**Новая рекомбинантная цистеинсинтаза А из *Limosilactobacillus reuteri* LR1: получение и свойства.**

***Лесь Е.К.1, Чикурова Н.Ю.1, Горбовская А.В.1, Агеевец В.А3, Тишков В.И.1,2,***

***Пометун А.А.1,2***

*Аспирант 1-ого года обучения, химический факультет*

*1Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*Химический факультет, Москва, Россия*

*2ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*

*3ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail:* [*evglesk2001@gmail.com*](mailto:evglesk2001@gmail.com)

Возбудителями внутрибольничных инфекций являются штаммы со множественной лекарственной устойчивостью, в том числе к широкому спектру антибиотиков. В связи с этим существует серьезная проблема поиска новых антибактериальных препаратов.

Было обнаружено, что при культивировании штаммов *Limosilactobacillus* *reuteri* LR1 и *Lacticaseibacillus* *rhamnosus* F совместно с патогенными бактериями рода *Klebsiella,* происходит ингибирование роста и гибель последних. Протеомный анализ выявил, что при совместном культивировании с патогенами лактобактерии вырабатывают ряд новых ферментов, отсутствующих в обычных условиях. Одним из этих ферментов является цистеинсинтаза A. [1]

Цистеинсинтаза A (CysK, EC: 2.5.1.47) – это фермент класса трансфераз, основной функцией которого является производство аминокислоты цистеина в бактериях. Этот фермент катализирует реакцию синтеза цистеина из сульфида и O-ацетил-L-серина. Помимо этого появляются данные о наличии у неё антимикробной активности [2], что делает данный фермент потенциальной основой для новых антимикробных препаратов.

Ген CysK из *L.reuteri* (штамм был любезно предоставлен ВНИИ молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»)) клонировали в плазмиду pET 24aс добавлением последовательности, кодирующей 6 аминокислотных остатков гистидина (гистаг) на N‑конец фермента (CysK\_HisN). Ген CysK\_HisN был экспрессирован в клетках *E.coli* BL-21(DE3) CodonPlus/pLysS в активной и растворимой форме.

Фермент CysK\_HisN очищали методом металл-хелатной хроматографии до практически гомогенного состояния. Активность белка определяли при помощи нового метода гидрофильной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для детектирования накопления продукта — цистеина. Главным преимуществом данной методики является высокая селективность. При помощи этой методики получилось определить каталитическую константу и константу Михаэлиса для одного из субстратов.

Совместно с коллегами из ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России проведены исследования по определению антимикробной активности цистеинсинтазы*.* Обнаружилось наличие у CysK\_HisN активности, ингибирующей образование биоплёнок различных микроорганизмов, в том числе и патогенных.

*Данное исследование проводится с финансовой поддержкой РНФ по гранту №. 23-64-10029.*

**Литература**

1. Savinova O. S., Glazunova O. A., Moiseenko K. V., Begunova A. V., Rozhkova I. V., Fedorova T. V. Exoproteome analysis of antagonistic interactions between the probiotic bacteria Limosilactobacillus reuteri LR1 and Lacticaseibacillus rhamnosus F and multidrug resistant strain of Klebsiella pneumonia // International Journal of Molecular Sciences. 2021.Vol. 20(22). P. 1-18.

2. Ma W., Wang J., Li Y., Wang X. Cysteine synthase A overexpression in Corynebacterium glutamicum enhances l-isoleucine production // Biotechnology and Applied Biochemistry. 2019.Vol. 1(66). P. 74-81.