

2. Grintzalis K. [et al.] // *Free Radic. Biol. and Med.* 2013. V. 59. P. 27–35.
3. Patsoukis N., Georgiou Ch. D. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. P. 1783–1792.
4. Noble J.E., Bailey M.J. // *Methods Enzymol.* 2009. V. 463. P. 73–95.

**REDOX-BALANCE OF PROTEIN THIOLS AND MIXED DISULPHIDES IN
BASAL GANGLIA OF THE RATS AT IRON (II) -INDUCED OXIDIZING
STRESS *IN VIVO***

D.S. Semenovich^{1,2}

¹*Yanka Kupala Grodno State University, Grodno, Belarus*

²*Institute of Biochemistry of Biologically Active Substances, National Academy
of Science of Belarus, BLK, Grodno, Belarus*

semenovich@ibiochemistry.by

The introduction of iron (II) gluconate for rats 7 days old following 10 days is characterized by the development of oxidative stress in basal ganglia on day 30 of ontogenesis, as evidenced by an increase in the content of TBARS by 22.5 % ($p < 0.05$), a decrease in the PrSH / PrSSR by 19 % ($p < 0.05$) and an increase in the PrSSG content by 31 % ($p < 0.05$).

The introduction of iron gluconate to rats in the neonatal period leads to a pronounced activation of oxidative processes in the basal ganglia of the rat brain, as evidenced by changes in the redox balance of protein thiols and mixed disulfides, S-glutathionylation of proteins, and an increase in the level of TBARS. Consequently, this model can be used to study the processes of neurodegeneration in the structures of the brain and to find new approaches to the correction of neurodegenerative pathology.

**ЭКСПРЕССИЯ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЭСКУЛЕНТИНА
ЛЯГУШКИ В СОСТАВЕ РАЗЛИЧНЫХ ФЬЮЖН-БЕЛКОВВ
КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI***

Н.В. Совгир, В.А. Прокулевич

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

sovgirnv@gmail.ru

Катионный пептид эскулентин-1b (*Rana esculenta* L., 1758) размером 46 а.о., обладающий широким спектром антибактериальной и антифунгальной активности, не удаётся получить в нативном состоянии в

бактериях *Escherichia coli* ввиду его токсичности для клеток продуцента [1]. В связи с некоторыми структурными и функциональными особенностями антимикробных пептидов в биотехнологии их традиционно получают в составе химерных белков.

Целью данной работы являлось изучение особенностей экспрессии в клетках *E. coli* нескольких химерных белков, включающих АМП эскулентин-1b.

Партнёрами пептида в составе химерных белков выступали катионные белки: бычий альфа-интерферон (cowIFN α , 167 а.о.), амидазный СНАР- (cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidases) домен эндолизина стафилококкового бактериофага К (СНАР-домен, 165 а.о.) и полноразмерный эндолизин стафилококкового бактериофага К, меченный гистидиновыми остатками (эндолизин KHis, 495 а.о.); а также анионные белки: малый убиквитин-подобный модификатор с гистидиновой меткой (SUMO, 125 а.о.) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и углеводсвязывающий модуль (СВМТ, 216 а.о.) термофильных бактерий *Thermotoga maritima*. Все белки-партнёры эскулентина отличаются размером и физико-химическими свойствами, но эффективно экспрессируются в клетках бактерий *E. coli* с образованием преимущественно телец включения в случае катионных белков, либо в растворимой форме в случае анионных при культивировании при 19–20 °С и 37 °С.

После индукции экспрессии молекул, состоящих из эскулентина и катионных белков, установлено внутриклеточное накопление тех фьюжн-белков, в которых эскулентин находится на N-конце белков, но в то же время выявлено, что экспрессия сопровождается падением оптической плотности культуры штамма-продуцента, обусловленным частичным лизисом бактериальных клеток, и постепенным восстановлением параметров роста к окончанию индукции. Таким образом, токсическое воздействие эскулентина на клетки-продуценты заключается в бактериостатическом, либо даже в бактериолитическом эффекте. Выход целевых продуктов не превышает 8–16 % от общего количества клеточных белков. При этом наибольший выход (16 %) фиксировали у фьюжн-белка, в котором партнёром эскулентина выступал эндолизин KHis, по размеру на порядок превосходящий эскулентин. Данный фьюжн-белок синтезируется в растворимой форме только при 19 °С [2].

В случае индукции экспрессии фьюжн-белков, в которых эскулентин находится на С-конце анионных белков, подобных негативных эффектов

при экспрессии фьюжн-белков выявлено не было, и значения оптической плотности культуры после индукции продолжали расти, возможно, вследствие нейтрализации положительного заряда эскулентина. Однако выявлено внутриклеточное накопление в количестве до 8 % только белка, состоящего из углевод-связывающего модуля и эскулентина. Данный белок синтезируется в растворимой форме даже при 37 °С [3].

Таким образом, выход химерного белка в клетках штамма-продуцента зависит от размеров белка-партнёра эскулентина: чем выше молекулярная масса белка-партнёра, тем выше выход целевого фьюжн-белка. Также установлено, что эскулентин в составе фьюжн-белков может синтезироваться в растворимой форме при температурах культивирования бактерий 19 °С и 37 °С.

1. Совгир, Н.В. Клонирование и экспрессия гена антимикробного белка эскулентина-1b (*Ranaesculenta*) в клетках бактерий *Escherichiacoli* / Н.В. Совгир, В.А. Прокулевич // Тр. БГУ. Сер.: Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. – 2011. – Т. 6 в 2 ч. Ч. 1. – С. 70–75.

2. Совгир, Н.В. Особенности экспрессии химерного гена антимикробного пептида лягушки и эндолизина бактериофага К в бактериях *Escherichiacoli* / Н.В. Совгир, С.Г. Голенченко, В.А. Прокулевич //Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология – 2017. – № 1. – С. 62–70.

3. Production of antimicrobial peptide esculentin derivatives as a part of fusion proteins in *E. coli* / А.А. Nagornaya[et al.] / 10th international conference of natural and life sciences “The COIN’S 2015”. – Vilnius, 2015. – P. 75–76.

EXPRESSION OF FROG ANTIMICROBIAL PEPTIDE ESCULENTIN AS A PART OF VARIOUS FUSION PROTEINS IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS

N.V. Sovgir, V.A. Prokulevich

Belarusian State University, Minsk, Belarus

sovgirnv@gmail.com

Expression features of some chimeric proteins including antimicrobial peptide esculentin-1b were studied in *E. coli* cells. Previously esculentin was fused with different cationic proteins: bovine alpha-interferon (167 aa), staphylococcal bacteriophage K endolysin CHAP domain (165 aa), staphylococcal bacteriophage K endolysin with His-tag at the C-terminus (495 aa); and with anionic proteins: yeast small ubiquitin-related modifier with His-tag at the N-terminus (125 aa), bacterial carbohydrate-binding module (216 aa). It was found that production of the fusion proteins rises with increasing of

molecular weight of esculentin fusion partner. Also data obtained indicate that esculentin as a part of fusion protein can be synthesized in the soluble form at 19 °C and 37 °C.

ГИБРИДНЫЙ ГЕН, СОДЕРЖАЩИЙ НУКЛЕОТИДНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЭСКУЛЕНТИНА ЛЯГУШКИ

Н.В. Совгир, А.В. Бусленко, В.А. Прокулевич

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
sovgirnv@gmail.com*

Антимикробный пептид эскулентин-b(1–20) (Esc-b(1–20)) длиной 20 а.о. является N-концевым производным пептида эскулентина-1b лягушки *Rana esculenta* L., 1758, который не экспрессируется в клетках *Escherichiacoli* [1] и даже в составе фьюжн-белков остается токсичным для клеток штамма-продуцента [2]. N-концевой фрагмент эскулентина-1b сохраняет свойства полноразмерного пептида, обеспечивающие его антимикробную активность [3], однако такие короткие и нестабильные молекулы рекомбинантных пептидов оптимально получать в составе фьюжн-белков. В данной работе фьюжн-партнёром пептида Esc-b(1–20) выступал малый убиквитин-подобный модификатор (smallubiquitin-relatedmodifier, SUMO) дрожжей *Saccharomycescerevisiae*, который будучи анионным, может компенсировать суммарный положительный заряд, определяющий антимикробную активность эскулентина-b(1–20) [4].

Целью работы являлось конструирование с последующим клонированием в клетках *E. coli* гена, кодирующего рекомбинантный фьюжн-белок SUMO-Esc-b(1–20), который на N-конце содержит растворимый анионный белок SUMO с гистидиновой меткой, а на C-конце – катионный пептид эскулентин-b(1–20) (Esc-b(1–20)). Между фьюжн-партнерами введён сайт узнавания TEV протеазы (tobaccoetchvirusprotease) [5], с помощью которой, при необходимости, можно отделить целевой белок Esc-b(1–20) от фьюжн-партнёра.

Для создания гибридной конструкции амплифицированную последовательность гена *SUMO* и ДНК плазмиды pET-*Esc-b(1–20)*, подвергали рестрикции ферментом *Nde* I. Далее плазмиду дефосфорилировали и лигировали с геном *SUMO*. Полученными