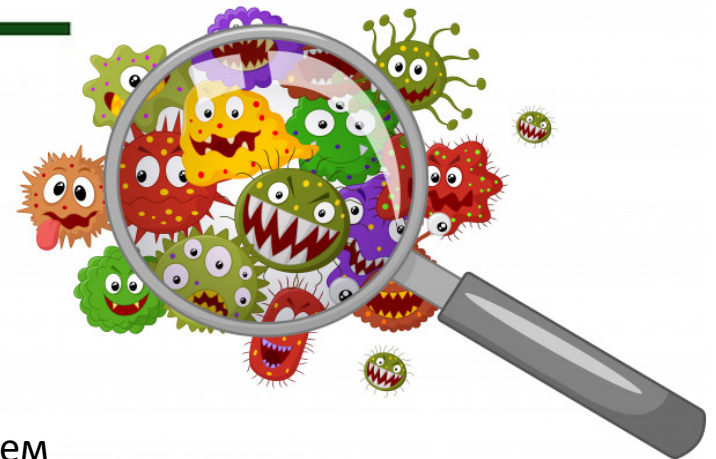
Болезни мочеполового тракта ←



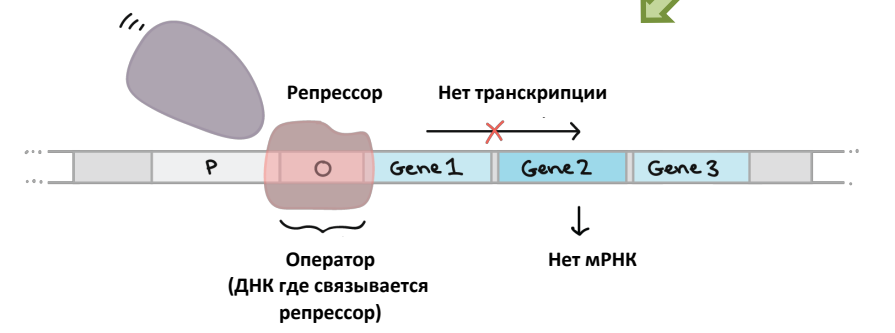
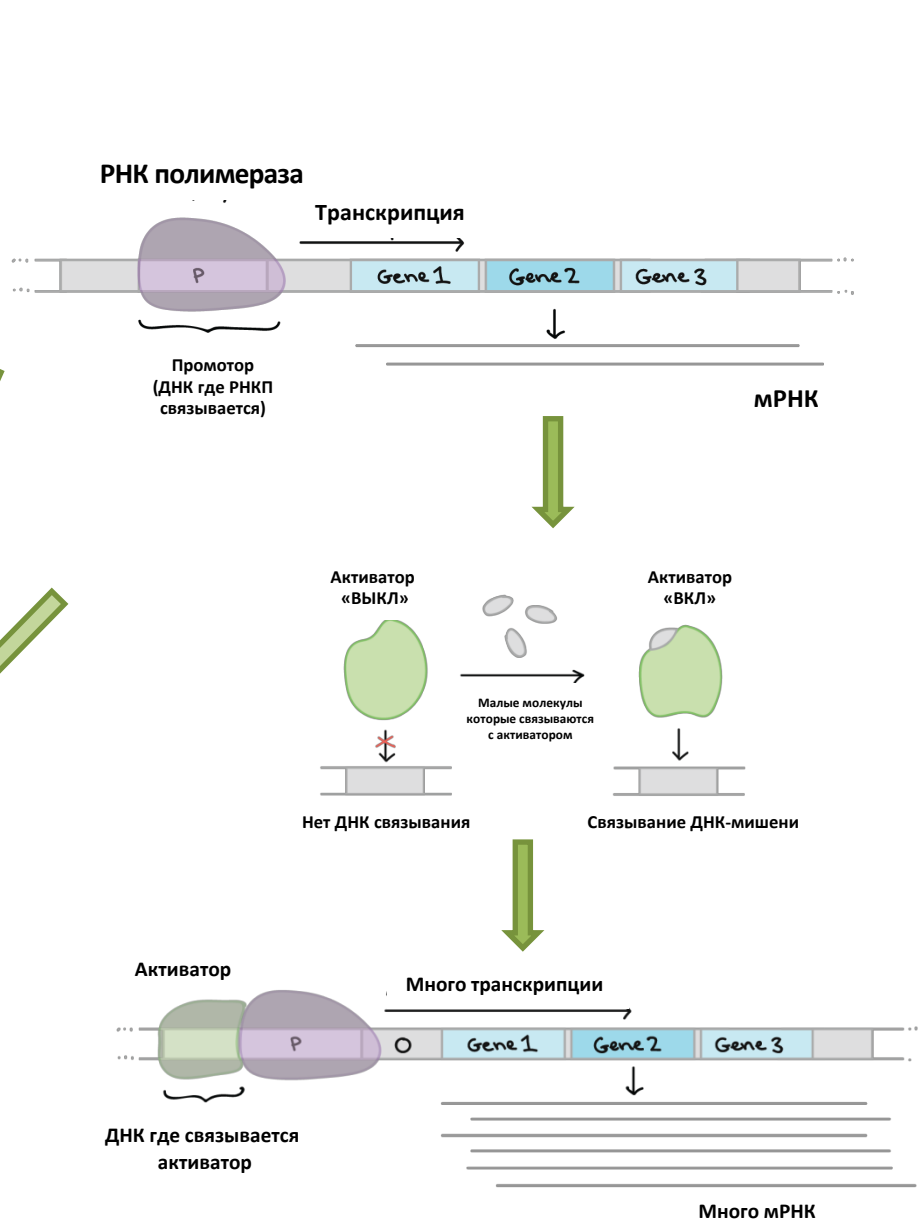
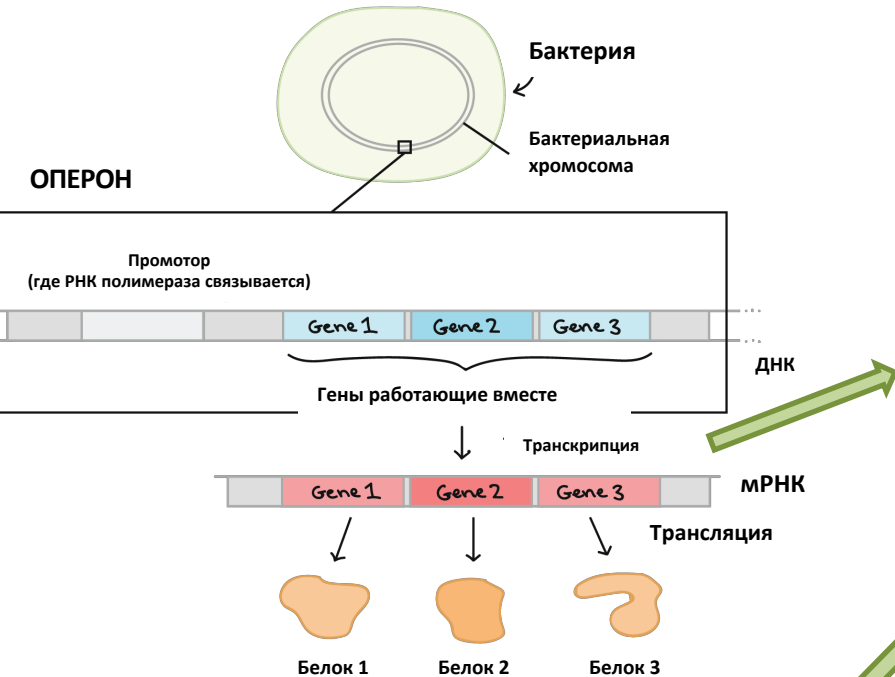
Escherichia coli



Нужно в 1000 раз больше антибиотика



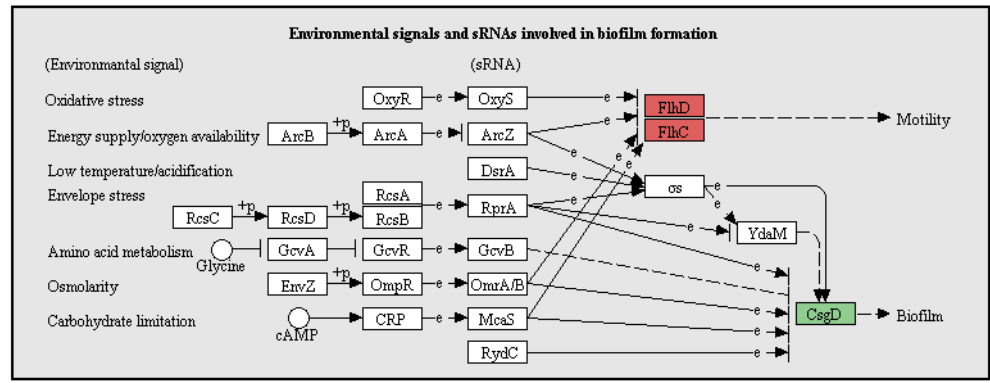
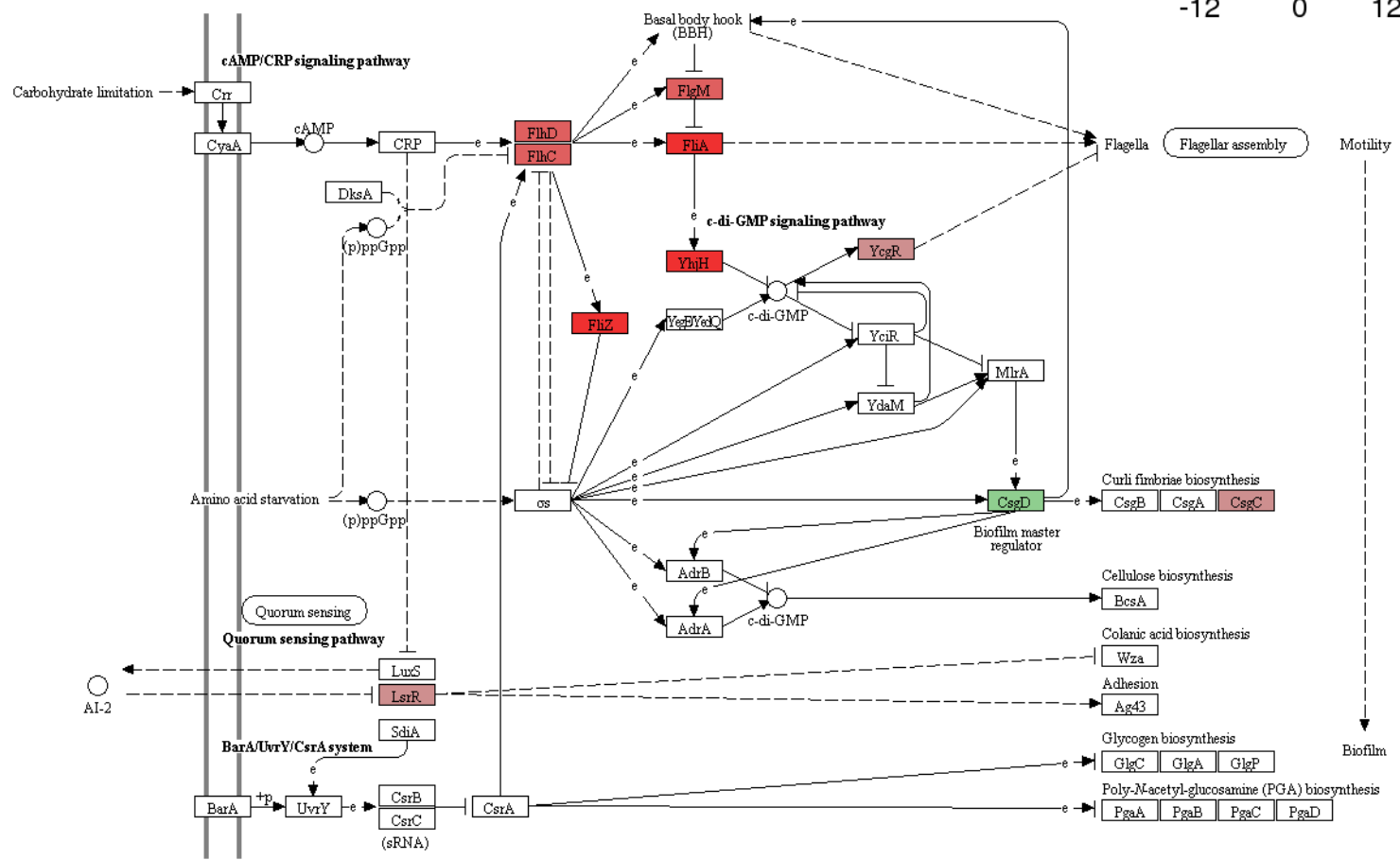
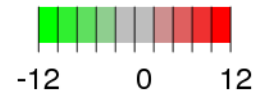
Предотвращение образования биопленок выключением определенных генов поможет нам избежать высокой антибиотикорезистентности и снизит потребление антибиотиков во всем мире



Задачи исследования

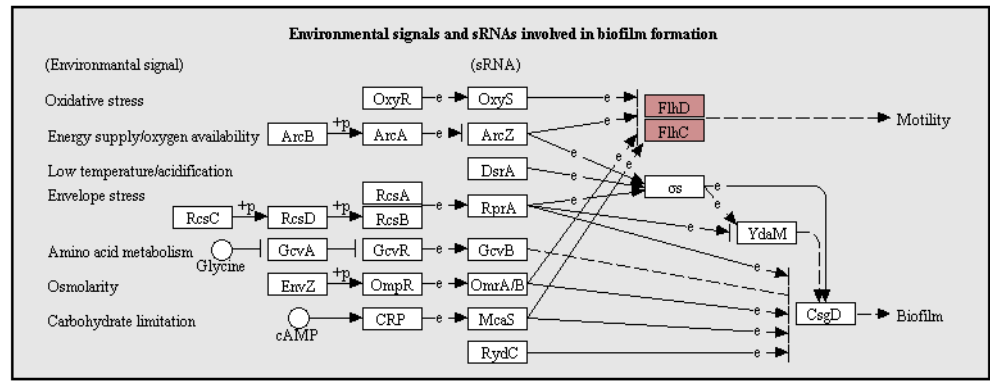
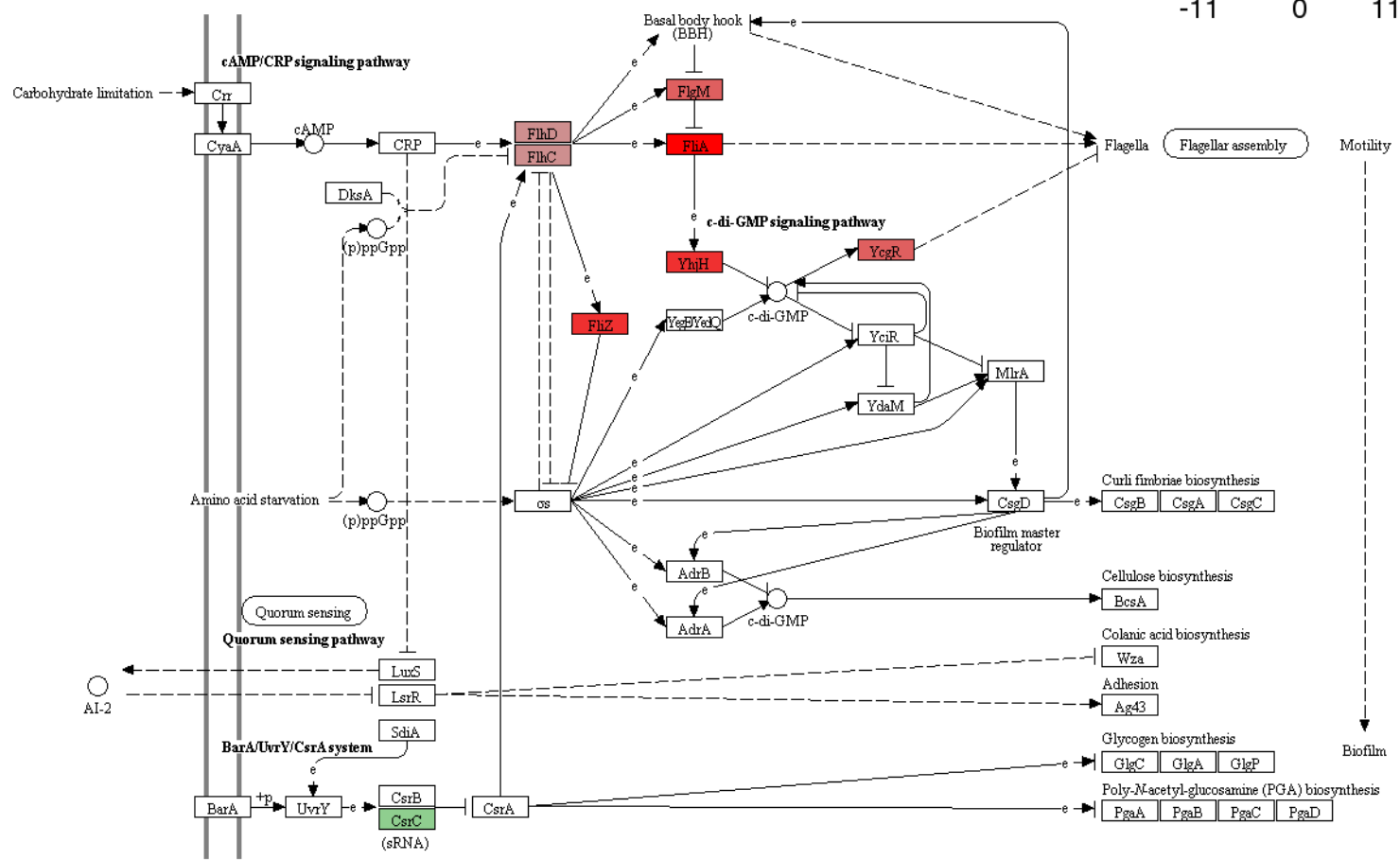
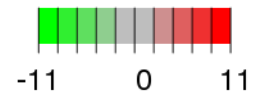
- Поиск ключевых факторов транскрипции, вовлеченных в регуляцию процессов формирования биопленок *E. coli* K12 MG1655
- Подбор низкомолекулярных лигандов, способных моделировать ДНК-связывающую активность этих факторов транскрипции и таким образом предотвращать образование биопленок

BIOFILM FORMATION - ESCHERICHIA COLI



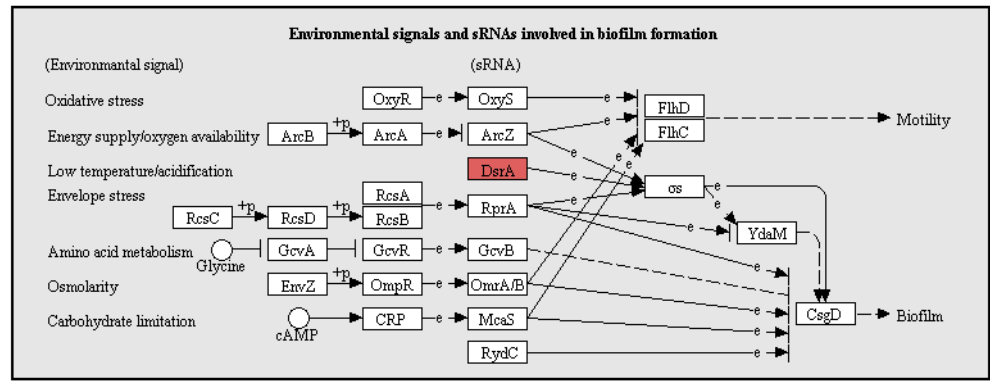
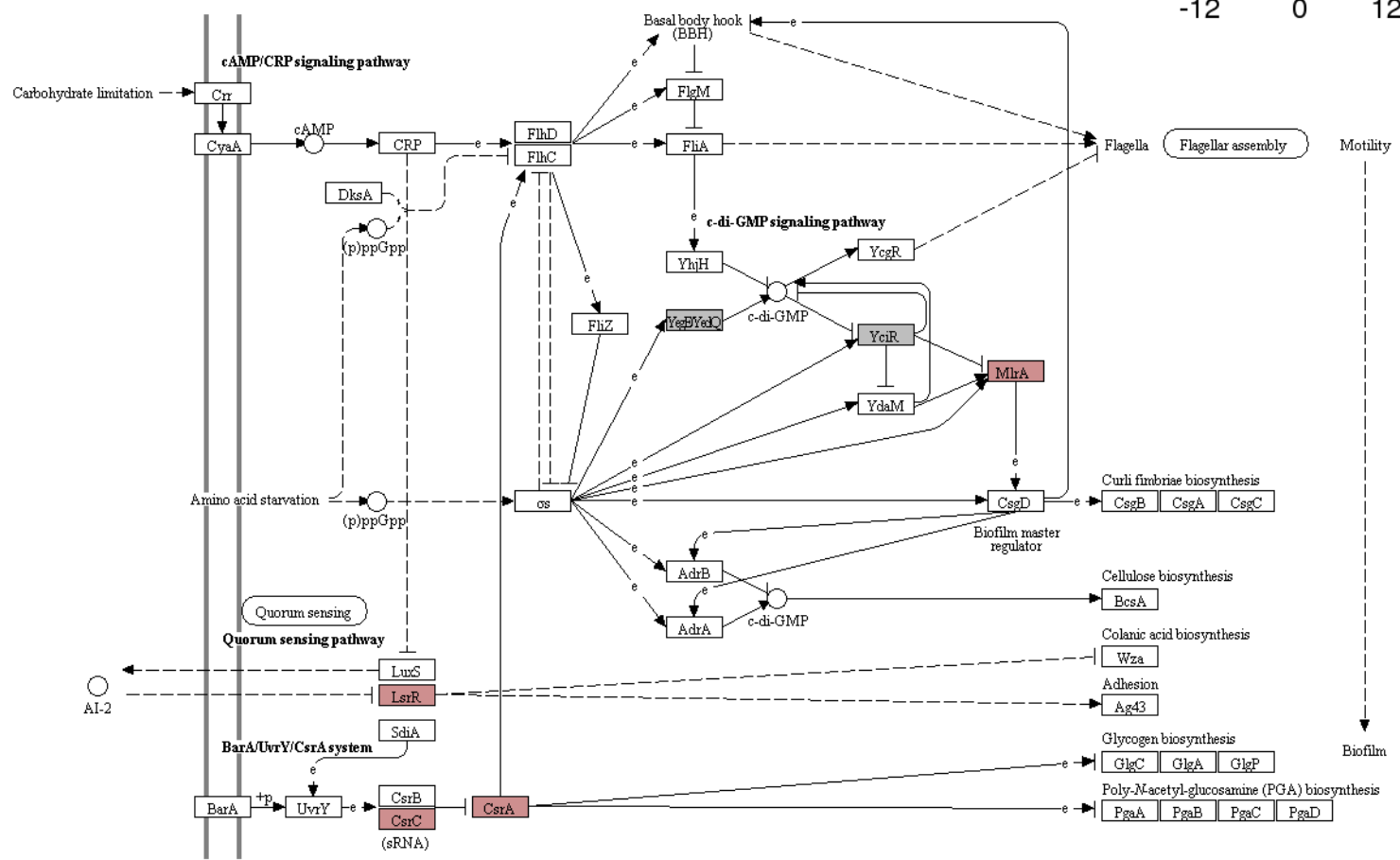
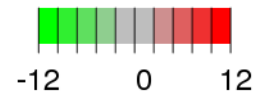
Изменения экспрессии генов, кодирующих белки, задействованные в формировании биопленок, при удалении гена фактора транскрипции **UxuR** при росте на среде с глюкуронатом

BIOFILM FORMATION - ESCHERICHIA COLI



Изменения экспрессии генов, кодирующих белки, задействованные в формировании биопленок, при удалении гена фактора транскрипции *YjjM* при росте на среде с глюкуронатом

BIOFILM FORMATION - ESCHERICHIA COLI



Изменения экспрессии генов, кодирующих белки, задействованные в формировании биопленок, при удалении гена фактора транскрипции **YjjM** при росте на среде с гулоном

Потенциальные лиганды

Сахара из кишечника

D-глюкоза

D-глюкуронат

D-галактуронат

Гулоновая кислота (гулонат)

Лактоза

Галактоза

Манноза

Ацетат

Глицерин

Сукцинат

Мальтоза

Фруктоза

Сахароза

Сахара из грудного молока

2'-фукозиллактоза

6'-сиалиллактоза

Лакто-N-неотетраоза

Сиаловая кислота

Нейромедиаторы

L-глутаминовая кислота

D-глутаминовая кислота

Гидрохлорид дофамина

Серотонин

Мелатонин

Адреналин

Ацетилхолин

Глобальные регуляторы

cAMP-CRP

Глобальный регулятор метаболизма

FNR

Опосредует переход от аэробных к анаэробным условиям роста через регуляцию сотни генов.

Активирует гены вовлеченные в анаэробный метаболизм и репрессирует – в аэробный. Регулирует гены, отвечающие за хемотаксис, кислотный стресс

Lrp (Leucine-

responsive regulatory protein)
Регулятор 10% генов *E. coli*, вовлеченных в биосинтез аминокислот и катаболизм, транспорт питательных веществ, синтез пилей и др.

IHF

(Integration host factor)

Помогает в поддержании структуры ДНК, связываясь на специфических сайтах. Участвует в суперскручивании ДНК и дестабилизации дуплексов ДНК, влияет на процессы репликации ДНК, рекомбинации и экспрессии многих генов

Fis (factor

for inversion stimulation)
Организует структуру нуклеоида через модуляцию продукции гираз и топоизомераз. Взаимодействует с CRP, HNS и HU.

Напрямую регулирует гены, вовлеченные в процессы транскрипции, репликации, фаговой интеграции, гены рРНК, тРНК, вирулентности, формирования биопленок, энергетического метаболизма, стрессового ответа, подвижности, хемотаксиса и др.

Белки нуклеоида

H-NS (Histone-

like nucleoid structuring protein)

Белок нуклеоида, который может конденсировать и

суперскручивать ДНК. Считается глобальным сайленсером

транскрипции генов с высоким

содержанием АТ-пар. Регулирует около 5% всех генов *E.*

coli, играющих ключевую роль в глобальной организации

бактериальной хромосомы

Dps

Основной белок нуклеоида стационарной фазы роста.

Необходим для защиты ДНК от множества стрессовых факторов:

окислительного стресса, видимого излучения в морской воде,

жирнокислотного голодания,

воздействия различных токсических веществ.

Считается, что не участвует в

регуляции транскрипции и

связывается с ДНК неспецифически,

однако нами была показана

некоторая регуляторная активность

этого белка.

Образует ферритин-подобный полый гомоолигомерный комплекс из 12

субъединиц

Локальные регуляторы

OmpR

Цитоплазматический транскрипционный фактор, отвечающий за ответ на изменение осмолярности среды, участвует в ответе на кислотный стресс

CsgD (Curlin subunit gene D)

Регулирует гены белков сборки Curli волокон, участвующих в стимуляции поведения клеточного сообщества за счет образования биопленок, в ответ на голодание и высокую плотность клеток

Регуляторы метаболизма гексуронатов

UxuR - Регулятор метаболизма гексуронатов, активирован образование биопленок по данным RNA-seq.

В отсутствие фруктуроната подавляет транскрипцию кластера оперонов, участвующих в транспорте и деградации β -D-глюкуронидов сахарных кислот, глюкуроната и глюконата

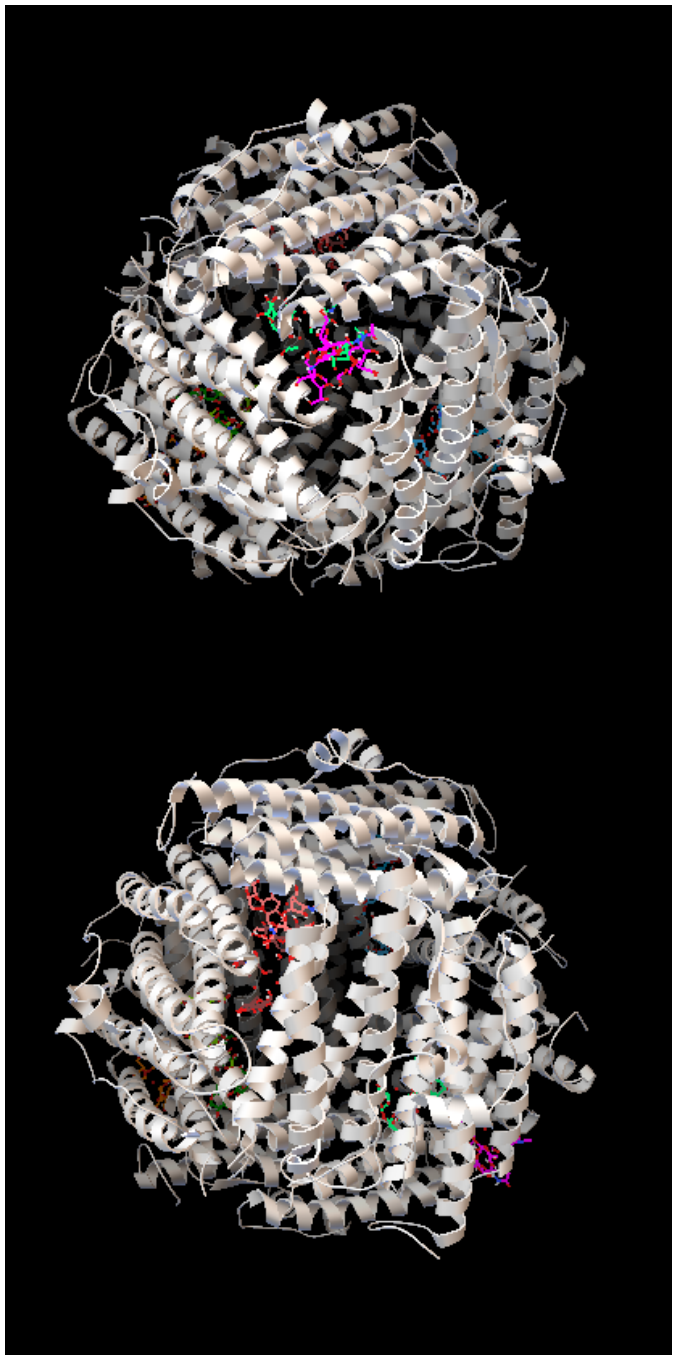
YjjM - регулятор метаболизма гексуронатов

Ингибирует гены клеточной подвижности и активирован образование биопленок по данным RNA-seq

ExuR – репрессор генов транспорта и катаболизма галактуроната и глюкуроната

Результаты молекулярного докинга

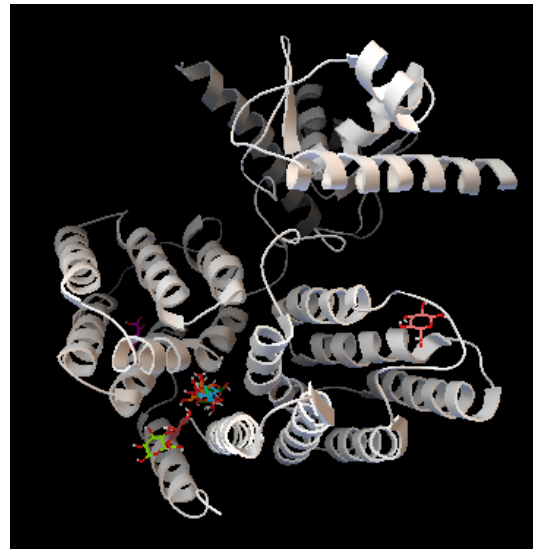
| Белок | Лиганд | Мин. энергия (kcal/mol) | Белок | Лиганд | Мин. энергия (kcal/mol) |
|-------------|---------------------|-------------------------|-----------|---------------------|-------------------------|
| IHF | Lacto-N-neotetraose | -8.0 | Dps | Lacto-N-neotetraose | -9.0 |
| | Fucosyl lactose | -8.0 | | Sialyl lactose | -7.0 |
| | Lactose | -7.9 | OmpR | Maltose | -6.3 |
| | Sialyl lactose | -7.9 | | Lactose | -6.3 |
| | Maltose | -7.8 | | Sucrose | -6.0 |
| HNS | Sialyl lactose | -6.7 | | Sialic acid | -5.8 |
| CsgD | Sialyl lactose | -7.3 | Melatonin | -5.5 | |
| | fructose | -6.6 | Lrp | Lacto-N-neotetraose | -8.3 |
| | Serotonin | -6.5 | | Sialyl lactose | -7.1 |
| | Melatonin | -6.4 | | Lactose | -6.0 |
| | D-glucuronic acid | -6.2 | | Maltose | -6.0 |
| YjjM normal | Lacto-N-neotetraose | -6.8 | | Melatonin | -6.0 |
| | Maltose | -6.4 | Serotonin | -6.0 | |
| | Sialyl lactose | -6.4 | FNR | Lactose | -7,1 |
| | Lactose | -6.2 | | Sucrose | -6.9 |
| YjjM EPEC | Lacto-N-neotetraose | -7.8 | | Maltose | -6.7 |
| | Sialyl lactose | -7.4 | | Melatonin | -6.5 |
| | Lactose | -6.3 | CRP | Lacto-N-neotetraose | -7.9 |
| UxuR normal | D-glucuronic acid | -6.2 | | Sucrose | -6.3 |
| | D-galacturonic acid | -6.1 | | Lactose | -6.4 |
| UxuR EPEC | Melatonin | -6.0 | | | |
| | Serotonin | -5.8 | | | |
| | Maltose | -5.7 | | | |



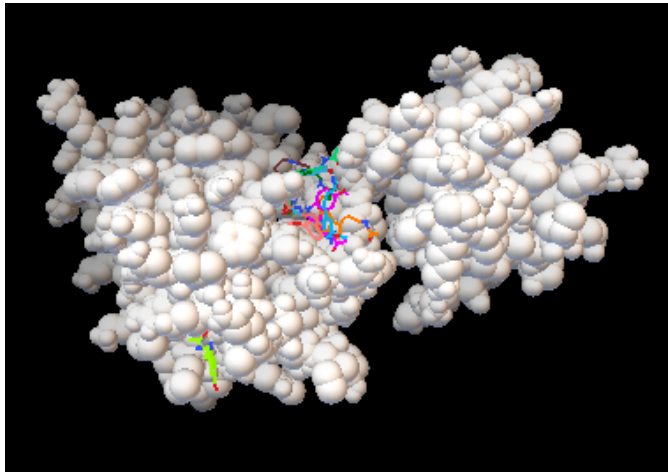
Лакто-N-неотетраоза связывается с меж-субъединичным пространством додекамера Dps с высокой свободной энергией, что, возможно, предотвращает сборку додекамера или вызывает его распад, а следовательно ведет к активации его регуляторных свойств



Мелатонин в кармане Lrp



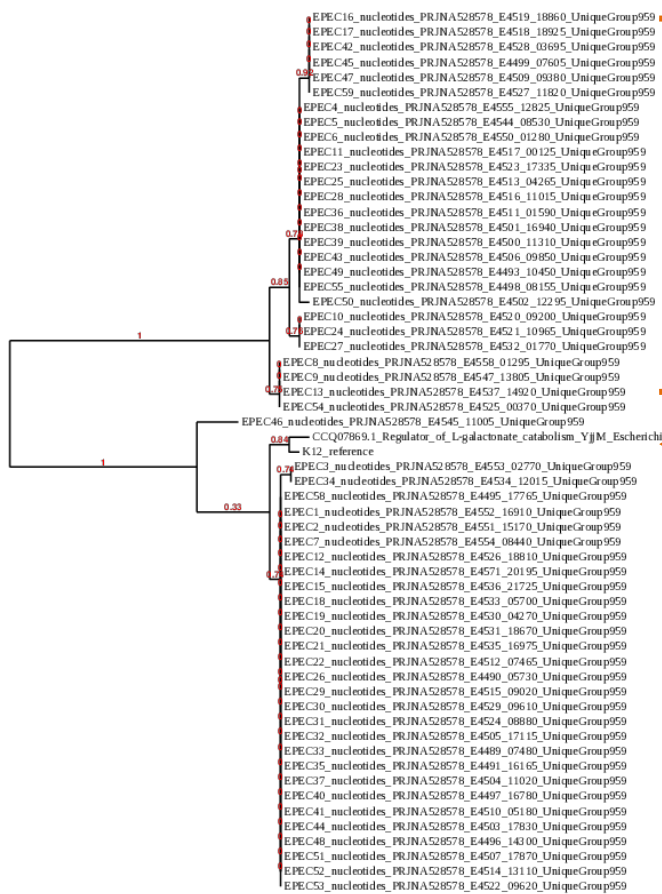
Глюкуронат хорошо связывается с UxuR в эффектор-связывающем домене



Мелатонин же связывается с UxuR (из EPEC штамма) в междоменной области

- Почти для всех белков подошли одни и те же лиганды (сахара из грудного молока, мелатонин, серотонин и лактоза)
- Для Fis не нашлось ни одного лиганда

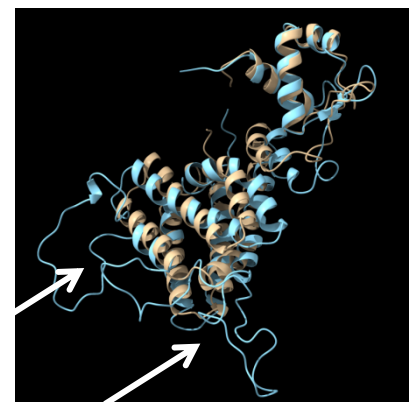
В клинических изолятах EPEC, ассоциированных с повышенным образованием биопленок, структура YjjM и UchiR изменена



клинические изоляты с измененной структурой YjjM

K-12

Предсказанные 3D-структуры YjjM из клинических изолятов (голубой) и дикого типа K-12 (бежевый) после нескольких раундов молекулярной динамики на 80 нс. Стрелками показаны подвижные карманы.



150 ns m.d.

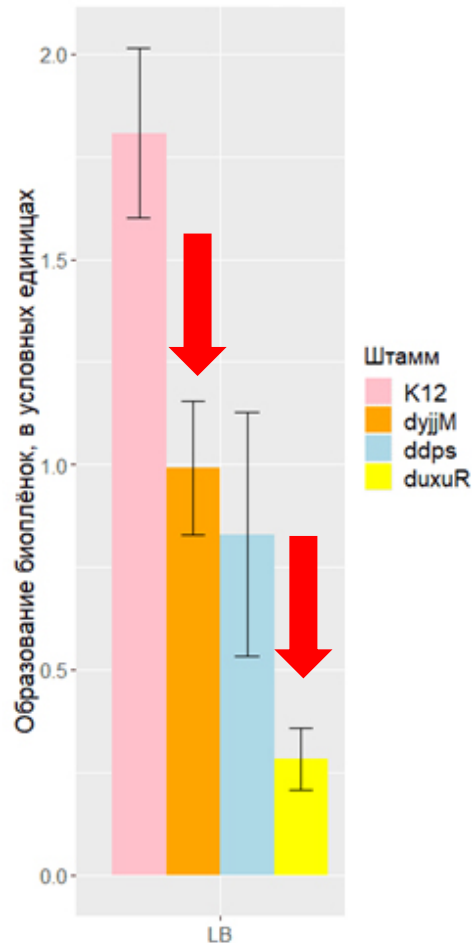


8000 ns m.d.

Предварительные данные по формированию биопленок *in vitro*

- Протестированные лиганды оказывают разное влияние на формирование биопленок штаммом дикого типа *E. coli* K-12 MG1655, «пробиотического» штамма Nissle 1917 и клинических изолятов EPEC.
- Почти все лиганды, имевшие «высокую» минимальную энергию связывания с потенциальными регуляторами, в той или иной степени ингибировали влияние биопленок.
- Пока наиболее перспективно выглядят гексуронаты и сахара грудного молока, но нам нужны дополнительные эксперименты для накопления статистики, в том числе, анализ транскриптомов в штаммах, мутантных по ключевым регуляторам.
- Лактоза и манноза, по всей видимости, ингибируют не только образование биопленок, но и адгезию кишечной палочки к культуре клеток CaCo-2, что делает проблематичным их использование в качестве направленных ингибиторов биопленок.
- Мы продолжаем экспериментальный поиск таких ингибиторов биопленок, которые бы надежно подавляли их образование в лабораторных и клинических штаммах *E. coli*, но не влияли бы на адгезию :)

Влияние делеции генов ключевых факторов транскрипции на формирование биопленок *in vitro*



- UxuR критически важен для формирования биопленок
- YjjM и Dps также участвуют в регуляции процесса, но эффекты их удаления не так сильны
- Удаление генов CRP и H-NS эффекта почти не продемонстрировали

Благодарности

О.Н. Озолинь
М.С. Гельфанд

советы и моральная поддержка



Fyodor Kondrashov

Olga Bochkareva

последовательности геномов клинических
изолятов EPEC



Штаммы клинических изолятов EPEC