

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Химический факультет

На правах рукописи

Легоцкий Сергей Александрович



**ПОЛУЧЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ, СТАБИЛИЗАЦИЯ
РЕКОМБИНАНТНОГО ЭНДОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА S-394 И
РАЗРАБОТКА СПОСОБА ЭФФЕКТИВНОГО ЛИЗИСА
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ**

03.01.04 – биохимия

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Научные руководители:

д.х.н., проф. Клячко Н.Л.

д.х.н. Мирошников К.А.

МОСКВА – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	9
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1. Пептидогликанлизирующие ферменты бактериофагов.	10
1.1. Пептидогликан – субстрат пептидогликанлизирующих ферментов.	10
1.1.1. Гликановая цепь	10
1.1.2. Пептидная часть пептидогликана	11
1.1.3. Межпептидный линкер.....	13
1.1.4. Вариации структуры пептидогликанов.....	14
1.1.5. Сайты гидролиза пептидогликана	15
1.2. Классификация пептидогликангидролаз. Строение и катализ	16
1.2.1. Ферменты, гидролизующие связи между остатками сахаров	16
1.2.2. Ферменты, гидролизующие связь между гликаном и пептидным фрагментом.....	20
1.2.3. Пептидазы	20
1.2.4. Структурная организация пептидогликангидролаз	22
1.3. Перспективы использования пептидогликангидролаз бактериофагов на практике	23
1.4. Количественное измерение ферментативной активности пептидогликанлизирующих ферментов	28
2. Внешняя мембрана <i>E. coli</i> и существующие подходы к ее дестабилизации	31
2.2. Липиды и липополисахариды	31
2.2.1. Липид А.....	33
2.2.2. Центральный олигосахарид	34
2.2.3. O-антиген	35
2.2.4. Общий энтеробактериальный антиген и другие капсульные полисахариды	36

2.3. Белки.....	41
2.3.1. Липопротеин Брауна	41
2.3.2. Порины	42
2.3.3. Аффинные рецепторы внешней мембраны.....	43
2.3.4. Белки, отвечающие за транспорт белков	44
2.4. Свойства внешней мембраны <i>E. coli</i>	44
2.4.1. Ассиметричность липидного бислоя	45
2.4.2. Физические свойства липополисахаридного слоя внешней мембраны.....	45
2.4.3. Барьерная функция внешней мембраны	46
2.5. Агенты, увеличивающие проницаемость внешней мембраны граммотрицательных бактерий.....	47
2.5.1. Методы оценки проницаемости внешней мембраны грамотрицательных бактерий.....	48
2.5.2. Катионные агенты.....	49
3. Стабилизация ферментов.....	61
3.1. Модификация свойств среды.....	63
3.1.1. Стабилизация ферментов при помощи неорганических солей.....	63
3.1.2. Стабилизация ферментов с помощью осмолитов.....	65
3.1.3. Стабилизация ферментов с помощью комплексообразования с полиэлектролитами.....	67
3.2. Химическая модификация белков.....	69
3.2.1. Стабилизация белков с помощью химической модификации функциональных групп	69
3.2.2. Стабилизация белков с помощью наложения внутримолекулярных и межмолекулярных сшивок.....	71
3.2.3. Стабилизация ферментов методом иммобилизации.....	73
3.2.4. Стабилизация ферментов методами белковой инженерии	78
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	82

4. Материалы.....	82
5. Методы	85
5.1. Полимеразная цепная реакция	85
5.2. Очистка фрагментов ДНК.....	85
5.3. Рестрикция	85
5.4. Электрофорез в агарозном геле	85
5.5. Лигирование фрагментов ДНК.....	86
5.6. Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	86
5.7. Трансформация клеток <i>E. coli</i>	86
5.8. Выделение плазмидной ДНК	87
5.9. Выделение Lys394	87
5.10. Приготовление субстрата для определения активности Lys394.....	88
5.11. Измерение активности Lys394	88
5.12. Изучение влияния pH и концентрации NaCl на активность Lys394	89
5.13. Изучение ингибирования активности Lys394 под действием ЭДТА и последующего восстановления активности солями металлов.	89
5.14. Определение молекулярной массы активного фермента	90
5.15. Изучение спектра микроорганизмов, чувствительных к действию Lys394.	90
5.16. Определение увеличения проницаемости внешней мембраны <i>E. coli</i>	90
5.17. Изучение лизиса клеток <i>E. coli</i> под действием эндолизина бактериофага SP27 в присутствии колистина.	91
5.18. Лизис интактных клеток <i>E. coli</i> при совместном действии агентов, нарушающих целостность внешней мембраны <i>E. coli</i>	91
5.19. Изучение термоинактивации Lys394	93
5.20. Изучение влияния добавок на активность и стабильность Lys394.....	93
РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	94
6. Выделение и очистка рекомбинантного эндолизина бактериофага S-394.....	94

6.1. Анализ последовательности аминокислот пептидогликангидролазы бактериофага S-394	94
6.2. Создание генно-инженерных конструкций для получения рекомбинантного Lys394	98
6.3. Получение рекомбинантного Lys394 в клетках <i>E. coli</i>	100
6.3.1. Выбор штамма-продуцента	100
6.3.2. Подбор оптимальных значений температуры и концентрации индуктора.	103
6.3.3. Очистка рекомбинантного Lys394.....	104
7. Физико-химические свойства рекомбинантного Lys394.....	106
7.1. Ферментативная активность полноразмерного и укороченного Lys394	106
7.2. Субъединичная организация Lys394.	113
7.3. Спектр гидролизуемых микроорганизмов	113
8. Применение рекомбинантного Lys394 снаружи клеток	116
8.1. Увеличение проницаемости внешней мембраны <i>E. coli</i>	116
8.1.1. Выбор агентов для увеличения проницаемости внешней мембраны <i>E. coli</i>	116
8.1.2. Взаимодействие гомополимеров аминокислот и катионных олигопептидов с интактными клетками <i>E. coli</i>	118
8.2. Лизис интактных клеток <i>E. coli</i> под действием Lys394 в присутствии агентов, разупорядочивающих внешнюю мембрану.....	123
8.2.1. Лизис суспензии клеток <i>E. coli</i>	124
8.2.2. Лизис газонных клеток <i>E. coli</i>	125
9. Термостабильность и стабилизация Lys394	128
9.1. Кинетика термоинактивации фермента Lys394	128
9.2. Стабилизация фермента Lys394	129
9.2.1. Стратегия стабилизации фермента Lys394.....	129
9.2.2. Влияние ионной силы и солевого состава буферного раствора на стабильность фермента Lys394	130

9.2.3. Стабилизация Lys394 с помощью полиолов	132
9.2.4. Стабилизация Lys394 с помощью поликатионов.....	134
9.2.5. Выбор оптимального сочетания эффекторов для стабилизации Lys394.	136
ВЫВОДЫ	139
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	140

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время бактериальные инфекции являются проблемой здравоохранения мирового масштаба. Наиболее распространенными возбудителями инфекций среди грамотрицательных бактерий являются представители семейства *Enterobacteriaceae* (в основном родов *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* и *Proteus*) и видов *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*. В последние годы намечается тенденция возрастания доли таких инфекций по сравнению с инфекциями, вызываемыми грамположительными патогенами [1]. Ситуацию осложняет стремительно развивающаяся устойчивость бактерий к антибиотикам. Так в 2007 году в Европейском союзе зафиксировано 400000 случаев бактериальных заболеваний, обусловленных мультирезистентными возбудителями, 25000 из которых завершились летальным исходом. Финансовые потери, вызванные затратами на терапию, пребывание в госпитале и потерю продуктивности пациентов, составили свыше 1,5 миллиарда долларов [2].

Среди всех видов мультирезистентных бактерий выделяют группу из 6 возбудителей, которые вызывают большинство инфекционных заболеваний. Название этой группы – ESKAPE – аббревиатура, составленная из родов и видов соответствующих микроорганизмов: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter sp.* 4 вида из 6 представленных относятся к грамотрицательным бактериям, среди которых 2 относятся к семейству *Enterobacteriaceae* [2]. Смертность по причине заболеваний, вызванных энтеробактериями, находится на очень высоком уровне. Инфекционное поражение кровотока мультирезистентными энтеробактериями в среднем приводит к смерти в 38 процентах случаев. Причем, неправильная терапия в первые 72 часа инфекции приводит к увеличению смертности до 60% [3].

Существующий на данный момент спектр антибактериальных препаратов, представленных на рынке, позволяет лечить подавляющее большинство бактериальных инфекций. Вместе с тем, в последние годы начинают появляться, так называемые, пан-резистентные штаммы микроорганизмов. Например, в 2010 году в Индии, Пакистане и Великобритании были обнаружены 107 изолятов энтеробактерий, устойчивых к большинству антибиотиков, в том числе, штамм *Klebsiella pneumoniae*, устойчивый ко всем известным антимикробным препаратам [4].

Текущая ситуация с развитием резистентности патогенных микроорганизмов усугубляется тем, что разработка новых антибиотиков перестала быть привлекательной для фармацевтических компаний. Научные изыскания, клинические испытания и регистрация

новых лекарств являются длительными по времени и крайне затратными с точки зрения финансовых вложений. В то же время, получить прибыль с вывода нового антибиотика крайне сложно, и этому есть ряд причин. Во-первых, курсы приема антибиотиков, как правило, коротки по времени, во-вторых, возникновение устойчивости к новому препарату через некоторое время снизит продажи и прибыль, в-третьих, во многих странах антибиотики относятся к группе жизненно необходимых препаратов, поэтому цены на них регулируются соответствующими официальными органами. Как следствие, многие фармацевтические компании в будущем связывают свои прибыли со средствами терапии долгосрочных хронических заболеваний, а рост рынка антибиотиков замедляется. В качестве одной из мер, способных облегчить текущее положение дел, предлагается упростить процедуры регистрации новых антибиотиков, однако многие эксперты сходятся в том, что необходимо развивать новые стратегии защиты от патогенных бактерий [5].

В качестве одной из таких альтернатив рассматривается терапия бактериофагами и их цитолитическими ферментами, которые вырабатываются на завершающей стадии жизненного цикла бактериофагов, для разрушения клеточной стенки бактерий [6]. Цитолитические ферменты бактериофагов в литературе называются «лизинами», их субстратом является пептидогликан – компонент клеточной стенки бактерий. Подгруппа лизинов, разрушающих пептидогликан изнутри клетки получили название «эндолизины». Эти ферменты перспективны для лечения инфекций различной этиологии, в том числе инфекций, вызванных мультирезистентными бактериями, в качестве антимикробной защиты продуктов питания, средств обработки различных поверхностей.

Основным ограничением использования лизинов, специфичным к грамотрицательным организмам, является низкая эффективность их действия при применении снаружи, так как пептидогликан грамотрицательных бактерий скрыт дополнительной внешней мембраной, препятствующей проникновению лизина к своему субстрату. Кроме того, чистые препараты ферментов имеют весьма умеренную стабильность при хранении, что ограничивает их практическое использование.

Целью данной работы является синтез нового эндолизина бактериофага S-394, специфичного к широкому спектру грамотрицательных бактерий, исследование его свойств, разработка подходов доставки фермента через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий и стабилизации для создания антибактериальных препаратов нового поколения широкого спектра действия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

GlcNAc – *N*-ацетилглюкозамин

MurNAc – *N*-ацетилмурамовая кислота

а. о. – аминокислотный остаток

ЛПС – липополисахарид

Kdo – 3-деокси-*D*-маннооктулозоновая кислота

ECA – энтеробактериальный общий антиген

Ac – ацетил

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

п.о. – пара оснований

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

E. coli – *Escherichia coli*

S. typhimurium – *Salmonella enterica serovar typhimurium*

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. pneumoniae – *Streptococcus pneumoniae*

ИПТГ – изопропил- β -*D*-1-тиогалактопиранозид

БОЕ – бляшкообразующая единица

OD_{xxx} – оптическое поглощение при длине волны xxx нм.

ПЭГ – полиэтиленгликоль

NPN – *N*-фенилнафтиламин

PMBN – полимиксин В нонапептид

2хТУ – культуральная среда (16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl)

МИК – минимальная концентрация вещества, ингибирующая рост тестовой культуры бактерий.

КОЕ – колониеобразующие единицы

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пептидогликанлизирующие ферменты бактериофагов.

Литический цикл развития бактериофага внутри клетки-хозяина всегда включает в себя проникновение ДНК фага сквозь клеточную мембрану и выход из клетки синтезированных частиц бактериофагов [7]. Клеточная стенка бактерий представляет собой сложноорганизованную и упорядоченную систему слоев, препятствующую попаданию чужеродных макромолекул внутрь бактериальной клетки. Для прокариот характерным является наличие двухслойной мембраны в случае грам-положительных бактерий (клеточная мембрана и пептидогликановый слой) или трехслойной мембраны в случае грам-отрицательных бактерий (внутренняя клеточная мембрана, пептидогликановый слой и внешняя клеточная мембрана) [8,9]. Причем наиболее труднопреодолимой преградой для бактериофагов является пептидогликановый слой.

1.1. Пептидогликан – субстрат пептидогликанлизирующих ферментов.

Пептидогликановый слой грамотрицательных бактерий расположен в периплазматическом пространстве между цитоплазматической и внешней мембранами. Этот слой обеспечивает жесткость клеточной стенки, поддерживает форму клетки и обеспечивает её целостность. Как отражено в названии, пептидогликан бактерий состоит из линейных цепочек гликана, сшитых между собой пептидными фрагментами, которые в свою очередь связаны друг с другом непосредственно или через пептидные линкеры [10] (Рисунок 1).

1.1.1. Гликановая цепь

Гликановая цепь представляет собой полимер, состоящий из чередующихся звеньев *N*-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и *N*-ацетимурамовой кислоты (MurNAc), связанных посредством $\beta(1\rightarrow4)$ связей. Вариативность структуры гликана в разных организмах очень низка. Лишь в некоторых случаях встречаются модификации в виде ацетилированных или фосфорилирования гидроксильных групп. Гликановые цепи полидисперсны, поэтому, говоря об их длине, можно привести лишь усредненные значения. В разных организмах средняя длина гликановой цепи варьируется от 10 до 65 дисахаридных звеньев. И хотя в некоторых случаях можно проследить некую корреляцию между формой клетки и средней длиной гликановых цепей, говорить о глобальной зависимости между этими двумя параметрами не приходится [11].

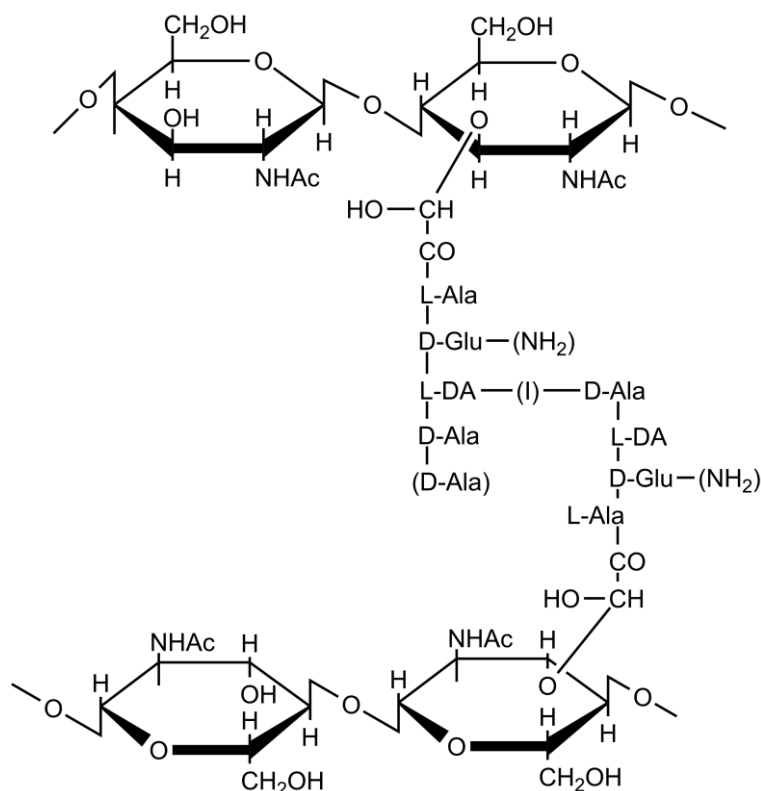


Рисунок 1. Фрагмент структуры пептидогликана. Для простоты представления вместо химических структур остатков молекул указаны аббревиатуры: L-DA – L-диаминокислота; I – межпептидный линкер; Ac – ацетил или в редких случаях гликолил. Заместители, указанные в скобках могут отсутствовать.

1.1.2. Пептидная часть пептидогликана

Пептидная часть пептидогликана (Рисунок 1) представляет собой цепочку чередующихся L- и D-аминокислот, ковалентно связанную с гликаном амидной связью между MurNAc и N-концевым остатком L-аланина, который, как правило, располагается с N-конца пептидного фрагмента. В образовании этой связи участвуют N-концевая аминогруппа пептида и карбоксильная группа мурамовой кислоты. В некоторых случаях N-концевой остаток L-аланина может быть замещен глицином или L-серином.

Во втором положении в некоторых видах бактерий остаток D-глутамата может быть гидроксильирован с образованием 3-гидроксиглутаминовой кислоты (Рисунок 2). Остаток D-Glu или 3-гидроксиглутаминовой кислоты связан со следующим аминокислотным остатком через γ -карбоксильную группу. α -Карбоксильная группа остается свободной или модифицируется, например, аминогруппой, в некоторых случаях к ней может быть присоединен остаток глицина, глицинамида или аланинамида.

В 3й позиции пептидного фрагмента наблюдается, пожалуй, наибольшая вариативность остатков аминокислот. В этом положении, как правило, расположен остаток диаминовой кислоты. Чаще всего в этом положении встречается мезо-диаминопимелиновая кислота. Это верно практически для всех грамотрицательных бактерий и для большого числа других организмов, например, бацилл, клостридий, лактобацилл, коринебактерий, пропионобактерий, синезеленых водорослей. Достаточно часто в этой позиции встречается *L*-лизин, реже встречаются *L*-орнитин, *L,L*-диаминопимелиновая кислота, гидроксизин, мезо-2,6-диамино-3-гидрокси- β -пимелиновая кислота (mHyDAP) и гидрокилизин. Все аминокислоты, перечисленные выше, содержат свободную аминогруппу, которая, благодаря своей реакционной способности, является местом присоединения межпептидного линкера, если таковой имеется. В редких случаях диаминокислоты не являются местом присоединения межпептидного линкера и остаются незамещенными или ацетилированными. В некоторых коринебактериях вместо остатка диаминокислоты в 3м положении расположен остаток *L*-гомосерина или *L*-аланина. В этом случае межпептидные шивки присоединены ко второй аминокислоте в пептидном фрагменте, так как ни аланин, ни гомосерин не содержат подходящих функциональных групп для присоединения поперечных пептидных шивок.

В 4м положении пептидного фрагмента за редкими исключениями располагается остаток *D*-аланина, связанного через карбоксильную группу с межпептидным линкером. В тех случаях, когда такой линкер отсутствует, *C*-концевой *D*-Ala может отщепляться под действием соответствующей карбоксипептидазы, либо присоединять ещё один остаток *D*-аланина. Таким образом, наряду с тетрапептидами, составляющими большинство случаев, к гликановой цепи могут быть присоединены как трипептидные, так и пентапептидные фрагменты. Модификации *D*-Ala–*D*-Ala редки и заключаются в замене концевого остатка аланина на глицин по причине недостаточной селективности лигазы, синтезирующей этот дипептид. Обычно содержание *C*-концевого глицина не превышает 1%, однако в некоторых видах (например, *Caulobacter crescentus*) может достигать 19%. Наиболее характерна замена аланина в 5й позиции на *D*-Ser или *D*-лактат, например, в случае ряда штаммов бактерий рода *Enterococci*. Эту модификацию относят к устойчивости бактерии к ванкомицину, механизм действия которого заключается в связывании с димером *D*-Ala–*D*-Ala и ингибировании заключительных стадий синтеза пептидогликана [12].

1.1.3. Межпептидный линкер

Наибольшая вариативность структур пептидогликанов достигается за счет различий в строении межпептидного линкера [12]. Все межпептидные линкеры условно подразделяются на две большие группы. К первой группе относят линкеры, связывающие аминокгруппу остатка, находящегося в позиции 3 пептидной субъединицы, и карбоксильную группу *D*-аланина – 4й аминоксилоты другой пептидной субъединицы (Рисунок 2).

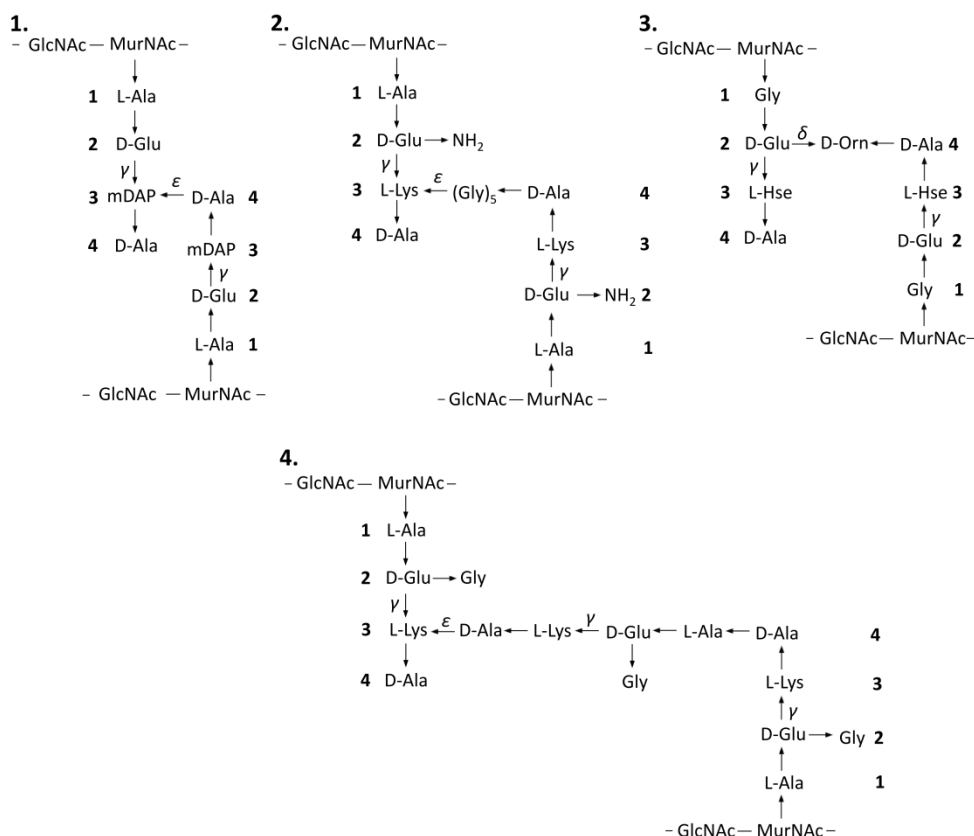


Рисунок 2. Примеры структур пептидных фрагментов различных пептидогликанов. 1 – *Escherichia coli*; 2 – *S. aureus*; 3 – *Corynebacterium pointsettiae*; 4 – *Micrococcus luteus*. Аббревиатуры: GlcNAc – *N*-ацетилглюкозамин; MurNAc – *N*-ацетилмурамовая кислота; mDAP – мезо-диаминопимелиновая кислота; L-Hse – *L*-гомосерин; D-Orn – *D*-орнитин.

Как уже упоминалось выше, это наиболее широко распространенный тип межпептидных линкеров. Соседние пептидные субъединицы могут быть связаны напрямую (большинство грамотрицательных бактерий) или через пептидный мостик (большинство грамположительных бактерий).

Ко второй группе относят линкеры, характерные только для некоторых коринеформных бактерий, особенно для их фитопатогенных видов. В пептидогликане этих бактерий

межпептидный линкер соединяет α -карбоксильную группу *D*-глутамата (в позиции 2) одной пептидной субъединицы и карбоксильную группу *D*-аланина соседней пептидной субъединицы, находящегося в положении 4. Поскольку во 2й группе пептидогликанов *D*-Ala и *D*-Glu соединены с межпептидным линкером карбоксильными группами, то в состав межпептидного линкера всегда входит одна из диаминокислот (Рисунок 2).

Размер межпептидных линкеров (если таковой присутствует) варьирует от 1 до 7 аминокислот. В состав межпептидного мостика могут входить следующие аминокислоты: Gly, *L*-Ala, *L*- или *D*-Ser, *D*-Asp, *D*-Asn, *L*- или *D*-Glu, *L*- или *D*-Lys, *D*-Orn, *D*-аминобутират и др. Разнообразие межпептидных линкеров достигается также за счет дальнейших модификаций аминокислот [13].

Помимо состава межпептидных линкеров, у разных видов бактерий также различается и степень сшитости, которая варьируется от 20% в *E. coli* до 93% в случае *S. aureus*. Другими словами, в клетках *E. coli* большинство молекул пептидогликана (около 50%) не связаны ковалентно с соседними молекулами межпептидными линкерами, около 40% молекул находятся в форме димеров, а олигомеры более высокого порядка составляют меньшинство. Напротив, в случае *S. aureus* в несшитом виде находится менее 10% молекул пептидогликана, в то время как большинство цепей пептидогликана находится в сшитой форме, образуя молекулы, содержащие до 9 цепей гликана. Теоретические расчеты показывают, что в одной макромолекуле число гликановых цепей может достигать 20 [14].

1.1.4. Вариации структуры пептидогликанов

Систематические исследования *E. coli* показали, что структура пептидогликана сильно зависит от характера метаболизма клетки. Это проявляется в том, что состав муропептидов и плотность пептидогликана (количество пептидогликана на единицу поверхности клетки) зависит от условий роста бактериальной клетки [15]. В ряде работ, посвященных механизму включения прекурсоров пептидогликана в клеточную стенку, показано, что вновь синтезированные и старые молекулы пептидогликана различаются по составу муропептидов, из чего сделан вывод о том, что пептидогликан претерпевает некоторый процесс созревания или старения. В *E. coli* только что синтезированный пептидогликан обладает пониженной степенью сшитости, в пептидных субъединицах содержится больше пентапептидов, средняя длина гликановых цепей выше, чем в зрелом пептидогликане [16].

Кроме этого, структура пептидогликана меняется в зависимости от фазы роста клетки, как показано на примере *E. coli*. Переход клетки от экспоненциального роста к стационарной

фазе приводит к значительным изменениям состава пептидогликана и общей структуры клеточной стенки. Наиболее значимые изменения касаются степени сшитости пептидогликана, которая возрастает до 36 – 42% муропептидов, образующих сшивки, средней длины гликана, которая уменьшается примерно вдвое с 30 – 35 до 15 – 18 дисахаридов в цепи. Также возрастает число муропептидов, связанных с липопротеинами (8 – 10% в экспоненциальной фазе роста, 15 – 18% – в стационарной). Описанные изменения обратимы, то есть при возврате культуры клеток в стадию экспоненциального роста, указанные выше параметры возвращаются к исходным значениям [17].

Помимо собственно молекулярной структуры пептидогликана, *E. coli* способны варьировать количество пептидогликана, приходящегося на единицу площади клетки, в зависимости от условий культивирования. В случае, если культура клеток имела ограниченный доступ к прекурсерам пептидогликана, *E. coli* оказались способны уменьшать плотность пептидогликана вдвое по сравнению с нормой при сохранении типичной морфологии и скорости роста. Авторы предполагают, что способность *E. coli* уменьшать содержание пептидогликана помогает пережить временное ингибирование биосинтеза пептидогликана, таким образом увеличивая шансы на выживание [18].

К настоящему моменту детальных исследований о структуре пептидогликана разных видов бактерий в разных условиях нет. Однако очевидно, что структура пептидогликана может быть в крайней степени вариативна, исходя из разнообразия химического состава разных пептидогликанов и вариаций поперечных сшивок. Поэтому предположительно не существует оптимальных или стандартных значений параметров пептидогликана (длина гликановых цепей, степень сшитости). Напротив, каждый вид бактерий использует наиболее оптимальный для себя набор параметров в зависимости от условий роста [12].

В итоге можно заключить, что независимо от структуры пептидогликана, от наличия или отсутствия межпептидного мостика, наличие сшивок пептидных фрагментов, связанных с соседними цепями гликана, приводит образованию трёхмерной разветвленной структуры, которая и определяет особенности пептидогликанового слоя.

1.1.5. Сайты гидролиза пептидогликана

Исходя из строения клеточной стенки бактерий, для её разрушения могут быть использованы ферменты различной специфичности, которые в англоязычной литературе называются лизины (lysins). Поскольку по написанию и произношению в русском языке это

слово ассоциируется с аминокислотой лизином, во избежание путаницы далее по тексту будет использован термин "пептидогликангидролазы".

1.2. Классификация пептидогликангидролаз. Строение и катализ

К текущему моменту сложилось несколько способов классификации пептидогликангидролаз [6]. В настоящей работе мы в деталях рассмотрим классификацию, в основе которой лежит тип ферментативной активности.

Несмотря на многообразие структурных элементов в пептидогликане, ферментативному лизису подвергается лишь ограниченный набор ковалентных связей. Ограниченное количество сайтов гидролиза связано в первую очередь с тем, что пептидогликан всех бактерий скомпонован схожим образом. По способу гидролиза пептидогликана ПЛФ бактериофагов делятся на три большие группы, описанных ниже [19].

1.2.1. Ферменты, гидролизующие связи между остатками сахаров

Представители этой группы ферментов гидролизуют гликозидные связи между остатками *N*-ацетилглюкозамина и *N*-ацетилмурамовой кислоты. Среди ферментов, представленных в группе можно выделить *N*-ацетилглюкозаминидазы, катализирующие гидролиз гликановой цепи с образованием восстанавливающей группы со стороны *N*-ацетилглюкозамина (1 на Рисунке 3), и лизоцимподобные ферменты, катализирующие гидролиз β -1,4 гликозидной связи между остатками *N*-ацетилглюкозамина и *N*-ацетилмурамовой кислоты в гликановой цепи пептидогликана (2 на Рисунке 3).

N-ацетилглюкозаминидазы являются скорее исключением, чем правилом среди пептидогликангидролаз. Этот тип активности преимущественно характерен для автолизиннов бактерий [19], однако в качестве примера фермента с *N*-ацетилглюкозаминидазной активностью можно привести фермент бактериофага λ Sa2, который катализирует гидролиз связи между остатками *L*-аланина и *N*-ацетилмурамовой кислоты [20].

Лизоцим-подобные ферменты, напротив, являются характерными представителями пептидогликангидролаз. Исходя из особенностей трехмерной структуры и эволюционного родства лизоцимов, их относят к нескольким типам. Наиболее известны лизоцимы С-типа (chicken-type), G-типа (goose-type) и V-типа (virus-type). Ферменты, относящиеся к указанным типам, не выявляют между собой статистически значимой гомологии аминокислотных последовательностей, в то же время ферменты разных типов обладают общими особенностями трехмерной структуры.

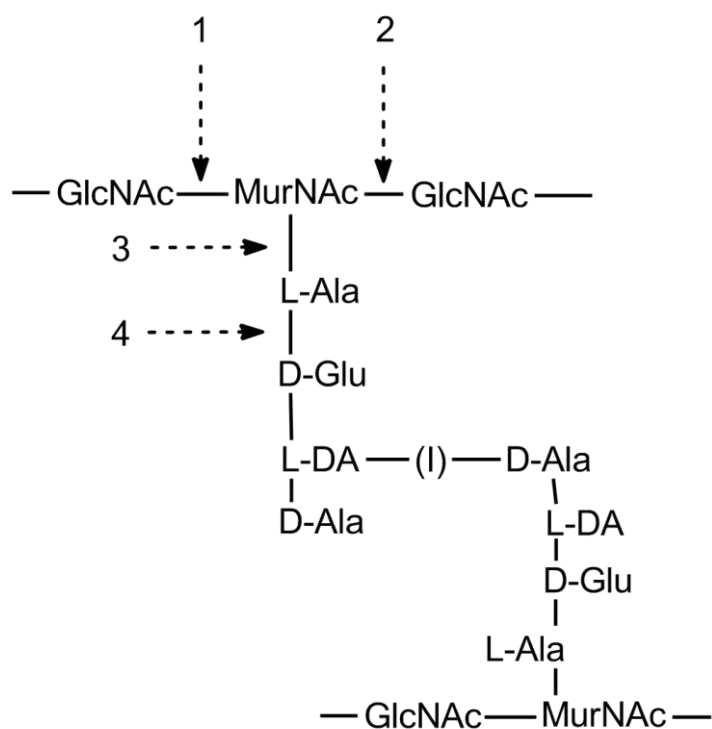


Рисунок 3. Схема расположения сайтов гидролиза пептидогликана под действием различных пептидогликангидролаз.

Анализ структурных соответствий ферментов С-, G-, и V-типов позволил выдвинуть предположение о наличии общего эволюционного предшественника для всех лизоцимов [21]. К лизоцимподобным ферментам относятся мурамидазы и литические трансгликозилазы (КФ 3.2.1.17). В качестве примеров примеров фаговых мурамидаз можно привести ферменты *Cpl-1* бактериофага Cp-1 [22], *grE* бактериофага T4 [23], в качестве литических трансгликозилаз – ферменты *gp144* фага PhiKZ [24], *gpR* фага λ [25].

Мурамидазы. Механизм гидролиза пептидогликана, катализируемого мурамидазами, показан на рисунке 4 слева (на примере куриного лизоцима)[26,27]. На начальной стадии каталитического акта происходит связывание субстрата с активным центром фермента. Для этого у лизоцима есть субстрат-связывающий центр, способный вместить 6 остатков сахаров гликановой цепи пептидогликана (нумеруются обычно латинскими буквами А–F либо номером позиции -2–4). В активном центре фермента расположен остаток Glu35, выступающий в роли донора протона для гликозидного атома кислорода расщепляемой связи. В результате разрушения связи образуется положительно заряженный оксокарбониевый интермедиат. Образование этого интермедиата энергетически выгодно, благодаря переходу остатка *N*-ацетилмурамовой кислоты в положении D из низкоэнергетической конформации «кресло» в высокоэнергетическую конформацию «диван», которая становится выгодной за счет

электростатического взаимодействия интермедиата с депротонированным остатком Asp52. На следующей стадии уходящая группа освобождает позицию E, в которую заходит молекула воды, активированная остатком Glu35. Эта молекула воды атакует C1 атом углерода оксокарбониевого интермедиата на заключительной стадии каталитического акта. После публикации этого механизма в 1967 году, он подвергся некоторым уточнениям. В особенности это коснулось роли остатка аспарагиновой кислоты, а также конформационных изменений остатка сахара, находящегося в положении D субстрат-связывающего центра. Так, для механизма действия мурамидазы бактериофага T4 были предложены два альтернативных механизма. Согласно одному из них депротонированный остаток аспарагиновой кислоты (Asp52 в курином лизоциме) может выступать в роли нуклеофила и образовывать промежуточную ковалентную связь с субстратом [28]. Согласно второму механизму, остаток аспартата может выступать в роли основания, активируя воду для дальнейшей нуклеофильной атаки [29]. Конформационные изменения остатка *N*-ацетилмурамовой кислоты в положении D были описаны после того, как удалось решить структуры комплексов лизоцима фага T4 и лизоцима из куриных яиц с некоторыми олигосахаридами [29,30].

Трансгликозилазы. Механизм гидролиза β -1,4 связи под действием трансгликозилаз в деталях показан на примере ферментов, Slt70, MltB, обнаруженных в периплазматическом пространстве *E. coli* и обладающих высокой степенью гомологии с ферментом grR фага λ [31,32]. В отличие от куриного лизоцима трансгликозилазы не содержат остатка аспарагиновой кислоты в активном центре; помимо этого в результате расщепления гликозидной связи образуются невосстанавливающие 1,6-ангидромуропептиды. Это указывает на значительные отличия в механизмах катализа мурамидазами и трансгликозилазами. Предложенный механизм катализа трансгликозилазами изображен на рисунке 4 справа. Первая стадия реакции – образование оксокарбониевого интермедиата при участии Glu478 трансгликозилазы Slt70 – аналогична первой стадии каталитического акта в случае куриного лизоцима. На следующей стадии в случае катализа Slt70, гидроксильная группа при 6м атоме углерода в омотатке ацетилмурамовой кислоты осуществляет нуклеофильную атаку на C1-атом оксокарбониевого иона. Такая атака возможна в том случае, если шестичленное кольцо ацетилмурамовой кислоты находится в конформации «ванна», а гидроксиметильная группа при пятом атоме углерода занимает аксиальное положение. Только тогда гидроксильная группа при шестом атоме углерода в кольце оптимально располагается по отношению к C1-атому углерода для нуклеофильной атаки. Остаток Glu478, ответственный за катализ, также

может принимать участие в активации С6-гидроксильной группы, оттягивая соответствующий протон.

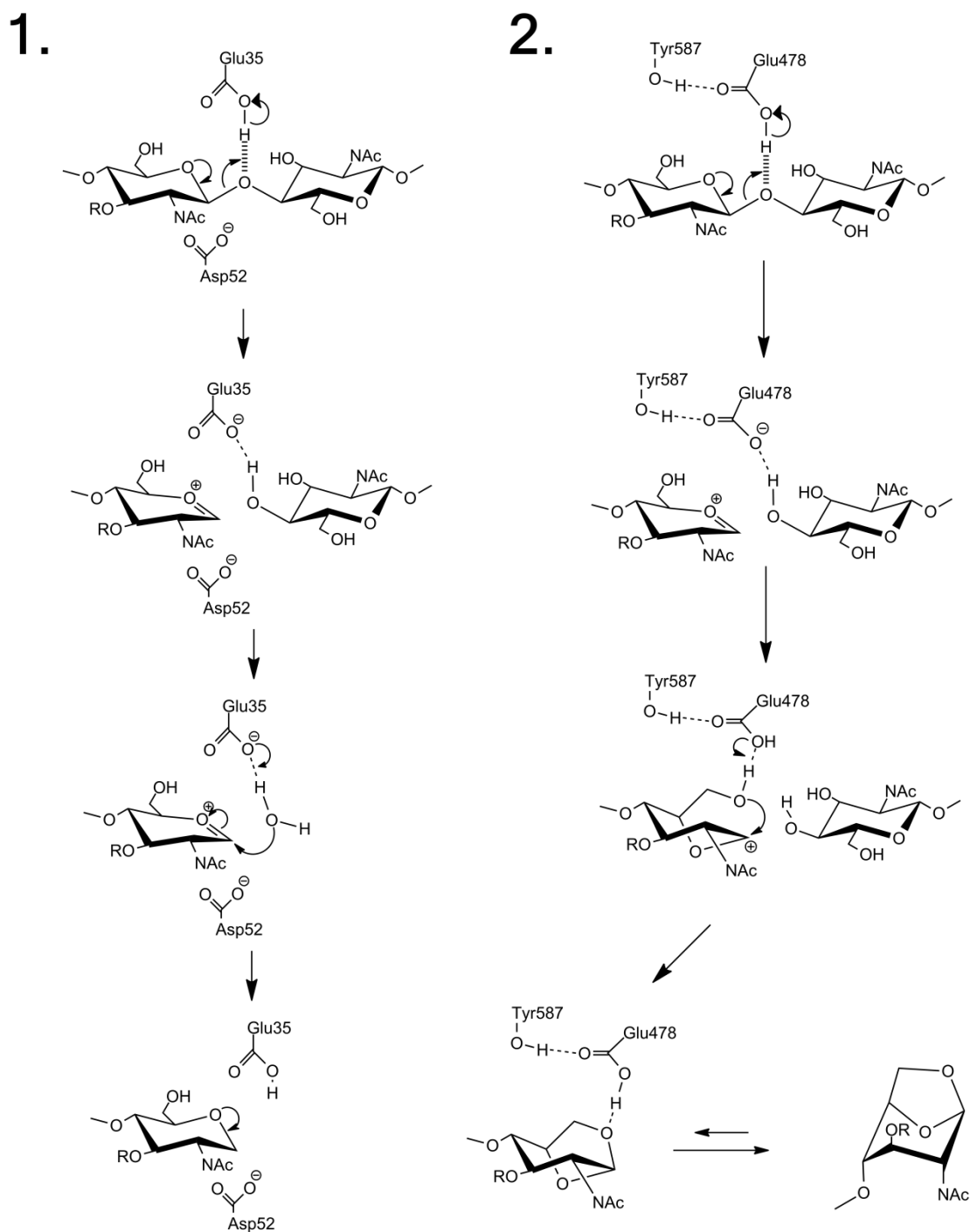


Рисунок 4. Механизм каталитического гидролиза пептидогликана под действием мурамидаз (1) и трансгликозилаз (2). Нумерация аминокислотных остатков в механизме действия мурамидаз соответствует куриному лизоциму, в механизме действия трансгликозилаз – ферменту Slt70 [31]. Glu478 в Slt70 эквивалентен Glu35 в молекуле куриного лизоцима, однако аналога Asp52 из молекулы куриного лизоцима в структуре Slt70 нет.

Отсутствие аналога остатка аспарагиновой кислоты в каталитическом центре трансгликозилаз объясняется тем, что оксокарбониевый интермедиат в случае внутримолекулярной нуклеофильной атаки существует более короткое время, так как в данном случае отсутствует медленная стадия замены уходящей группы на молекулу воды, как в случае механизма катализа мурамидазами. Еще одна возможная причина отсутствия аналога Asp заключается в том, что оксокарбониевый ион может быть стабилизирован взаимодействием с карбонильным атомом кислорода *N*-ацетильной группы субстрата [33].

1.2.2. Ферменты, гидролизующие связь между гликаном и пептидным фрагментом

***N*-ацетилмурамоил-*L*-аланин амидазы** – это ферменты, гидролизующие амидную связь между остатком *N*-ацетилмурамовой кислоты в гликановой цепи и *L*-аланином пептидной части пептидогликана. Наиболее изученный фермент с этим типом активности является *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланин амидаза бактериофага T7 [34].

Структура активного центра этого фермента и механизм катализа схожи с таковыми для карбоксипептидазы А и термолизина. Ключевые взаимодействия и превращения, происходящие за каталитический акт включают три ключевые стадии (Рисунок 5): взаимодействие положительно заряженного остатка (Arg127 в карбоксипептидазе А или His 231 в термолизине) с карбонильной группой субстрата; нуклеофильная атака молекулы воды, активированной ионом цинка и отрицательно заряженным остатком (Glu270 в карбоксипептидазе А или Glu143 в термолизине); диссоциация переходного комплекса и протонирование уходящей аминогруппы [34]. Каталитическая роль фермента в этой реакции заключается в дестабилизации амидной связи. За счет поляризации С–О карбонильной связи атом углерода переходит в состояние sp^3 -гибридизации, в следствие чего уменьшается делокализация π -связи, что ведет к увеличению длины амидной связи и ее реакционной способности [6].

1.2.3. Пептидазы

Пептидогликангидролазы бактериофагов, обладающие пептидазной активностью, гидролизуют одну из связей между аминокислотами в пептидной части пептидогликана. Наиболее изученным со структурной точки зрения ферментом этой группы является эндопептидаза Ply500 бактериофага A500 [35].

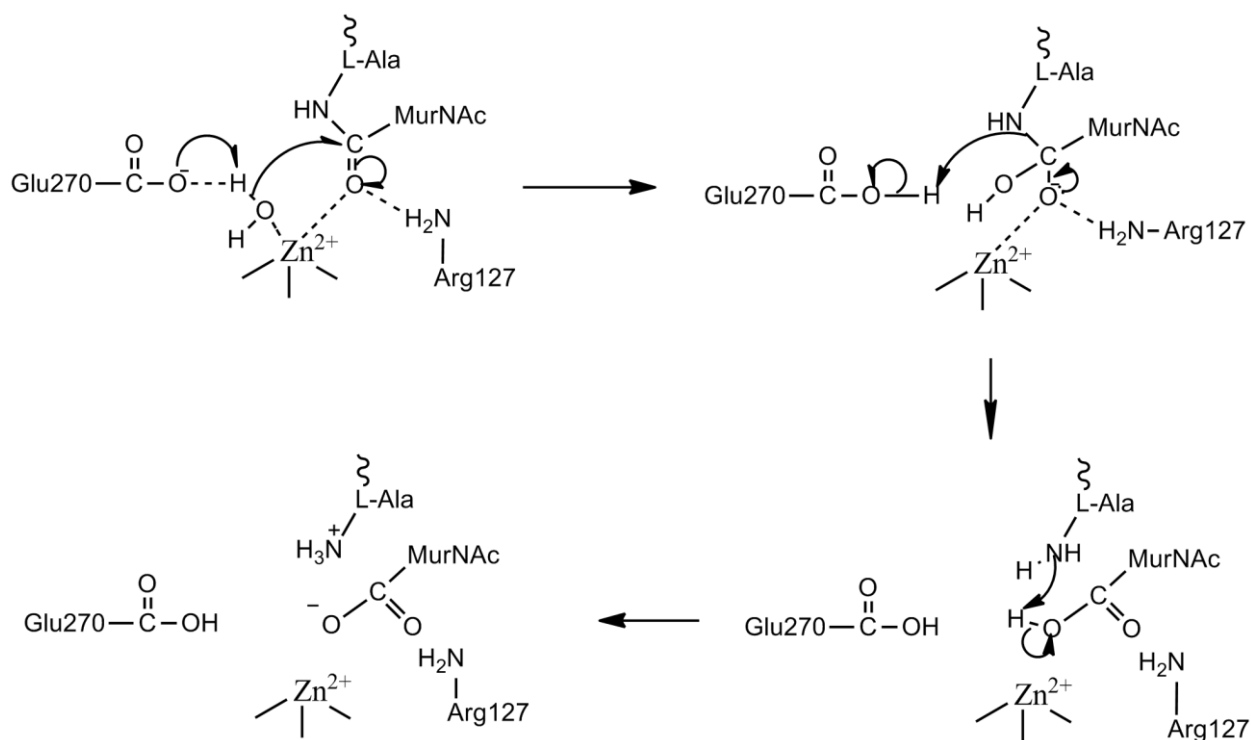


Рисунок 5. Механизм каталитического гидролиза пептидогликана под действием *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланин амидаз. Нумерация остатков аминокислот по кабоксипептидазе А.

Ply500 гидролизует связь между остатками *L*-Ala и *D*-Glu в пептидной части пептидоглиткана (1й и 2й а.о., считая от *N*-ацетилмурамоила). Структура молекулы фермента образована двумя доменами: *N*-концевой домен отвечает непосредственно за каталитическую активность, а *C*-концевой – за связывание с субстратом. Такой тип организации молекулы пептидогликангидролаз называют модульной архитектурой или модульной структурой. Подробнее речь об этой особенности строения пойдет в следующих разделах обзора литературы.

Механизм гидролиза пептидной связи аналогичен механизму действия *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланин амидаз, который обсуждался выше. Вкратце, механизм включает в себя три ключевые стадии. Сначала происходит активация молекулы воды ионом цинка и остатком, действующим в роли основания (Asp130 в Ply500). На следующей стадии происходит нуклеофильная атака карбонильной группой атома углерода пептидной связи. Получившийся тетрагональный интермедиат стабилизирован ионом цинка и остатками Gln55 и Arg50 (Рисунок 5). Расположение соответствующих остатков и их природа в разных ферментах семейства обеспечивают различную субстратную специфичность [35].

1.2.4. Структурная организация пептидогликангидролаз

Говоря о структуре пептидогликангидролаз бактериофагов, целесообразно рассматривать отдельно ферменты, специфичные к грамположительным бактериям и к грамотрицательным бактериям. Внутри каждой из двух групп пептидогликангидролазы обладают рядом общих особенностей, обусловленных различиями в строении клеточных стенок грамотрицательных и грамположительных бактерий [36]. ПЛФ специфичные к грамположительным бактериям обладают так называемой модульной структурой. Это подразумевает наличие отдельного домена, ответственного за катализ и домена, узнающего специфический субстрат [37]. Каталитический домен непосредственно отвечает за гидролиз одной из связей пептидогликана, в то время как домен узнавания способствует правильной ориентации молекулы фермента на субстрате и удерживанию фермента на дебрисе после лизиса клетки, предотвращая диффузию фермента и последующее разрушение клеток, которые еще не были заражены вирусными частицами [38]. В то же время в случае грамотрицательных микроорганизмов подобного второстепенного лизиса клеток не наблюдается в силу особенностей строения клеточной стенки. Возможно по этой причине пептидогликангидролазы, специфичные к грамотрицательным микроорганизмам, в большинстве своем являются небольшими ферментами, как правило менее 20 кДа, в структуре которых отсутствует узнающий домен [39]. Такие ферменты способны многократно осуществлять свою каталитическую функцию, в отличие от ПЛФ, специфичных к грамотрицательным бактериям, крайне прочно связывающимися с клеточными стенками бактерий [38,40]. Однако есть два исключения из этой общей тенденции: ПЛФ бакетрифагов EL188 и KZ, специфичные к грамотрицательным бактериям *Pseudomonas aeruginosa*, обладают модульной архитектурой. Каждая из молекул этих ферментов образована двумя доменами, из которых N-концевой домен отвечает за связывание с субстратом, а C-концевой – за каталитическую активность [39,41]. Пептидогликангидролазы бактериофагов, специфичные к грамположительным бактериям организованы наоборот, то есть их C-концевой домен связывается с субстратом, а N-концевой отвечает за гидролиз [37]. Однако не все пептидогликангидролазы соответствуют описанной модульной архитектуре. В литературе имеется ряд примеров пептидогликангидролаз, организованных совершенно другим образом [37]. Наиболее яркими примерами являются стафилококковые пептидогликангидролазы, часто состоящие из двух каталитических доменов с N-конца и одного субстрат-связывающего домена с C-конца [42,43], пептидогликангидролазы, организованные по типу стрептококкового

эндолизина бактериофага λ SA2, содержащего узнающий домен в середине полипептидной цепи и два терминальных домена [20]. Также существует отдельная группа ферментов, узнающие домены которых содержат до 18 повторов аминокислотного мотива, состоящего из 20 а.о. Такая организация узнающего домена характерна для пептидогликангидролаз бактериофагов, связывающихся с тейхоевыми кислотами бактерии *Streptococcus pneumoniae* [44].

Практически все пептидогликангидролазы, специфичных к грамположительным бактериям, являются продуктами одного гена. Исключением является эндолизин PlyC бактериофага C1, инфицирующего стрептококки группы А. Этот эндолизин представляет собой мультимерный белок, состоящий из двух типов субъединиц PlyCA и PlyCB, являющихся продуктами разных генов [45]. Молекула этого белка представляет собой комплекс, образованный одной субъединицей PlyCA, содержащей активный центр и восемь субъединицами PlyCB, отвечающими за связывание с субстратом. Этот фермент обладает максимальной удельной активностью среди известных пептидогликангидролаз [45].

1.3. Перспективы использования пептидогликангидролаз бактериофагов на практике

В свете быстрорастущей устойчивости бактерий к антибиотикам в ближайшем будущем для контроля патогенной микрофлоры потребуются антибактериальные агенты, устойчивость к которым у бактерий не развивается. Предполагается, что коэволюция бактериофагов и их хозяев привела к тому, что пептидогликангидролазы бактериофагов для связывания и гидролиза используют крайне консервативные и неизменяемые участки пептидогликана. Поэтому вероятность формирования устойчивости бактерий к таким ферментам очень низка, иначе бактериофаги постепенно исчезли бы в ходе естественного отбора. Подобные предположения подтверждаются работами, в которых клетки *S. pneumoniae* и *B. anthracis* подвергались действию низких концентраций эндолизинов. Даже ускорение мутагенеза бактерий под действием этилового эфира метансульфоново́й кислоты не привело к появлению штаммов, устойчивых к действию эндолизинов. В то же время аналогичная методика привела к усилению устойчивости исследуемых бактерий по отношению к новобицину и стрептомицину на 3 – 4 порядка [46]. Несмотря на эти оптимистичные факты, известны случаи устойчивости бактерий к пептидогликангидролазам. Устойчивость к лизису под действием лизоцима человека может быть достигнута, например, *O*-ацетилированием или *N*-деацетилированием пептидогликана [11]. Модификация гидролизуемых участков в пептидогликане или сайтов связывания также

может приводить к резистентности бактерий по отношению к пептидогликангидролазам [36], однако на данный момент не известно случаев возникновения подобного рода.

С точки зрения безопасности применения большое преимущество пептидогликангидролаз заключается в их специфичности. Это свойство позволяет воздействовать исключительно на целевую группу бактерий, не затрагивая нейтральную микрофлору, что невозможно в случае применения традиционных антибиотиков и антисептиков. Однако системное применение этих ферментов несет риск высвобождения в кровь фрагментов клеточных стенок разрушенных бактерий, включая фрагменты пептидогликана и тейхоевых кислот. Этот эффект может приводить к развитию воспалительного процесса, как показано на примере внутривенного введения Cpl-1, что вызвало резкое увеличение концентрации провоспалительных цитокинов в крови мышей [47].

При системном применении белковых препаратов нельзя обойти вниманием вопрос возникновения иммунного ответа. Очевидно, что наличие чужеродных ферментов в кровотоке вызывает появление соответствующих антител, что подтверждается экспериментально. Иммунизация кроликов пептидогликангидролазой Cpl-1 пневмококкового бактериофага приводит к понижению антипневмококковой активности в гиперимунной сыворотке, хотя фермент не инактивируется полностью [48]. В нескольких работах, посвященных другим эндолизинам и патогенам (*Streptococcus pyogenes*, *B. anthracis* и *S. aureus*) также показано появление антител в сыворотке крови мышей. Но при повторной иммунизации мышей эндолизином побочных эффектов или анафилактической реакции зафиксировано не было; так же как и в предыдущем случае, выработанные антитела не уменьшали полностью ферментативную активность эндолизинов. В качестве объяснения этих эффектов авторами работы высказывается мнение о том, что эпитопами на поверхности ферментов могут быть участки, не включенные напрямую в каталитический акт, а скорость ферментативного гидролиза может быть выше скорости инактивации фермента под действием антител [46].

Отсутствие полной потери активности пептидогликангидролаз в кровотоке делает возможным систематическое введение эндолизинов для контроля бактеремии соответствующего типа, наряду с наружным применением. Успешным оказалось применение эндолизина стрептококкового фага PlyC на мышах, верхние дыхательные пути которых были заражены стрептококками группы А. Причем эффективной оказалась как предварительная обработка ротовой полости мышей перед инокуляцией бактериями (>70% мышей избежали бактеремии по сравнению с <30% мышей в контрольной группе), так и постобработка эндолизином ротовой полости мышей с уже развитой инфекцией (после применения 500 ед.

PlyC после 2 часов инкубации *S. pneumoniae* не детектируются) [49]. Аналогичные положительные результаты также были показаны в случае применения антистрептококкового эндолизина PlyGBS при вагинальной и орофарингеальной колонизации стрептококков группы В [50]. При системной инокуляции мышей *S. pneumoniae* с последующим введением 2 мг Crp-1 после 1 часа инкубации бактерии в крови не детектировались; 100% инфицированных мышей выжили по сравнению с 20% выживших в контрольной группе [48]. Положительные результаты также были достигнуты в случае использования различных пептидогликангидролаз для лечения мышей, пораженных *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, включая формы, устойчивые к антибиотикам [51,52].

Использование пептидогликангидролаз в пищевой промышленности и сельском хозяйстве получило меньшее внимание, чем их использование в медицине, но в последнее время число публикаций по этой теме растет. Особое внимание уделяется сравнению эффективности живых бактериофагов и их эндолизинов. Специфичность эндолизинов к субстратам и бактериофагов к своим хозяевам предоставляет разные потенциальные возможности для контроля и определения микроорганизмов в пище. Как правило, специфичность бактериофагов достаточно узкая, обычно ограничивается одним видом бактерии. Более широкоспецифичные эндолизины бактериофагов могут найти свое применение в тех случаях, когда требуется контроль широкого спектра видов микроорганизмов для продления срока хранения того или иного продукта, тогда как узкая специфичность некоторых эндолизинов будет незаменима для предотвращения гибели бактерий, обеспечивающих правильную ферментацию. В качестве примера здесь можно привести эндолизин фага phiSTP1, который успешно был использован для подавления *C. tyrobutyricum* при ферментации сыра без оказания влияния на микроорганизмы, обеспечивающие созревание продукта [53]. Наряду с этой работой в последние несколько лет было получено много результатов, доказывающих эффективность применения эндолизинов в жидких молочных продуктах для борьбы с грамположительными бактериями [54]. В случае грамотрицательных бактерий, для которых лизис извне осложнен наличием дополнительной липидной мембраны, применение эндолизинов может оказывать бактериостатический эффект, как показано в случае *Erwinia amylovora* на поверхности груш. Гибель грамотрицательных бактерий наблюдалась в тех случаях, когда эндолизины, специфичные к грамотрицательным бактериям применялись совместно с веществами, облегчающими доставку фермента через внешний липидный слой к пептидогликану. Такой подход оказался эффективен в случае

куриного лизоцима в присутствии ЭДТА и низина в применении к сыру, мясному фаршу и мясным полуфабрикатам [55,56].

В сельском хозяйстве, помимо использования очищенных ферментов, пептидогликангидролазы можно получать с помощью трансгенных растений, благодаря чему растение становится устойчивым к соответствующему фитопатогену. С помощью такого подхода был создан картофель несущий ген лизоцима T4, устойчивый к действию *Erwinia carotovora* – фитопатогену, вызывающему мокрую гниль [57]. Фермент нарабатывался в клетках растений и контактировал с возбудителем, когда бактериальные пектиназы разрушали клеточную стенку. Растения также могут быть использованы в качестве биореакторов для получения ферментов не для собственной защиты, а в качестве недорогого и легко масштабируемого способа получения противомикробных белков для дальнейшего применения в медицине и ветеринарии. Такая система была создана на основе табака, который синтезировал эндолизины Cpl-1 и Pal, специфичные к *S. pneumoniae* и PlyGBS, специфичный к стрептококкам группы В. Содержание целевого белка при таком способе синтеза достигало 70% от общего растворимого белка клетки [58].

В скотоводстве пептидогликангидролазы были использованы для уменьшения риска перехода патогенов от животных в продукты питания. Мастит – воспаление молочных желез – распространенное заболевание крупного рогатого скота, приносящее огромные убытки. Лечение мастита традиционными антибиотиками часто бывает неэффективно и вносит значительный вклад в распространение резистентности бактерий к антибиотикам в экосистеме. Одна из наиболее распространенных причин мастита коров – стафилококковая инфекция, поэтому лизостафин был одним из первых ферментов, который рассматривался в качестве альтернативы классическим антибиотикам для лечения и профилактики мастита. Было показано, что инъекции лизостафина в сосковые каналы эффективны против инфекции, вызванной *S. aureus*, как в случае моделирования заболевания на мышах, так и в случае экспериментов на коровах [59].

Эндолизины бактериофагов перспективны не только для профилактики и лечения заболеваний животных, но и в качестве дезинфектантов оборудования и различных поверхностей. Такой способ применения был предложен для эндолизина PlyC в применении к обеззараживанию рабочих поверхностей в конюшнях для предотвращения заражения патогеном *Streptococcus equi*, который вызывает удушье лошадей. Сравнение PlyC и традиционного дезинфектанта VirkonS показало, что 1 мкг фермента способен уничтожить 10^8 КОЕ/мл в течение 30 минут, что превышает аналогичные показатели VirkonS в 1000 раз [60].

В перспективе применение эндолизинов бактериофагов не ограничивается средствами терапии и дезинфекции. Эндолизины можно использовать при извлечении ДНК и внутриклеточных белков при получении компонентов клеток – исходного сырья в производстве вакцин, при производстве селективных сорбентов и методов детекции грамположительных клеток.

В целом, за последние 10 лет число публикаций, описывающих выделение и характеристику новых пептидогликангидролаз, неуклонно растет вместе с ростом числа публикаций о скоротечном развитии резистентности клинических штаммов бактерий к антибиотикам. С точки зрения перспектив применения пептидогликангидролаз в медицине авторами многих процитированных выше работ высказывается мнение о том, что пептидогликангидролазы особенно подходят для наружного применения – такой способ позволяет убрать или по крайней мере уменьшить риски использования ферментов, связанные с системным введением белковых препаратов, такие как иммунные реакции на сам белок или на компоненты разрушенных клеток бактерий. Говоря о потенциале пептидогликангидролаз в области пищевой промышленности, стоит отметить, что в настоящее время присутствие активных ферментов в готовом продукте не допускается согласно СанПиН 2.3.2.1293-03, аналогичные законодательные меры действуют также и на территории США. Однако в этом аспекте можно ждать положительных изменений, исходя из решения Комиссии по контролю медикаментов и продуктов питания США о разрешении использования бактериофагов листерии в некоторых пищевых продуктах и совокупности результатов, доказывающих эффективность пептидогликангидролаз, о которых говорилось выше. Глядя на список процитированных в данном обзоре работ можно заметить, что большинство упомянутых примеров использования пептидогликангидролаз касаются грамположительных микроорганизмов. Применение ферментов этого семейства против грамотрицательных микроорганизмов ограничено наличием внешнего липидного бислоя, который покрывает пептидогликан и препятствует доступу к нему литических ферментов. Недавние работы, показывают, что применение пептидогликангидролаз, специфичных к грамотрицательным бактериям совместно с веществами, способствующими прохождению фермента через внешний липидный бислой, дает возможность применению последних на практике.

1.4. Количественное измерение ферментативной активности пептидогликанлизирующих ферментов

Гидролиз пептидогликана под действием эндолизинов приводит к лизису клетки, то есть к ее гибели и фрагментированию на составные части. Распад клетки можно детектировать с помощью различных макроскопических явлений, которым можно соотнести то или иное численное значение, которое будет соотноситься с причиной лизиса – гидролизом пептидогликана. В данной работе лизис клеток мы отслеживали двумя разными способами. В экспериментах с суспензиями клеток мы фиксировали скорость падения оптической плотности (метод турбидиметрии), а в случае лизиса газонных клеток *E. coli* – изменение КОЕ во времени. Помимо этого действие бактериолитических ферментов можно наблюдать по просветлению зоны внутри матрицы геля, в котором зафиксированы клетки или пептидогликан (т.н. зимограмма) и по ингибированию роста культуры [36].

Возвратимся подробнее к методам, использованным в текущей работе. Метод, основанный на изменении числа жизнеспособных клеток в системе, строго говоря, является непрямым. Однако он находит широкое применение по двум основным причинам. Во-первых, лизис клетки является прямым следствием гидролиза пептидогликана, поэтому скорость снижения КОЕ в системе опосредованно связана со скоростью реакции гидролиза. Во-вторых, во многих работах эндолизины рассматриваются с точки зрения их антибактериальной активности, поэтому снижение числа жизнеспособных клеток в таких случаях является целевым показателем эффективности действия фермента. Количество КОЕ определяют посевом культуры на агаризованную среду с последующим подсчетом колоний. Для удобства, а также для снижения погрешности уменьшение числа КОЕ выражают как $\log_{10}(N_0/N_i)$, где N_0 – число КОЕ в контроле, а N_i – после обработки ферментом. Такой логарифмический параметр равен 0, когда лизиса клеток нет, сверху он ограничен некоторым значением чувствительности и показывает, на сколько порядков уменьшается титр клеток после обработки культуры ферментом [61].

Метод турбидиметрии традиционно используется для измерения активности бактериолитических ферментов по отношению к суспензии бактериальных клеток. Однако при интерпретировании результатов, полученных этим методом, необходимо понимать соответствие между просветлением суспензии и изменением титра жизнеспособных клеток. И здесь есть несколько обстоятельств, которые необходимо принимать во внимание. Во-первых, зависимость оптической плотности суспензии от титра клеток линейна лишь на начальном

участке. В случае *E. coli* линейность сохраняется приблизительно до $OD_{600} = 1$ (Рисунок 6 слева) [62]. Это позволяет достаточно точно оценивать титр клеток, исходя из оптической плотности, внутри линейного интервала. Во-вторых, даже после длительной икубации клеток с бактериолитическим ферментом, оптическая плотность далека от 0 за счет рассеяния света на фрагментах лизированных клетках. Иными словами полный лизис всех клеток не соответствует значению $OD_{600} = 0$ (Рисунок 6 справа).

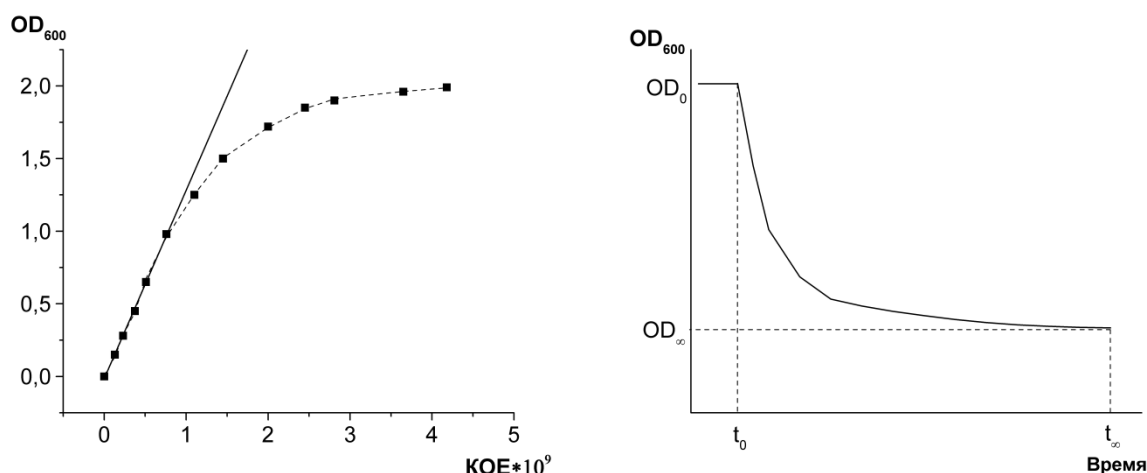


Рисунок 6. Слева: зависимость OD_{600} от титра клеток в суспензии. Справа: схематическое представление изменения оптической плотности в процессе ферментативного лизиса клеток [62].

Для того, чтобы связать оптическую плотность с падением титра клеток, вводят параметр Θ_{OD} , степень лизиса:

$$\Theta_{OD}(t) = \frac{OD_0 - OD(t)}{OD_0 - OD_\infty} \quad (1)$$

Здесь OD_0 – начальное значение оптической плотности, OD_∞ – конечное значение оптической плотности, $OD(t)$ – текущее значение оптической плотности. Из уравнения (1) видно, что параметр Θ_{OD} меняется в диапазоне от 0 до 1, где 0 соответствует началу лизиса, а 1 – полному лизису клеток. Внутри одной партии клеток знаменатель уравнения (1) является постоянной величиной. Поэтому уравнение можно упростить:

$$\Theta_{OD}(t) = \alpha(OD_0 - OD(t)) \quad (2)$$

Отсюда скорость ферментативного лизиса можно получить следующим образом:

$$V = \frac{d\Theta(t)}{dt} = -\alpha \frac{dOD(t)}{dt} \quad (3)$$

Степень лизиса также можно выразить через количество живых клеток. Причем такая оценка будет независимой от оценки степени лизиса через оптическую плотность:

$$\Theta_{KOE}(t) = 1 - \frac{KOE(t)}{KOE_0}$$

Экспериментальные данные показывают, что в случае *E. coli* обе оценки степени лизиса хорошо согласуются друг с другом [62]. Поэтому оценка ферментативной активности эндолизиннов через изменение оптической плотности может быть адекватно использована для описания их физико-химических свойств.

2. Внешняя мембрана *E. coli* и существующие подходы к ее дестабилизации

Разработка методов дестабилизации внешней мембраны грамотрицательных бактерий и подбор агентов, в присутствии которых пептидогликангидролазы будут проявлять активность по отношению к грамотрицательным клеткам, основаны на сведениях о строении внешней мембраны. Обзор особенностей строения внешней мембраны будет представлен на примере *E. coli*, как наиболее всесторонне изученного микроорганизма, принадлежащего к грамотрицательным бактериям.

Структура клеточной стенки *E. coli* и других бактерий была определена после того, как получила свое развитие техника электронной микроскопии. Первые работы по определению деталей структуры клеточной стенки *E. coli* были осуществлены в 50 – 60е года XX века [63–65]. Микрофотографии тонких срезов культуры клеток *E. coli* показали, что клеточная стенка грамотрицательных бактерий трехслойная и состоит из двух липидных бислоев, разделенных пептидогликаном.

Внешняя мембрана *E. coli* состоит из двух типов липидов – липополисахаридов (ЛПС) и фосфолипидов; также в состав внешней мембраны входит набор ряда белков, краткий обзор которых будет дан позднее. Основные компоненты внешней мембраны *E. coli* перечислены в таблице 1 [66,67].

Таблица 1. Основные компоненты внешней мембраны

Компонент	Количество молекул на клетку (10^5)	Количество остатков жирных кислот на клетку (10^5)	Занимаемая площадь на (μ^2)
Липополисахариды	34,6	242	4,9
Порины + OmpA	2		1,8
Липопротеины	7	21	0,5
Фосфолипиды	87	174	4,1

Характерной особенностью внешней мембраны бактерий семейства *Enterobacteriaceae* является наличие уникального полисахарида – общего энтеробактериального антигена (ECA) [66]. Ниже рассмотрим основные компоненты внешней мембраны в отдельности.

2.2. Липиды и липополисахариды

Набор фосфолипидов, входящих в состав внешней мембраны *E. coli*, практически не отличается от набора фосфолипидов цитоплазматической мембраны. Наблюдается лишь

незначительное преобладание фосфатидилэтаноламина. В свою очередь, липидный состав плазматической мембраны варьирует в зависимости от штамма и условий роста. Как правило, для *E. coli* и *Salmonella* он содержит 70–80% фосфатидилэтаноламина, 15–25% фосфатидилглицерида, 5–10% кардиолипина. В малых количествах в качестве прекурсоров или продуктов деградации в цитоплазматической мембране присутствуют фосфатидная кислота, производные фосфатидилсерина, лизофосфолипидов, диацилированные производные глицерина [68].

Помимо фосфолипидов в состав внешней мембраны входят липополисахариды (ЛПС) [69]. Молекулы ЛПС состоят из трех основных частей: гидрофобный липид А, центральный олигосахарид и О-полисахарид, называемый также О-антиген (Рисунок 7).

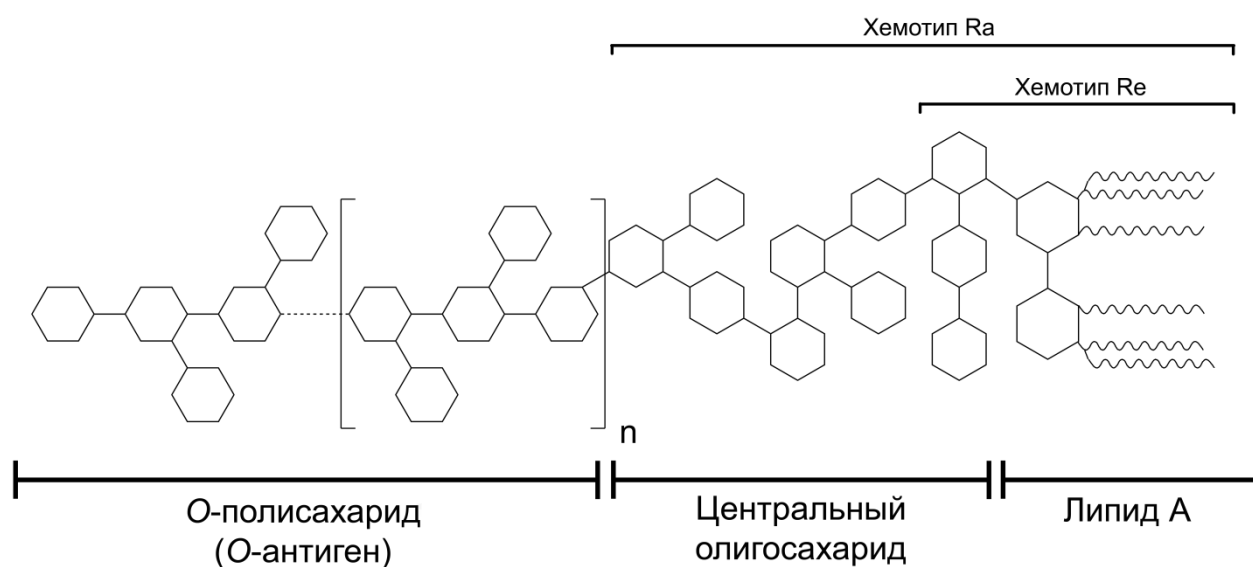


Рисунок 7. Общая структура молекулы липополисахарида, типичная для грамотрицательных бактерий. Для простоты остатки сахаров схематично представлены в виде шестичленных колец вне зависимости от их химической природы. Ra и Re – хемотипы мутантных форм липополисахаридов. Диглюкозамин липида А в высокой степени консервативен; длина ацильных остатков и дополнительные заместители гидрофобной части липида А определяют эндотоксичность бактериальной клетки. Центральный олигосахарид содержит остатки редко встречающихся сахаров, например, L-глицеро-D-манно-гептозу, 3-дезоксид-D-манно-октулозоновую кислоту. Структура О-полисахарида в высокой степени переменна для разных видов бактерий. О-полисахарид является антигенной детерминантой бактериальной клетки. Отсутствует у лабораторных штаммов *E. coli* K12 и его производных.

2.2.1. Липид А

Липид А – это полярный липид, головка которого сформирована дисахаридом глюкозаминил β -(1,6)-глюкозамином, а гидрофобная часть – шестью или семью остатками насыщенных жирных кислот. Все остатки жирных кислот, входящие в липид А, гидроксильированы. Это свойство является характерным отличием липида А от других ЛПС и глицерофосфолипидов. Наименьший по размеру ЛПС, требуемый для роста *E. coli* – это ЛПС хемотипа Re, представляющий собой липид А, модифицированный двумя остатками 3-деокси-*D*-маннооуктулозоновой кислоты (Kdo), показанный на рисунке 8.

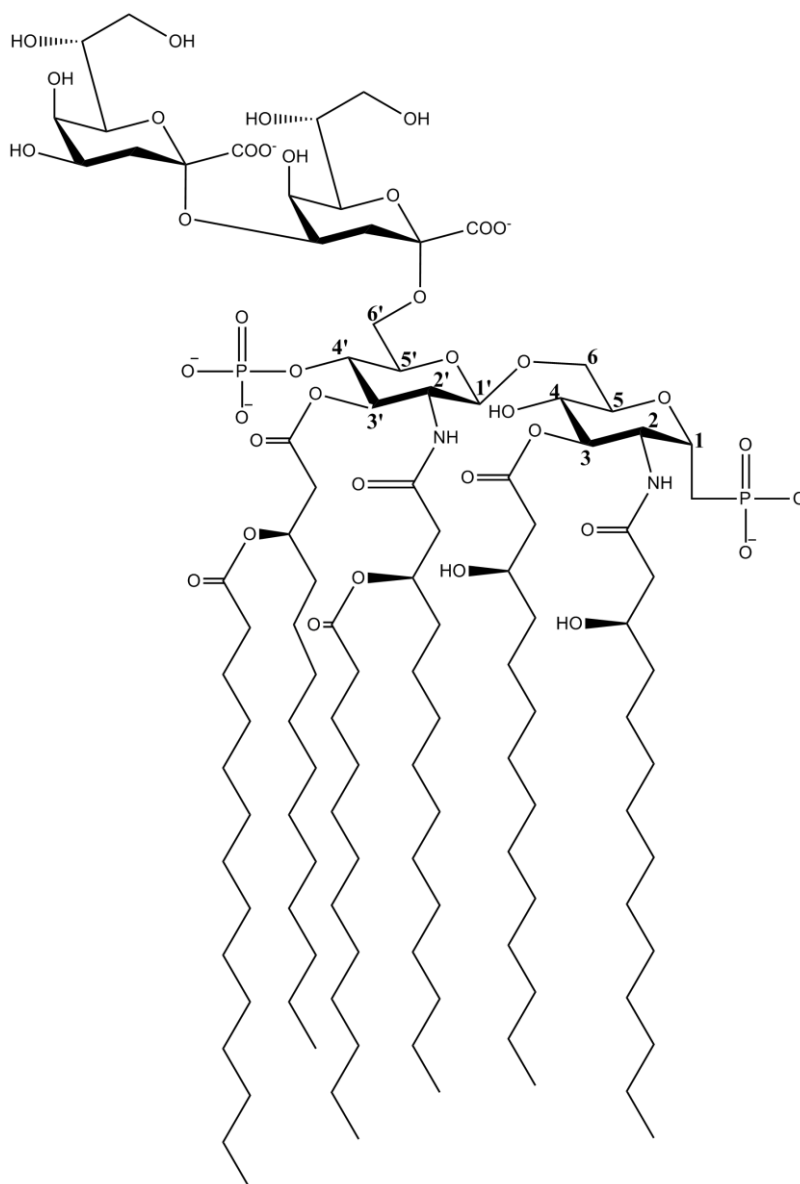


Рисунок 8. Структура *Kdo*₂-липида А. *Kdo*₂-липид А – минимальный ЛПС (хемотип Re) достаточный для роста *E. coli* и других родственных бактерий. Содержит 24 хиральных атома углерода. Атомы углерода остатков глюкозамина пронумерованы.

В отличие от глицерофосфолипидов, содержащих 2 ассиметричных атома углерода, ЛПС хемотипа Re содержит 24 хиральных центра. Эта структурная особенность значительно увеличивает способность ЛПС Re к специфическим взаимодействиям с белками. В частности, клетки млекопитающих способны реагировать на пикомолярные концентрации этого вещества [70].

2.2.2. Центральный олигосахарид

Центральный олигосахарид *E. coli* K12 содержит до 10 остатков сахаров, не считая двух остатков Kdo. Этот олигосахарид разветвленный и нерегулярный. Несколько вариаций его структур, характерных для штамма K12 *E. coli*, представлены на рисунке 9.

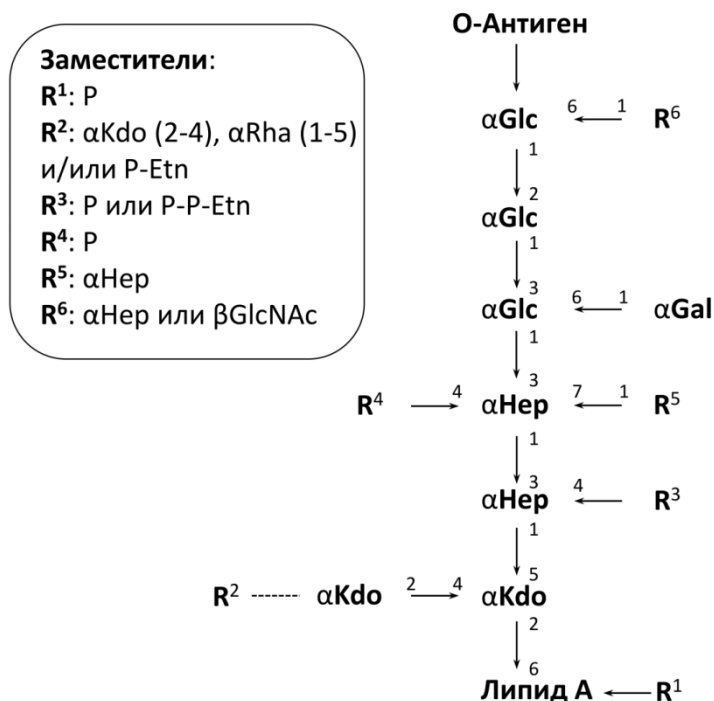


Рисунок 9. Структура центрального олигосахарида ЛПС характерного для *E. coli* K12. Аббревиатуры: Glc, D-глюкоза; GlcNAc, N-ацетилглюкоза; Gal, D-галактоза; Hep, L-глицеро-D-манно-гептоза; Kdo, 3-дезоксид-D-манно-октулозоновая кислота; Rha, L-рамноза; P, фосфат; P-Etn, фосфоэтанолламин; P-P-Etn, этаноламинпирофосфат [69,71].

Центральный олигосахарид сформирован, в том числе, и довольно редкими остатками сахаров, включая Kdo и L-глицеро-D-манно-гептозу. Учитывая этот факт, и нерегулярную структуру центрального олигосахарида в целом, очевидно, что вариативность строения этой части ЛПС в различных видах и штаммах грамотрицательных бактерий огромна [72,73]. Мутации генома грамотрицательных бактерий, приводящие к синтезу нестандартных ЛПС,

могут приводить к жизнеспособным штаммам бактерий, однако их свойства зачастую значительно отличаются от свойств исходных бактерий. Например, мутации в генах гликозилтрансфераз в геноме бактерий могут приводить к синтезу укороченных вариантов центрального олигосахарида, вследствие чего бактерии могут модифицировать поверхностные сайты узнавания и приобретать, например, устойчивость к заражению бактериофагами [74]. Однако эти мутации не влияют на наличие в ЛПС остатков Kdo и липида А, так как эти компоненты являются необходимыми для роста бактериальных клеток. Жизнеспособные штаммы *E. coli*, в которых отсутствуют модифицированные остатком фосфата заместители при остатках гептоз или отсутствует гептозный участок центрального олигосахарида, проявляют повышенную чувствительности к антибиотикам и детергентам [74,75]. Таким образом, правильно организованные остатки фосфата в области центрального олигосахарида являются фактором устойчивости бактерий к действию многих химических веществ. Остатки фосфорной кислоты, входящие в состав центрального олигосахарида ЛПС, координируют бивалентные катионы, которые за счет связывания соседних молекул ЛПС стабилизируют структуру внешней мембраны *E. coli* в целом. Обработка клеток агентами, хелатирующими бивалентные катионы, например ЭДТА, резко увеличивает чувствительность бактериальных клеток к антибиотикам. Отсутствие гептозно-фосфатного домена в олигосахариде приводит также к пониженному содержанию белковых компонентов, в частности поринов, во внешней мембране грамотрицательных бактерий [74]. Возможная причина этого явления заключается в том, что комплексы ЛПС с бивалентными катионами участвуют в олигомеризации вновь синтезированных поринов в стабильные олигомеры [76].

2.2.3. O-антиген

O-антиген – наружная часть ЛПС, экспонированная во внешнюю среду, – представляет собой полисахарид, состоящий из повторяющихся олигосахаридных звеньев [69]. Повторяющаяся единица O-антигена обычно состоит из 1 – 8 остатков сахаров. Вариации остатков сахаров, последовательности их соединения, тип связи между соседними остатками, наличие или отсутствие заместителей приводят к огромному разнообразию O-антигенов в разных штаммах грамотрицательных бактерий. Только для различных штаммов *E. coli* известно более 160 разных по структуре O-антигенов [77]. Количество олигосахаридных единиц в составе O-антигена может составлять от 0 до ~50. В одной клетке бактерии в результате неполного синтеза цепи могут содержаться O-антигены разной длины [78]. Поскольку O-антиген экспонирован наружу и содержит большое число хиральных атомов углерода, он является

основной антигенной детерминантой клетки. Лабораторный штамм *E. coli* K-12 (наряду с большинством существующих лабораторных штаммов) не содержит *O*-антигена за счет мутации в гене рамнозилтрансферазы [79]. Полисахаридная часть в ЛПС, содержащихся в этом штамме ограничивается центральным олигосахаридным доменом (ЛПС хемотипа Ra). В штамме *E. coli* K12 дикого типа часть молекул ЛПС также не содержат *O*-антигена. В остальных молекулах ЛПС *O*-антиген представлен в виде цепочки повторяющихся звеньев, каждое из которых состоит из 5 остатков сахаров. Структура *O*-антигена *E. coli* K12 представлена на рисунке 10.

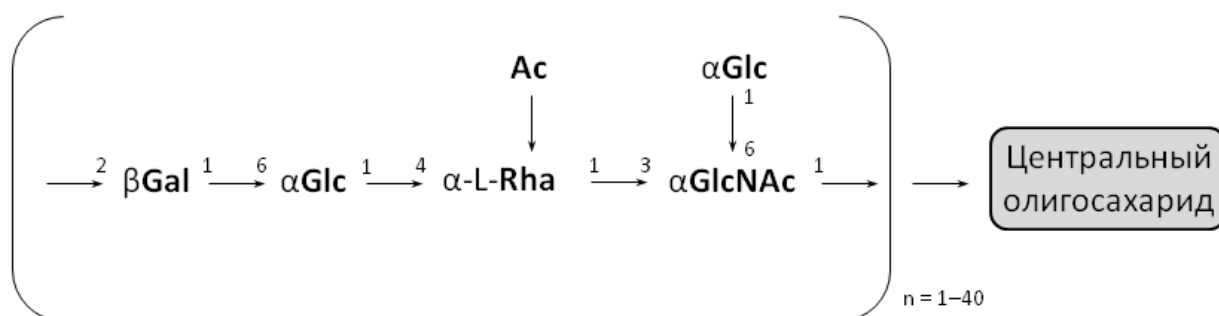


Рисунок 10. Структура *O*-антигена *E. coli* K12 дикого типа. Gal – галактоза, Glc – глюкоза, Rha – рамноза, GlcNAc – *N*-ацетилглюкозамин, Ac – ацетил.

2.2.4. Общий энтеробактериальный антиген и другие капсульные полисахариды

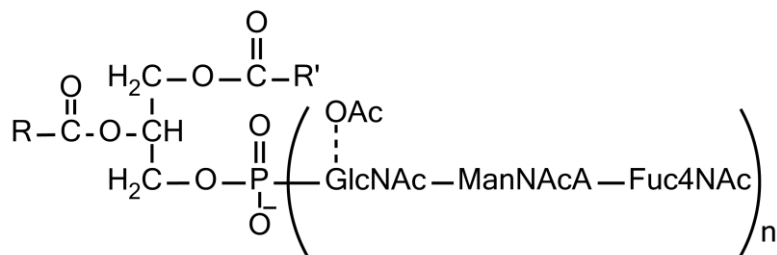
Клетки *E. coli* дикого типа обладают богатым набором различных антигенов. Более 50 лет назад группа под началом Кауффмана в своей работе показала основные типы антигенов, которые разделили на три группы: соматический ЛПС (*O*), флагеллярный (*H*) и капсулярный (*K*) антигены. В разных штаммах *E. coli* указанные типы антигенов распределены по-разному; этот факт лег в основу классификации *E. coli* по серотипам. Определение *O*-, *H*- и *K*-антигенов основано на агглютинации бактериальных клеток в присутствии антисыворотки, а также на влиянии температуры на агглютинацию и иммуногенность. К настоящему времени описано 187 различных *O*-антигенов, 80 *K*-антигенов и 56 *H*-антигенов [80].

Грамотрицательные микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* в структуре внешней мембраны содержат уникальный гликолипид – энтеробактериальный общий антиген. ЕСА содержится во всех без исключения видах, относящихся к энтеробактериям [81]. ЕСА был обнаружен в 1962 году при исследованиях штаммов *E. coli*, вызывающих инфекции мочевыводящих путей человека [82]. ЕСА удерживается на поверхности внешней мембраны двумя способами. Он может быть ковалентно связан с фосфатидилглицерином (ЕСА_{PG}) или с ЛПС (ЕСА_{LPS}). ЕСА_{LPS} является иммуногенным, в то время, как ЕСА_{PG} иммунный ответ не

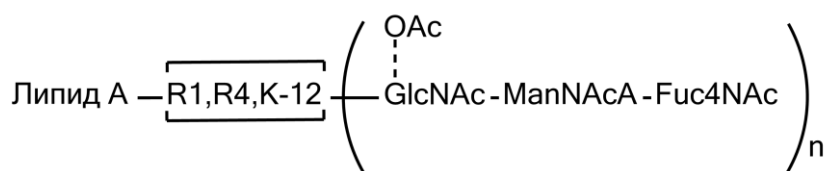
вызывает, хотя и способен связываться с антителами против ECA_{LPS} [81]. Наличие ECA_{LPS} показано экспериментально только для тех штаммов *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*, которые содержат полный центральный олигосахарид, но не для мутантных штаммов с укороченным или отсутствующим центральным олигосахаридом [83].

Неиммуногенный ECA_{PG} состоит из липидной части, представленной диацилглицеридом, соединенной с полисахаридной частью через фосфодиэфирную связь [84] (Рисунок 11).

1.



2.



3.

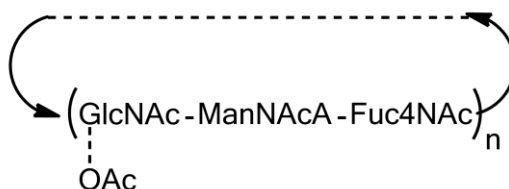


Рисунок 11. Структуры общего энтеробактериального антигена (ECA). 1 – общий энтеробактериальный антиген, ассоциированный с фосфатидилглицерином (ECA_{PG}), 2 – общий энтеробактериальный антиген, ассоциированный с липополисахаридом (ECA_{LPS}), 3 – циклический энтеробактериальный антиген.

Первое положение остатка глицерина ацилировано пальмитиновой кислотой, во 2м положении может находиться остаток пальмитиновой, пальмитолеиновой, цис-вакценовой или стеариновой кислоты. Полисахаридный фрагмент ECA представляет из себя линейный полимер, состоящий из чередующихся трисахаридных фрагментов *N*-ацетил-*D*-глюкозамина, *N*-ацетил-*D*-маннозаминуруновой кислоты и 4-ацетамидо-4,6-дидезокси-*D*-галактозы. Причем с остатком фосфата всегда связан остаток *N*-ацетилглюкозы. молекулярная масса

полисахаридного фрагмента может варьироваться от 12 до 35 кДа, что примерно соответствует длине полимера от 18 до 55 трисахаридных фрагментов.

Такой же мотив из трех повторяющихся остатков сахаров характерен и для энтеробактериального антигена, ассоциированного с остатком ЛПС. В случае ECA_{LPS} повторяющийся полисахаридный фрагмент соединен с центральным олигосахаридом остатка ЛПС через гликозидную связь (Рисунок 11). Причем в состав ЕСА могут входить остатки ЛПС с центральным олигосахаридом R1, R4 или K12 типа, у которых отсутствует O-антиген, тогда как мутантные формы *E. coli*, обладающие другими типами центральных олигосахаридов, не связываются с антителами против ЕСА. ЛПС, содержащие олигосахариды типов R1, R4 и K12 являются «плохими» субстратами для лигазы, катализирующей модификацию ЛПС полисахаридом. Поэтому только около 5% таких ЛПС оказываются модифицированными полисахаридной цепью из повторяющихся трисахаридов [84].

В редких случаях ЕСА образует циклические формы (ECA_{CYC}). Такие полимеры состоят из 4–6 трисахаридных мономера, образующих замкнутую цепь (Рисунок 11) и не содержат липидной части. ЕСА такой структуры были выделены из *Yersinia pestis* [85] и *Shigella sonnei* [86], которые наряду с ECA_{CYC} содержат и ECA_{PG} . Особенностью строения ECA_{CYC} является меньшая степень N- и O-ацетилирования остатков глюкозамина по сравнению с ECA_{LPS} и ECA_{PG} .

Описанные выше формы ЕСА обладают разными особенностями локализации в клетке. Равномерное распределение ECA_{LPS} по поверхности клетки было показано с помощью иммуноэлектронной и иммунофлуоресцентной микроскопии. Эти же методы показали, что ECA_{PG} расположен на внешней мембране клетки неиммуногенных штаммов. Однако в отличие от ECA_{LPS} , ECA_{PG} локализован лишь в отдельных областях внешней мембраны. Кроме того количество ECA_{PG} , приходящегося на одну клетку в неиммуногенных штаммах, меньше, чем количество ECA_{LPS} в генетически родственных иммуногенных штаммах. Такие отличия были показаны экспериментально для двух родственных штаммов *E. coli*, отличающихся способностью модифицировать центральный олигосахарид ЛПС типа R1 полисахаридом ЕСА. Штамм, синтезировавший только ECA_{PG} содержал меньшее количество ECA_{PG} , чем иммуногенный штамм, способный синтезировать как ECA_{PG} , так и ECA_{LPS} [87]. Наблюдаемые отличия не связаны с пониженной способностью ECA_{PG} адсорбировать анти-ЕСА антитела, так как оба штамма не содержат капсульных полисахаридов и O-антиген [88]. Особенностью ECA_{CYC} является гидрофильная природа этого полимера. Поэтому, в отличие от ECA_{LPS} и ECA_{PG} , он не обнаруживается на внешней мембране *E. coli*. Содержание ECA_{CYC} сильно зависит от условий культивирования бактерий. Так литературные данные показывают, что циклическая форма

энтеробактериального антигена преимущественно обнаруживается в культурах, выращенных на поверхности агаризованной среды. С учетом того, что ЕСА_{СУС} обнаруживается в периплазме, высказывается предположении о его роли в качестве модулятора осмотического давления [89].

Капсулярные антигены представляют собой отрицательно заряженные полимеры, окружающие бактериальную клетку. Структура *K*-антигенов образована повторяющимися олигосахаридными звеньями, которые в разных антигенах отличаются по химическому составу, степени разветвленности и плотности заряда [90]. Изначально наличие *K*-антигенов определялось с помощью агглютинации клеток под действием антисыворотки. Если клетки штамма *E. coli* агглютинировали под действием *O*-антисыворотки и повышенной температуры, а отсутствие теплового воздействия не вызывало агглютинацию, то клетки определялись, как содержащие *K*-антиген. Позднее классификация *K*-антигенов стала основываться на электрофоретической подвижности, отражающей отличия в молекулярных массах и заряде различных *K*-антигенов [91].

K-антигены разделяют на две группы, обозначаемые I и II, по физическим, химическим и генетическим признакам [92]. *K*-антигены группы I характеризуются высокой молекулярной массой (>100 кДа) и низкой плотностью зарядов. Группа I в свою очередь делится на две подгруппы; группа IB включает в себя *K*-антигены, содержащие аминсахара, в то время, как *K*-антигены группы IA таковых не содержат (*K*-антигены этой группы характерны для *Klebsiella spp*). Основными особенностями *K*-антигенов группы I является их синтез при любых температурах, поддерживающих рост бактерий, и коэкспрессия только с ограниченным набором *O*-антигенов, преимущественно O8, O9 и O20 [92,93]. К группе II относят антигены, отличающиеся меньшей молекулярной массой (около 50 кДа) и более высокой плотностью заряда за счет большого количества остатков отрицательно заряженных сахаров, таких как *N*-ацетилнейраминовая (сиаловая) кислота, 3-деокси-*D*-маннооуктулозоновая кислота, глюкуроновая кислота, *N*-ацетилманнозамин и фосфорная кислота. Такие *K*-антигены экспрессируются только при физиологических температурах культивирования бактерий [94]. Гидрофобная часть *K*-антигенов группы II представлена фосфатидной кислотой (1,2-диацилглицерин), тогда как для *K*-антигенов группы II характеризуются наличием остатка липида А.

Роль гидрофобного остатка в *K*-антигенах трудно однозначно оценить. С одной точки зрения липидный фрагмент может способствовать удержанию *K*-антигена на внешней мембране *E. coli*, однако показано, что не все *K*-антигены содержат липидный заместитель [95]. Альтернативное мнение заключается в том, что полисахариды, замещенные остатком липида,

являются интермедиатами синтеза полноразмерных антигенов *K* типа. Основные характеристики *K* антигенов групп I и II представлены в таблице 2.

Таблица 2. Характеристики *K*-антигенов грамотрицательных бактерий.

Свойство	Группа капсулярных полисахаридных антигенов	
	I	II
Компоненты природы	кислотной Глюкуроновая галактуроновая кислота	кислота, Глюкуроновая кислота, <i>N</i> -ацетилнейраминовая кислота, 3-деокси- <i>D</i> -маннооктулузоновая кислота, <i>N</i> -ацетиламаннозамин, фосфорная кислота
Экспрессия при пониженных температурах	Да	Нет
Коэкспрессия с	<i>O8, O9, O20</i>	Большинство <i>O</i> -антигенов
Липидный компонент	Производная липида А	Фосфатидная кислота
Типичные представители видов бактерий	<i>Klebsiella spp</i>	<i>H. influenzae, N. meningitides</i>

Наряду с *K*- и *O*-антигенами, ассоциированными с внешней мембраной грамотрицательных клеток, часто выделяют ещё *M*-антиген (мукоидный антиген), называемый также колановая кислота. Колановая кислота неспецифична для каждого серотипа бактерий и синтезируется только при пониженных температурах или на бедных средах. По всей видимости данный тип капсульных полисахаридов не определяет патогенность штамма, и его функция остается неясной. Тем не менее, высказываются предположения о том, что синтез колановой кислоты в не самых благоприятных условиях роста бактериальной культуры позволяет предотвратить нарушение структуры внешней мембраны, попадание токсических веществ внутрь клетки или поддерживать достаточный уровень влаги в клетке [75]. Колановая кислота имеет ряд общих свойств с *K*-антигенами группы IA. Это относится к химической структуре, гомологичности генов, отвечающих за синтез полимеров обоих типов, а также к системе регуляции [90]. Эти факты подтверждают предположение о том, что колановая кислота и *K*-антигены группы IA являются частью одной группы [81].

2.3. Белки

Набор белков во внешней мембране грамотрицательных бактерий довольно ограничен. Электрофореграмма белков внешней мембраны, полученная в денатурирующих условиях, содержит лишь несколько мажорных полос [96] (Рисунок 12).

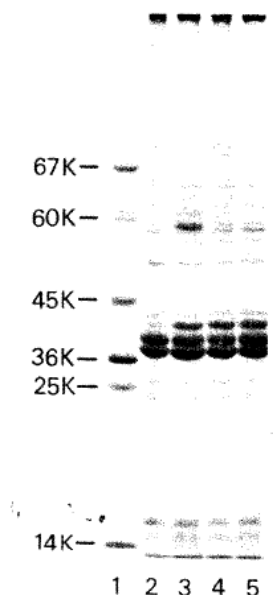


Рисунок 12. Электрофореграмма белков внешней мембраны *E. coli* K12. Каждый образец содержит 20 мг белка. Молекулярные массы белковых стандартов указаны слева. 1: белковые маркеры; 2 – 5: белки внешней мембраны *E. coli* K12 штаммов PC 0221, PC 008, PC 0612, PC 0031 соответственно [96].

2.3.1. Липопротейн Брауна

Липопротейн, ассоциированный с пептидогликаном, называемый также муреиновый липопротейн или липопротейн Брауна, представляет собой небольшой белок с молекулярной массой 7,2 кДа, который присутствует в *E. coli* в больших количествах (около 7×10^5 копий на клетку) [97]. На N-конце аминокислотной цепочки этого белка расположен остаток цистеина, модифицированный по аминогруппе остатком жирной кислоты и диглицеридом по SH-группе. Липидный фрагмент муреинового липопротейна интеркалирован в липидный бислой внешней мембраны (Рисунок 13 слева); белковая часть липопротейна расположена в периплазматическом пространстве. Около трети молекул муреинового липопротейна ковалентно связаны с пептидогликаном через ϵ -аминогруппу C-концевого остатка лизина. Такого рода связи наблюдаются у каждой десятой повторяющейся субъединицы пептидогликана. Обработка клеточных стенок *E. coli* трипсином приводит к протеолитическому расщеплению муреинового липопротейна, в результате которого нарушается связывание

пептидогликанового слоя и внешней мембраны, что в свою очередь приводит к значительным нарушениям структуры клеточной стенки. Этот факт говорит о значительной роли муреинового липопротейна в поддержании общей структуры клеточной мембраны. (Рисунок 13 справа).

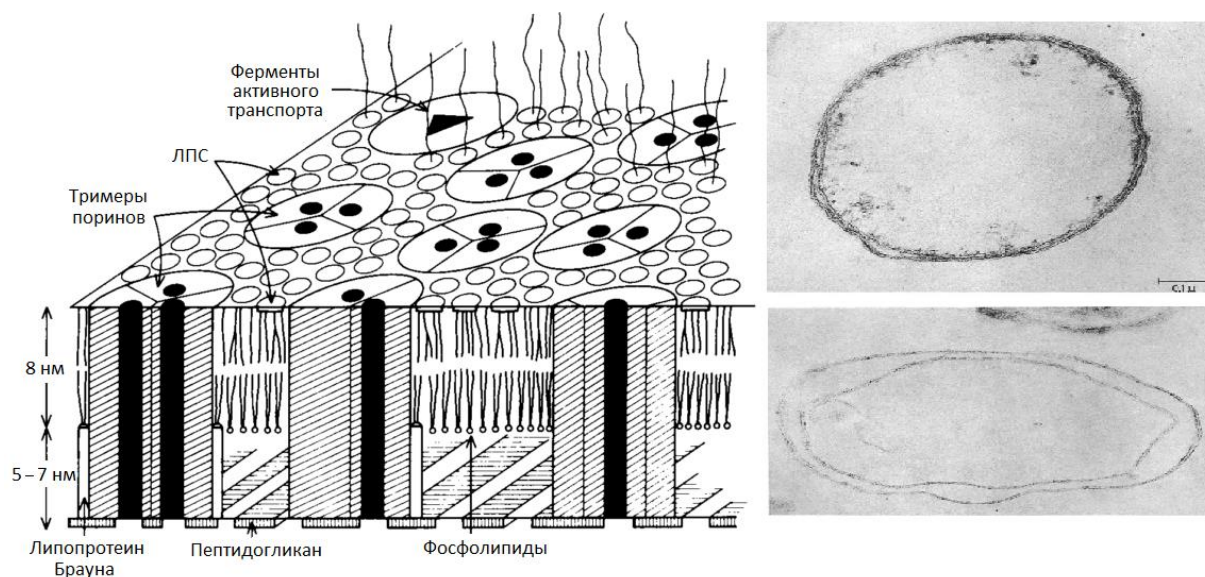


Рисунок 13. Слева: схема внешней мембраны *E. coli* и *S. typhimurium*. Для наглядности некоторые объекты представлены без сохранения масштаба. Справа: ультратонкий срез клетки *E. coli* до обработки трипсином (вверху) и после обработки трипсином (внизу). Увеличение 162800 [97].

Ключевую роль муреинового липопротейна в поддержании структуры клеточной стенки *E. coli* подтверждает работа, в которой показано, что делеция гена муреинового липопротейна из генома *E. coli* приводит к дестабилизации внешней мембраны, что проявляется в наличии во внешней среде везикул, образованных фрагментами внешней мембраны и периплазматических ферментов [98].

2.3.2. Порины

Порины – это тримерные трансмембранные белки, которые образуют каналы во внешней мембране грамотрицательных клеток (рисунок 13 слева). Эти каналы обеспечивают неселективный транспорт небольших гидрофильных молекул через внешнюю мембрану. Впервые этот функционал поринов был доказан в 1983 на примере *E. coli* K12 [99] с помощью измерения активности периплазматической β -лактамазы, вызванной транспортом лактамных антибиотиков извне через внешнюю мембрану. В работе показано снижение активности β -лактамазы с увеличением гидрофобности лактамных антибиотиков. Это свидетельствует о

гидрофильности пор, образуемых поринами, а также о том, что внешняя мембрана грамотрицательных клеток является эффективным барьером против гидрофобных молекул.

Порины кодируются генами *ompF*, *ompC* и *phoE*, в *S. typhimurium* – *ompD*. Порин, кодируемый геном *phoE*, уникален тем, что продуцируется только в случае недостатка фосфата в питательной среде, поэтому *E. coli* в обычных условиях содержат исключительно *OmpC* и *OmpF* порины. Содержание поринов во внешней мембране *E. coli* составляет до 2% от общей массы белка в клетке и характеризуется постоянством.

Измерение активности периплазматической β -лактамазы также было предпринято и для мутантных клеток *E. coli*, в которых синтез одного из поринов *OmpF*, *OmpC* или *PhoE* был подавлен. Результаты измерений β -лактамазной активности для каждого из мутантов позволили сделать заключение о том, что *PhoE* отвечает за транспорт отрицательно заряженных молекул, *OmpC* – положительно заряженных молекул, *OmpF* – нейтральных полярных молекул (к примеру, воды или глюкозы) [100].

2.3.3. Аффинные рецепторы внешней мембраны

Аффинными рецепторами внешней мембраны называют белки, катализирующие специфический транспорт веществ через внешнюю мембрану и имеющие высокое сродство к своим лигандам, что отличает их от поринов, рассмотренных ранее. Характерным представителем аффинных рецепторов является белок *BtuB*; константа диссоциации комплекса *BtuB* с витамином B12 составляет 3 нМ.

Помимо высокого сродства к специфическому лиганду, все аффинные рецепторы обладают рядом общих черт. Во-первых, специфический транспорт веществ с помощью аффинных рецепторов осуществляется при наличии белка *ТонВ*, ассоциированного с цитоплазматической мембраной бактериальной клетки [101]; во-вторых, для аффинных рецепторов характерно накопление лигандов в периплазме в достаточно высоких концентрациях (обычно на 2–3 порядка превышающих концентрацию лиганда в межклеточном пространстве). Источником энергии для такого рода транспорта веществ является градиент концентрации протонов на цитоплазматической мембране [102]. Такая организация транспорта позволяет бактериальной клетке поглощать молекулы, транспорт которых через порины невозможен ввиду их достаточно большого размера.

Механизм действия *ТонВ* предположительно обусловлен его физическим контактом с рецепторами на поверхности внешней мембраны. Это подтверждается фактом наличия консервативной последовательности во всех аффинных рецепторах, которая в англоязычной

литературе называется "TonB box". Пентапептид, «комплементарный» этой последовательности, ингибирует TonB-зависимую транспортную функцию при концентрации порядка микрограммов в миллилитре.

2.3.4. Белки, отвечающие за транспорт белков

Нормальное развитие грамотрицательных бактерий требует системы секреции белков. Поскольку грамотрицательные бактерии содержат пептидогликан, экзо- и эндоцитоз, характерный для клеток эукариот, в случае бактерий отсутствует. Наличие двух липидных бислоев лишь затрудняет обмен белками между цитоплазмой и межклеточным пространством. Как следствие, для транспорта белков через клеточную стенку используются сложные системы, и несколько механизмов [103]. Важность этих систем для клетки переоценить трудно, однако, вопрос механизмов их действия и их строения выходят за рамки данной работы. Здесь, мы ограничимся рассмотрением некоторых белков-компонентов транспортных систем, которые наряду с другими объектами составляют внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий.

По структуре белки внешней мембраны, отвечающие за транспорт других белков, схожи с поринами. Характерными особенностями укладки этих трансмембранных белков являются укладка в виде β -бочонка с каналом внутри и чередование гидрофобных и гидрофильных остатков в аминокислотной цепи. Нерегулярные петли, экспонированные наружу, подвержены протеолитическому расщеплению и узнаются специфическими антителами [103]. Некоторые примеры транспортных белков перечислены ниже.

Минорный белок TolC, молекулярной массы 50 кДа, как показано, служит для транспорта гемолизина и сопутствующих факторов HlyD и HlyB [104]; TolC также является белком, ответственным за транспорт некоторых колицинов внутрь клетки [105]. В *E. coli* компоненты Р пиля уropатогенных штаммов экспортируются через белок PapC, который, по всей видимости, специфически распознает белковые компоненты пиля и их комплексы с периплазматическими шаперонами [106].

2.4. Свойства внешней мембраны *E. coli*

Поскольку внешняя мембрана *E. coli* экспонирована во внешнюю среду, она обладает рядом свойств, общих для всех одноклеточных организмов. Эти свойства, во-первых, включают в себя присутствие гидрофильных полисахаридных цепей, модифицированных отрицательно заряженными функциональными группами. Эта особенность позволяет организмам избежать так называемого поверхностного фагоцитоза. Исходя из состава внешней мембраны, очевидно,

что O-антигены липополисахаридов, а также отрицательно заряженные белки внешней мембраны удовлетворяют этому требованию. Дополнительной характерной чертой одноклеточных организмов является многообразие и изменчивость структур внешней мембраны. Это свойство позволяет минимизировать риск узнавания клетки антителами и подвергнуться воздействию пищеварительных ферментов. В клетках грамотрицательных бактерий изменчивость поверхности достигается за счет вариативности структур O-антигенов и капсульных полисахаридов.

2.4.1. Ассиметричность липидного бислоя

Основная черта липидного бислоя грамотрицательных бактерий – его несимметричность. Окрашивание клеток *S. typhimurium* с помощью декстрана, модифицированного CNBr-группами, не проникающего через внешнюю мембрану, показало отсутствие молекул фосфатитидилэтаноламина на поверхности клетки [107], следовательно в случае *S. typhimurium* они составляют внутренний слой. Молекулы ЛПС, напротив, сосредоточены во внешнем слое согласно данным электронной микроскопии клеток, меченых соответствующими антителами [108]. Однако для видов, не являющихся близкими родственниками *Escherichia* и *Salmonella*, в редких случаях удается детектировать фосфолипиды во внешнем слое; тем не менее содержание фосфолипидов не превышает 3 – 5% от общего количества липидов внешнего слоя [109].

2.4.2. Физические свойства липополисахаридного слоя внешней мембраны

Каждая молекула ЛПС содержит 6–7 остатков жирных кислот, в то время как глицерофосфолипиды содержат только два. Это различие обуславливает гораздо более высокую энергию межмолекулярного взаимодействия. Межмолекулярные гидрофобные взаимодействия позволяют удерживать молекулы ЛПС при повышенных температурах в присутствии ионов Mg^{2+} , даже если в систему ввести фосфолипиды [110]. Присутствие ионов металлов необходимо для удержания молекул ЛПС вместе, так как полисахаридные цепи молекул ЛПС одноименно заряжены, вследствие чего отталкиваются. Именно для нейтрализации отрицательных зарядов клетки *E. coli* содержат в среднем 5,3 иона Ca^{2+} или Mg^{2+} на одну молекулу ЛПС (Таблица 1).

Молекулы ЛПС содержат, в основном, остатки насыщенных жирных кислот. В результате упаковка ЛПС в мембране является очень плотной, квазикристаллической; внутримолекулярная подвижность липидных фрагментов молекулы низка. Это вносит свой

вклад в непроницаемость внешней мембраны. Низкая подвижность липидной части ЛПС была подтверждена с помощью спиновых меток и дифракции рентгеновских лучей [111]. Рентгенограмма внешней мембраны *S. typhimurium* также подтверждает квазикристаллическое состояние молекул ЛПС [112]. Как следствие, встраивание гидрофобных молекул в липополисахаридные мембраны на порядок ниже, чем в фосфолипидные [113].

2.4.3. Барьерная функция внешней мембраны

Многие грамотрицательные бактерии, включая *E. coli* и *S. typhimurium*, проявляют значительную устойчивость к гидрофобным антибиотикам, детергентам и гидрофобным красителям [114]. Устойчивость этих организмов к определенным красителям и желчным кислотам используется, к примеру, для создания селективных сред, в которых рост грамположительных бактерий подавлен. Во многом устойчивость грамотрицательных бактерий к гидрофобным веществам обусловлена низкой проницаемостью внешней мембраны для этого класса веществ. Однако имеется ряд сведений, что определенный вклад могут вносить механизмы активного выведения веществ, токсичных для клетки [115].

Роль внешней мембраны в такого рода устойчивости доказывается фактом увеличения восприимчивости *E. coli* и *S. typhimurium* к гидрофобным антибиотикам после обработки клеток раствором ЭДТА [116]; такое воздействие ослабляет латеральное взаимодействие молекул ЛПС за счет удаления положительно заряженных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} . Независимо от этого барьерная функция внешней мембраны подтверждается экспериментом по измерению скорости диффузии гидрофобных соединений через внешнюю мембрану [117]. В этой работе клетки инкубировали в растворе в присутствии производных 3-оксостероидов; молекулы стероидов спонтанно проходили через внешнюю мембрану, затем через цитоплазматическую мембрану и в итоге окислялись под действием дегидрогеназы, специфичной к 3-оксостероидам, клонированной из генома *P. aeruginosa*. Эксперимент показал, что проницаемость внешней липополисахаридной мембраны в 50–100 раз ниже, чем проницаемость цитоплазматической мембраны. Важный вывод данной работы заключается в том, что внешняя мембрана не обладает абсолютной непроницаемостью для гидрофобных соединений – скорость их диффузии хоть и замедлена, но не является нулевой. К примеру, скорость диффузии андростендиола, стероидного гормона яичников, через внешнюю мембрану сравнима со скоростью диффузии некоторых монозарядных цефалоспоринов через OmpF канал [114]. Амфифильные соединения, напротив, самопроизвольно не проходят через внешнюю мембрану, так как при физиологических pH они в большинстве случаев заряжены.

Так, большинство грамотрицательных бактерий проявляют устойчивость к гидрофобным антибиотикам, модифицированным одной или несколькими заряженными группами [118].

2.5. Агенты, увеличивающие проницаемость внешней мембраны грамотрицательных бактерий.

Частично вопрос проницаемости внешней мембраны был затронут в предыдущем разделе, и с одной точки зрения эту тему уместно рассматривать в контексте строения мембраны и её свойств. Однако с точки зрения тематики настоящей работы целесообразно рассматривать внешнюю мембрану в первую очередь, как барьер, препятствующий лизису клетки "извне" под действием пептидогликангидролаз, специфичных по отношению к грамотрицательным бактериям.

Наличие внешней мембраны и её избирательная проницаемость – основные ограничения применению пептидогликангидролаз, специфичных к грамотрицательным бактериям. Поэтому увеличение проницаемости внешней мембраны грамотрицательных бактерий является на текущий момент актуальной и обширной темой, которой уместно отвести отдельный раздел.

Кратко суммируя аспекты строения внешней мембраны, непосредственно касающиеся её проницаемости, можно выделить ряд утверждений:

- внешняя мембрана непроницаема для макромолекул;
- самопроизвольный переход гидрофобных веществ через внешнюю мембрану очень ограничен;
- транспорт гидрофильных веществ осуществляется через каналы поринов, относительно небольшая ширина которых существенно ограничивает сверху размер молекул, которые могут быть перенесены таким образом через внешнюю мембрану;
- целостность внешней мембраны поддерживается в основном за счет образования комплексов отрицательно заряженных ЛПС с ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Отсюда можно заключить, что внешняя мембрана грамотрицательных бактерий оказывается непроницаема для многих токсичных веществ, включая антибиотики, так как в большинстве своем молекулы таких веществ либо гидрофобные, либо сравнительно большие гидрофильные. Устойчивые комплексы ЛПС с катионами являются основным фактором, препятствующим прохождению антибактериальных веществ внутрь клетки, поэтому именно

они рассматриваются, как основная мишень для веществ, направленных на увеличение проницаемости внешней мембраны [119].

Заметный рост количества работ по увеличению проницаемости внешней мембраны грамотрицательных бактерий приходится на период возникновения проблемы устойчивости микроорганизмов к антибиотикам и общего снижения эффективности антибактериальной терапии. В целом работа ведется в двух смежных направлениях. Наряду с созданием новых типов антибиотиков, предлагаются подходы к увеличению эффективности уже существующих антибиотиков путем изменения восприимчивости клетки к гидрофобным веществам. Последнее направление потребовало развития методов, направленных на оценку нарушения структуры внешней мембраны.

2.5.1. Методы оценки проницаемости внешней мембраны грамотрицательных бактерий

Впервые повреждение внешней мембраны грамотрицательных клеток было показано на клетках *Neisseria catarrhalis*, которые в присутствии ЭДТА лизировали под действием лизоцима куриного яйца [120]. Позднее было показано, что присутствие ЭДТА увеличивает восприимчивость *E. coli* к актиномицину и вызывает высвобождение молекул ЛПС из внешней мембраны. Впоследствии тесты на гидрофобные антибиотики, восприимчивость к лизоциму и высвобождение ЛПС из внешней мембраны широко использовались для исследования влияния различных факторов на проницаемость внешней мембраны. Наряду с этими методами со временем наличие нарушений целостности внешней мембраны стали демонстрировать с помощью изменений чувствительности клеток к детергентам, перехода периплазматических белков наружу клетки и с помощью включения гидрофобного флуорофора, *N*-фенилнафтиламина, в состав липидного бислоя [119].

Разрушенная внешняя мембрана не оказывает препятствий для транспорта лизоцима к пептидогликану клетки извне, также позволяя периплазматическим белкам переходить в межклеточное пространство. Чаще всего, когда стоит задача определить наличие выхода периплазматических белков в межклеточное пространство, в качестве белка-метки используют β -лактамазу. Выбор этого фермента обусловлен тем, что β -лактамазы бактерий довольно хорошо изучены, и на сегодняшний день для них существует довольно широкий спектр синтетических хромогенных субстратов с высокими коэффициентами экстинкции [121].

Тест на транспорт белков через внешнюю мембрану не поможет зафиксировать более тонкие изменения структуры липидного бислоя, например образование фосфолипидных

фрагментов в наружном слое внешней мембраны. Для оценки таких более слабых эффектов применяются тесты на чувствительность к гидрофобным антибиотикам или флуорофорам. Суть этого метода заключается в облегчении транспорта гидрофобных веществ внутрь клетки при нарушении нативной структуры внешней мембраны. При этом гидрофобные антибиотики оказывают бактерицидное или бактериостатическое действие при более низких концентрациях, а *N*-фенилнафтиламин, который в норме не встраивается в мембрану, попадая в гидрофобное окружение остатков жирных кислот, начинает флуоресцировать. Методы оценки целостности мембраны с помощью гидрофобных веществ являются непрямыми, однако они вполне уместны, если стоит задача увеличить проницаемость внешней мембраны именно по отношению к гидрофобным веществам. При использовании этих методов количественной оценкой увеличения проницаемости внешней мембраны может стать степень снижения минимальной концентрации тестового антибиотика, ингибирующей рост культуры (МИК), или степень увеличения флуоресценции *N*-фенилнафтиламина.

При удалении катионов металлов, удерживающих молекулы ЛПС вместе, зачастую происходит высвобождение последних из состава внешней мембраны. Этот эффект также часто используется для оценки того или иного воздействия на клетку. Количественно этот эффект может быть оценен с помощью экстракции ЛПС из реакционной смеси после удаления клеток центрифугированием с последующим определением доли молекул ЛПС, вышедших из состава мембраны [116].

Как правило, в работах, посвященных регулированию проницаемости внешней мембраны грамотрицательных бактерий, используются разные модификации одного из приведенных выше методов, либо комбинация двух из них, что наряду с использованием разных видов и штаммов бактерий создает определенные сложности в сравнении данных из многих источников и их интерпретировании.

2.5.2. Катионные агенты

Полимиксины и их производные

Полимиксины – это амфифильные липопептидные антибиотики. По структуре полимиксины представляют собой кольцевой пептид, модифицированный остатком жирной кислоты. Кольцевой пептид состоит из девяти аминокислотных остатков, пять из которых положительно заряжены. В 50х годах прошлого века уже были известны антимикробные свойства полимиксинов, а их воздействие на структуру клеточной мембраны грамотрицательных бактерий было описано спустя 20 лет [122].

Механизм действия полимиксина основан на вытеснении катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} из центров связывания с молекулами ЛПС. При этом более низкие концентрации полимиксинов вызывают образование выступов внешней мембраны (Рисунки 14, 15). С ростом концентрации полимиксинов нарушается целостность липидных мембран, и компоненты периплазмы и цитоплазмы переходят в межклеточное пространство. При этом клетка погибает [119,122]. Описанные эффекты происходят в очень узком диапазоне концентраций, однако всё же возможно изменить проницаемость внешней мембраны, не вызывая гибель клетки [123].

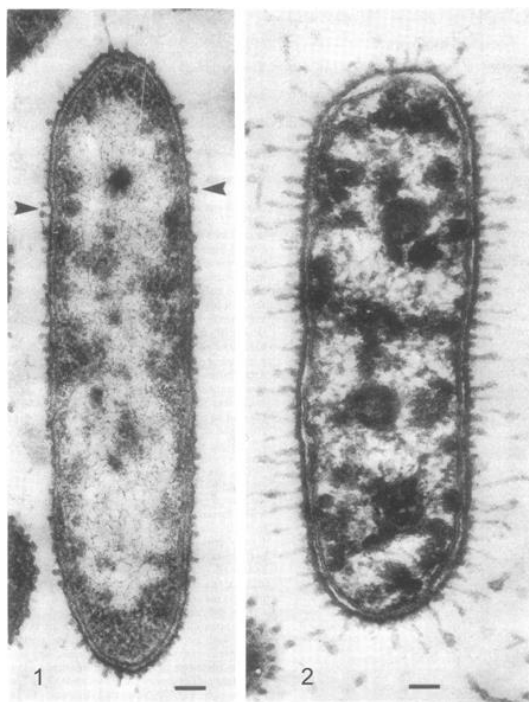


Рисунок 14. *P.aeruginosa*: 1 – здоровая клетка (стрелками указаны выступы внешней мембраны, образующиеся в норме); 2 – клетка, зафиксированная после инкубации в присутствии 6000 единиц полимиксина, в течение 30 минут. Видны нарушения внешней и цитоплазматической мембран, вызванные полимиксином. Горизонтальная черта в правом нижнем углу соответствует расстоянию в 100 нм [122].

Производные полимиксинов, лишённые ацильной группы, проявляют бактерицидные свойства в меньшей степени или не проявляют их вовсе [124]. Вместе с тем их способность изменять проницаемость внешнего липидного бислоя не отличается от полноразмерных полимиксинов [125]. Так, МИК в случае полимиксин В нонапептида (PMBN) по отношению к *E. coli* и *S. typhimurium* превышает 300 мкг/мл, в то время как в диапазоне концентраций 0,3 – 1 мкг/мл наблюдается значительное увеличение чувствительности *E. coli* и *S. typhimurium* к гидрофобным антибиотикам, которые в норме не способны преодолеть внешнюю мембрану этих бактерий [126]. Помимо PMBN ряд аналогичных производных, таких как полимиксин

декапептиды [127], колистин [128], полимиксин В октапептид и полимиксин В гептапептид [126], структура которых также содержит циклический гептапептид, эффективно увеличивают проницаемость внешней мембраны. В то же время линейные производные полимиксина В влияют на проницаемость внешней мембраны при существенно более высоких концентрациях (Таблица 3) [129]. Этот факт говорит о том, что для проявления высокой активности катионная природа полимиксина не является достаточным условием. Среди важных факторов можно выделить конформацию молекулы, наличие или отсутствие функциональных заместителей [119].

Таблица 3. Ингибирование роста и увеличение проницаемости внешней мембраны E. coli под действием различных производных полимиксинов.

Поликатион	МИК, мкг/мл	Концентрация поликатиона, требуемая для уменьшения МИК гидрофобных антибиотиков в 10 раз, мкг/мл
Полимиксин В	1	0,3–1
Деацилированный полимиксин В	10–30	0,3–1
Деацилированный колистин	30	1–3
Полимиксин В нонапептид	≥300	0,3–1
Колистин нонапептид	≥100	0,3–1
Полимиксин В октапептид	≥300	1–3
Линейный лизил-полимиксин В нонапептид	≥300	≥300
Линейный аргинил-полимиксин В нонапептид	≥300	≥300

Инкубация *E. coli* в присутствии полимиксинов приводит к значительному увеличению гидрофобности поверхности, что отражается на результатах NPN-теста [113], вытекание компонентов периплазмы происходит при концентрациях не ниже МИК. При условиях, достаточных для перехода периплазматических белков наружу также происходит и вытекание компонентов цитоплазмы и, следовательно, гибель клетки [130].

Полилизины, полиаргинины и протамин

Способность гомополимеров аминокислот нарушать структуру внешней мембраны в большой степени зависит как от природы мономера, так и от количества звеньев в цепи [119]. Так, пентализин и пентааргинин обладают очень низкой способностью увеличивать

проницаемость внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Они неактивны по отношению к *E. coli* и *S. typhimurium*, и низкоактивны по отношению к *P. aeruginosa*, причем только при низкой ионной силе, когда связывание пептидов с молекулами ЛПС не ингибируется конкурирующими моновалентными катионами, содержащимися в буфере [131]. Полилизин, содержащий 20 остатков, при концентрации от 0,3 – 3мкг/мл увеличивает восприимчивость *E. coli* и *S. typhimurium* к гидрофобным антибиотикам на 1 – 2 порядка. В то же время его МИК по отношению к этим бактериям составляет 30 – 100 мкг/мл. Более длинные полимеры лизина и протамин помимо высокой способности к увеличению проницаемости внешней мембраны обладают бактерицидными свойствами, аналогично полимиксинам [125].

Полилизин, содержащий 20 остатков в цепи, и аналогичный полиаргинин увеличивают восприимчивость внешней мембраны *E. coli* к гидрофобным веществам. В этом их действие аналогично РВМН. Однако в отличие от последнего полилизин и полиаргинин высвобождают 30 – 40 % молекул ЛПС из структуры внешней мембраны. При концентрациях Lys₂₀, Arg₂₀ и протамин выше 100 мкг/мл происходит высвобождение периплазматической β-лактамазы. Инкубация клеток в присутствии Lys₂₀ и протамин не приводит к образованию характерных выступов во внешнем липидном бислое, как в случае полимиксинов. Вместо этого в результате действия этих агентов клеточная стенка становится морщинистой или бугорчатой (рисунок 15). Что характерно, подобные изменения морфологии мембраны не всегда сказываются на жизнеспособности клеток [132].

Действие многих поликатионных агентов, таких как полимиксины, протамин, ингибируется при физиологических концентрациях солей в реакционной среде [119]. Особенностью Lys₂₀ является отсутствие этого эффекта; при инкубации *S. typhimurium* в присутствии 30 мкг/мл Lys₂₀ и 0,9 % NaCl количество жизнеспособных клеток уменьшается до 5% в течение 10 минут.

Кроме полилизинов и полиаргининов описаны и другие поликатионы со способностью увеличивать проницаемость внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Среди таких полимеров можно выделить полиорнитин и полиэтиленимин.

Полиэтиленимин, аналогично вышеописанным поликатионам, увеличивает восприимчивость *S. typhimurium*, *E. coli* и *P. aeruginosa* к *N*-фенилнафтиламину и гидрофобным антибиотикам при концентрации до 20 мкг/мл. Достоверно детектировать высвобождение молекул ЛПС из структуры внешней мембраны под действием полиэтиленимина довольно затруднительно, так как комплексы полиэтиленимина с липополисахаридами и ДНК нерастворимы.

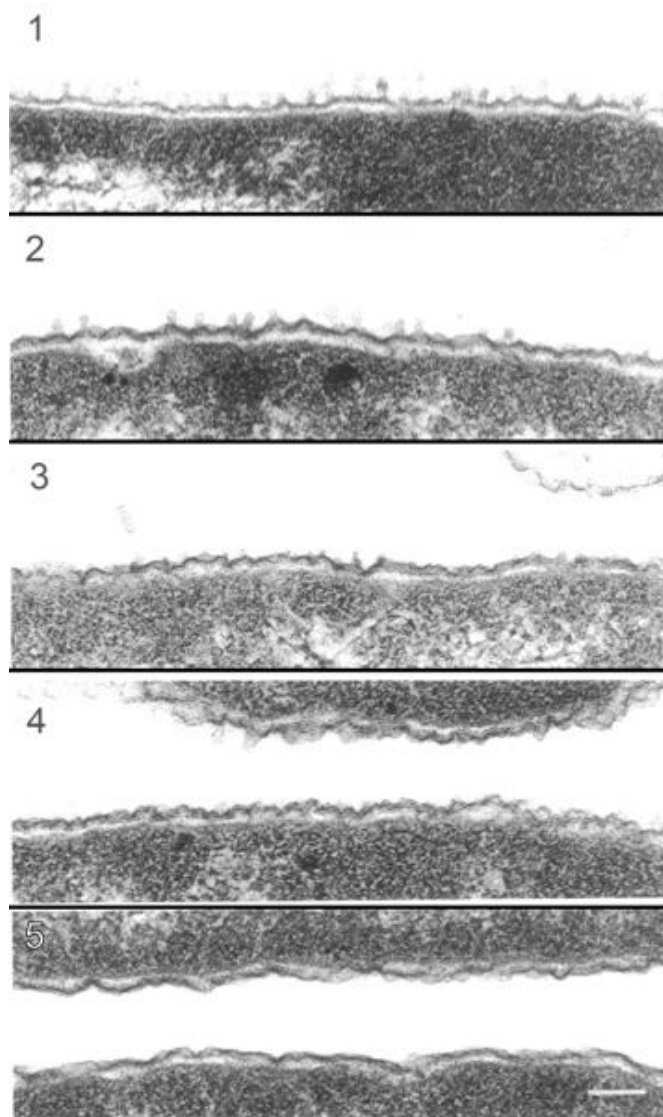


Рисунок 15. Эффект поликатионов на ультраструктуру клеточной стенки *S. typhimurium* SL696. Клетки были инкубированы в течение 10 минут в присутствии 30 мкг полимиксина В (1), деацилированного полимиксина В (2), протамина (3) и Lys_{20} (4). 5 – контрольный образец. Масштабная черта соответствует длине 100 нм [132].

Однако данные о лизисе клеток трех видов под действием лизоцима куриных яиц и полиэтиленимина показывают, что эффект увеличения скорости лизиса наблюдается только для *P. aeruginosa*, что говорит о низкой способности полиэтиленимина к образованию достаточно крупных пор в структуре внешней мембраны [133].

Орнитин является гомологом лизина. Его боковая цепь короче на 1 атом углерода. Поэтому в целом эффект, который оказывает полиорнитин в целом схож с эффектом полилизина. Клетки *P. aeruginosa* в присутствии полиорнитина теряют содержимое - периплазмы, а также проявляют восприимчивость к *N*-фенилнафтиламину и лизису под

действием куриного лизоцима. Эти эффекты лишь отчасти ингибируются присутствием 1 мМ $MgCl_2$ [134].

Эффектом усиления лизиса обладают также антибиотики, содержащие полилизин, например, норсотрицин, представляющий собой смесь стрептотрицинов. Однако этот эффект наблюдается при высоких концентрациях антибиотика (около 50 мкг/мл), когда жизнеспособность клеток уже подавлена [135].

Катионные антимикробные пептиды

Катионные пептиды являются неотъемлемой частью защитных систем всех форм жизни, начиная от бактерий, заканчивая позвоночными. Основная роль катионных пептидов в природе заключается в подавлении патогенных организмов наряду с регуляцией ряда процессов обмена веществ.

Антимикробные пептиды амфифильны, относительно коротки (от 12 до 100 аминокислот) и несут суммарный положительный заряд (от 4 до 9 остатков лизина и/или аргинина). По структуре их подразделяют на 4 основных класса: α -спиральные пептиды, пептиды сформированные β -складками, пептиды смешанного типа и неструктурированные пептиды (Рисунок 16).

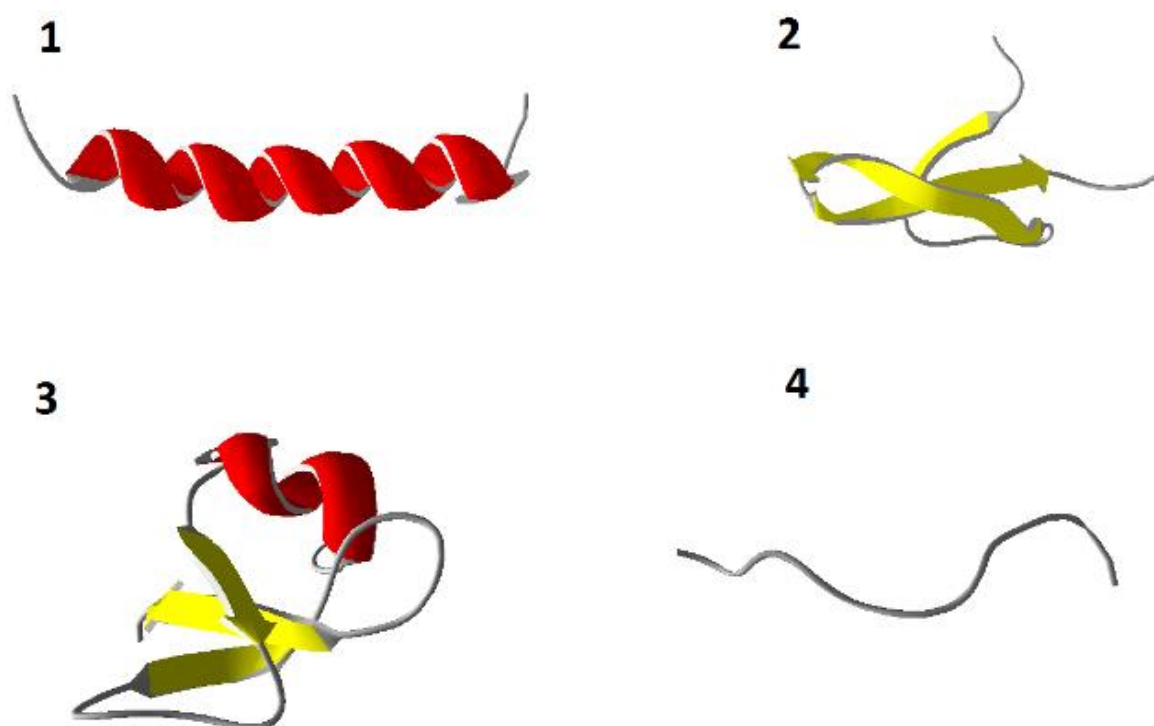


Рисунок 16. Структурные классы антимикробных пептидов. 1 – α -спиральный магаинин-2; 2 – β -структурированный кроличий дефенсин 1; 3 – β -дефенсин человека, смешанная структура; 4 – неструктурированный индолицидин.

Большинство антимикробных пептидов приобретают эти структуры только при взаимодействии с липидными мембранами, тогда как свободные мономеры пептидов остаются неструктурированными [136].

Для проявления антибактериальной активности важными факторами являются количество положительных зарядов, их позиция в аминокислотной последовательности, гидрофобность пептида и его третичная структура. Амфифильная природа антимикробных пептидов играет здесь ключевую роль, так как гидрофобные аминокислотные остатки обуславливают взаимодействие пептидов с остатками жирных кислот клеточных мембран, а заряженные остатки взаимодействуют с полисахаридными фрагментами липидов или образуют просвет поры. Вне зависимости от длины, аминокислотной последовательности и структуры пептида МИК в большинстве случаев лежит в диапазоне 1 – 20 мкМ [137] (Рисунок 17. Таблица 4).

Взаимодействие катионных пептидов с липидными мембранами грамотрицательных бактерий осуществляется согласно нескольким предложенным моделям, описанным ниже. На первом этапе взаимодействия происходит электростатическое связывание положительно заряженного пептида с отрицательно заряженными компонентами мембраны. На следующем этапе происходит встраивание пептидов в липидный бислой за счет гидрофобных взаимодействий с остатками жирных кислот. Встраивание пептидов приводит к изменению структуры мембраны, включая изменения толщины, кривизны, электростатического потенциала и прочее. Такие изменения могут привести к переориентации пептидов и/или образованию олигомерных пептидных структур. Различные варианты взаимодействия пептидов с клеточными мембранами на этом этапе описываются в рамках нескольких предложенных моделей (Рисунок 17).

"Агрегатная" модель (Рисунок 17.1) предполагает реориентацию пептидов и их встраивание в мембрану с образованием мицеллоподобных комплексов с липидами. Согласно этой модели агрегат из нескольких пептидов не принимает какой-либо определенной пространственной ориентации [138]. Эта модель хорошо описывает воздействие полифемузина – катионного пептида, выделенного из гемолимфы ракообразных – на липидные мембраны. При воздействии полифемузина на липидные мембраны образуются поры широкого спектра размеров, при формировании которых молекулы пептида могут проникать внутрь мембраны.

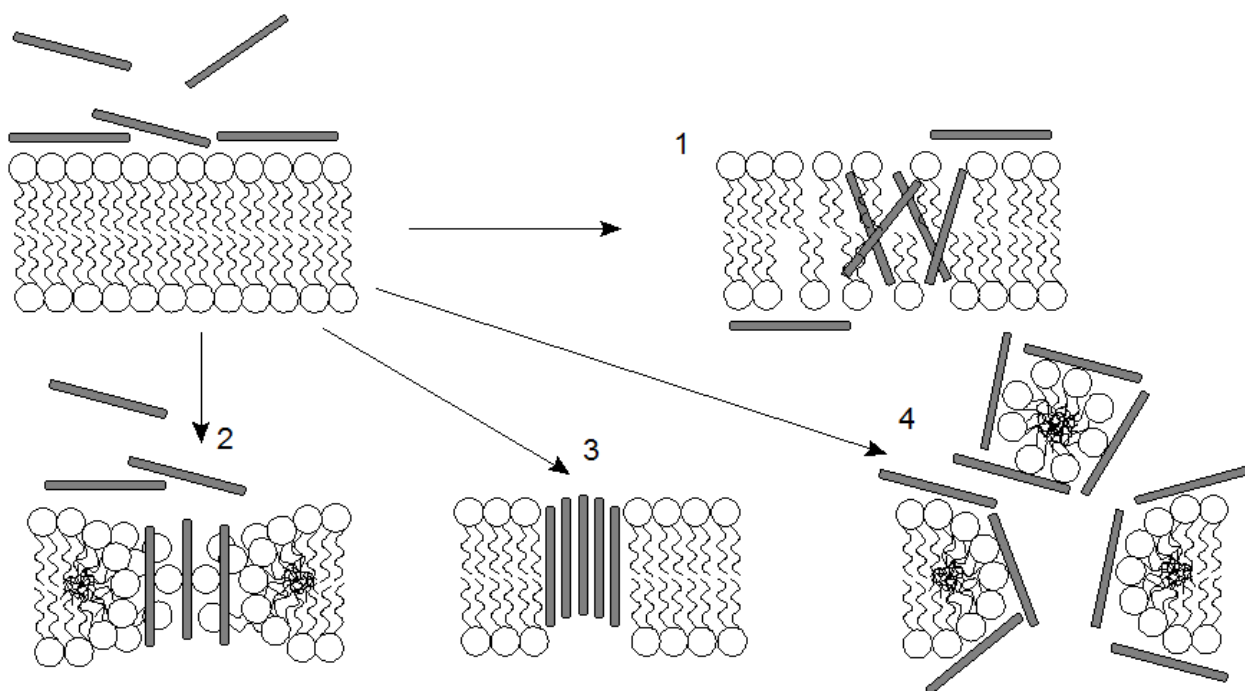


Рисунок 17. Механизм действия антибактериальных пептидов. 1 – «агрегатная» модель, 2 – модель «тороидальной поры», 3 – модель «бочек», 4 – «ковровая» модель

В модели "тороидальной поры" (Рисунок 17.2) комплекс из нескольких пептидов встраивается в мембрану, образуя пору тороидальной формы. Внутри поры молекулы пептида выстраиваются перпендикулярно мембране, образуя стенку поры. В некоторых случаях полярные головки липидов могут быть экспонированы в просвет поры. Примерами пептидов, образующими поры такой геометрии могут служить, мелитин и LL37 [139–141].

В модели "бочки" пора формируется пептидным комплексом цилиндрической формы, в котором пептиды выстроены вдоль оси цилиндра (Рисунок 17.3). При этом гидрофобные участки пептидов ориентированы наружу цилиндра и взаимодействуют с неполярными хвостами липидов, в то время как гидрофильные участки пептидов формируют просвет поры. Принципиальным фактором реализации этой модели является узнавание молекулами пептидов друг друга и связывание в единый комплекс до встраивания в мембрану, так как встраивание пептидов в мембрану в виде мономеров энергетически невыгодно [142]. В качестве примеров пептидов, образующих трансмембранные поры по модели «бочки» могут служить парадаксин и аламецитин [143,144].

Пептиды, взаимодействующие с мембраной согласно модели "ковра" действуют по аналогии детергентов (Рисунок 17.4). При достижении определенной концентрации пептидов на поверхности клеток происходит образование мицелл, внутри которых содержатся фрагменты клеточной мембраны, а снаружи – молекулы пептидов. При дальнейшем

повышении концентраций пептида в системе может происходить полное разрушение липидной мембраны. Изначально эта модель была предложена для дермасептина [145], а в последствии была использована для описания действия и других антибактериальных пептидов, например, цекропинов и PGLa [146,147].

Увеличение проницаемости внешней мембраны грамотрицательных бактерий под действием антимикробных пептидов подтверждается увеличением восприимчивости бактерий к гидрофобным антибиотикам, а также переходом внутриклеточных белков наружу. Так, например, магаинин значительно снижает концентрацию бета-лактамовых антибиотиков, подавляющую рост грамотрицательных бактерий [148], а обработка клеток *E. coli* производными пептида кателицидина приводит к появлению цитоплазматической β -галактозидазы в межклеточном пространстве [149].

Таблица 4. Минимальная ингибирующая концентрация некоторых пептидов.

Пептид	Последовательность	МИК, мкг/мл
Грамицидин С	Цикло-[LOVPF ^d] ₂	8 – 16 [150]
PGLa	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL	16 – 30 [150]
Цекропин А1	GWLKKIGKKIERVQHQHTRDATIQGLGVAQQAANVAATAR	8 – 32 [151]
Мелиттин	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	4 – 16 [151]

Катионные пептиды рассматриваются в качестве альтернативы уже существующим антибиотикам. В качестве примеров можно привести грамицидин С – первый антибиотик, разработанный в СССР, – широко используемый во время Второй Мировой войны и колистин, применявшийся для лечения легочных инфекций, вызванных *P. aeruginosa* [152]. Однако терапия катионными пептидами имеет ряд существенных недостатков. Во-первых, катионные пептиды отличаются цитотоксичностью по отношению к эукариотическим клеткам, во-вторых, бактерии способны развивать устойчивость к действию катионных пептидов. Наиболее распространены модификация поверхности бактериальной клетки, ухудшающая связывание пептидов, протеолиз пептидов, удаление пептидов из клетки под действием эффлюксных насосов [153]. Часть этих недостатков может быть нивелирована за счет оптимизации аминокислотной последовательности пептидов. Так, например, было показано, что способность пептидов нарушать структуру бактериальных мембран не коррелирует с цитотоксичностью по отношению к эукариотическим клеткам. Поэтому возможно независимо регулировать активность пептида и его цитотоксичность, изменяя аминокислотную

последовательность [154]. Протеолитическое расщепление может быть подавлено за счет введения редких или неканонических аминокислот, а также за счет синтеза пептидов, состоящих из *D*-энантиомеров аминокислот. Наряду с синтезом и изучением новых пептидов, эффективным способом контроля за патогенными бактериями, устойчивыми к антибиотикам, является использование пептидов совместно с другими антибактериальными агентами, воздействующими на клетку по независимым механизмам для достижения аддитивного или синергетического эффекта.

Трис, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+

Трис(гидроксиметил)аминометан – первичный амин. При высоких концентрациях в протонированном состоянии трис увеличивает проницаемость внешней мембраны грамотрицательных бактерий. При концентрации триса 35 мМ и pH 7,4 внешний липидный бислой клеток *P. aeruginosa* связывает гидрофобный нитроцефин, а при концентрации триса 200 мМ те же клетки становятся чувствительны к куриному лизоциму [119]. При концентрации триса 100 мМ (pH 7,2) происходит высвобождение 20% ЛПС из внешней мембраны *S. typhimurium*. На холоду при концентрации выше 50 мМ и pH 7,2 трис вызывает переход 20 – 40 % периплазматической β -лактамазы в межклеточное пространство; этот же эффект достигается при концентрации NaCl 200 – 300 мМ [155]. Предположительно при высоких концентрациях трис способен частично замещать катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , входящие в состав мембраны, и уменьшать притяжение молекул ЛПС во внешнем бислое за счет большего размера катиона. Это подтверждается сходным поведением многих объемных органических однозарядных катионов по отношению к мембранам грамотрицательных бактерий в присутствии ЭДТА (смотри далее). Аналогично объясняется эффект однозарядного катиона Na^+ .

Увеличение проницаемости внешней мембраны под действием Ca^{2+} и Mg^{2+} на холоду – широко известный эффект, применяемый при получении компетентных клеток [114]. Избыток ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} "замораживает" липополисахаридную мембрану, что приводит к образованию в ней пор, через которые возможен транспорт макромолекул.

Хелатирующие агенты

Выше уже говорилось, что наличие катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} в структуре внешней мембраны грамотрицательных бактерий является важным фактором её стабильности и целостности. Удаление этих катионов посредством комплексообразования с хелаторами, в частности с ЭДТА, приводит к высвобождению до 50 % молекул ЛПС из состава внешней мембраны, потому что электростатическое отталкивание одноименно заряженных липидов становится сильнее, чем притяжение молекул ЛПС за счет гидрофобных взаимодействий. Потеря молекул ЛПС может

приводить к переходу фосфолипидов с внутреннего слоя внешней мембраны на наружный. В свою очередь богатые фосфолипидами участки на внешней мембране служат каналом транспорта гидрофобных веществ. Таким образом, обработка грамотрицательных бактерий ЭДТА приводит к увеличению их восприимчивости к гидрофобным антибиотикам, что подтверждается на практике. Помимо высвобождения ЛПС из состава внешней мембраны *E. coli* ЭДТА также способен вызывать переход внутриклеточных белков наружу, однако это достигается только в случае осмотического шока [119].

В присутствии фосфатов, HEPES или компонентов питательной среды эффект ЭДТА ослабляется или исчезает вовсе, в то время как присутствие объемных однозарядных катионов, таких как, трис, этиламин, пропиламин, диэтиламин, приводит к усилению действия ЭДТА на клетки. Наблюдаемое усиление эффекта в присутствии однозарядных катионов говорит о том, что максимальный дестабилизационный эффект связан не только с удалением катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} из внешней мембраны, а требует замещения этих катионов объемными аминами. Это подтверждается тем, что усиления действия ЭДТА не наблюдается в присутствии трис(гидроксиэтил)нитрометана, который в отличие от триса не содержит аминогруппы.

Помимо ЭДТА существует ряд хелаторов, которые также вызывают разупорядочивание внешней мембраны грамотрицательных бактерий, включая цитрат и прочие (поли)анионы. Влияние цитрата на проницаемость внешней мембраны показано с помощью NPN-теста по отношению к *E. coli*, *S. typhimurium* и *P. aeruginosa*. Положительный эффект цитрата увеличивается в диапазоне концентраций 2 – 10 мМ. В большей степени активна протонированная форма, предположительно за счет более низкого значения pH. Способность цитрата увеличивать проницаемость мембраны для гидрофобных веществ ингибируется солями магния, что говорит о том, что эффект цитрата обусловлен захватом катионов, стабилизирующих внешнюю мембрану.

Помимо цитрата проникновение гидрофобного флуорофора *N*-фенилнафтиламина во внешний липидный бислой происходит под действием нитрилотриацетата (трилон А), аскорбата и салицилата натрия. Эффект воздействия этих веществ на внешнюю мембрану *P. aeruginosa* был показан как в положительном NPN-тесте, так и в высвобождении периплазматической β -лактамазы. Как и в случае с цитратом, действие аскорбата, салицилата и нитрилотриацетата ингибируется в присутствии 1 мМ Mg^{2+} . Однако в отличие от аскорбата и салицилата высвобождение β -лактамазы под действием 0,8 мМ нитрилотриацетата ингибируется лишь на половину. Тем не менее применение нитрилотриацетата в качестве

агента, увеличивающего проницаемость внешней мембраны, на данный момент ограничивается тем, что это вещество предположительно канцерогенно [134].

Также для флероксацина и ряда других фторхинолонов был заявлен эффект увеличения проницаемости внешней мембраны за счет связывания стабилизирующих катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} . Однако этот вывод основывается на экспериментальных данных, полученных в результате инкубации клеток с 10 мкг/мл флероксацина в течение часа. Такая концентрация флероксацина значительно превышает МИК для использованного штамма *E. coli*, поэтому наблюдаемый выход β -лактамазы из клетки вероятно обусловлен вторичными процессами, протекавшими после гибели клеток. Эффект других фторхинолонов схож с таковым для флероксацина, поэтому их способность увеличивать проницаемость внешней липидной мембраны сомнительна [119].

3. Стабилизация ферментов

Применение ферментов в аналитических целях или в производстве часто ограничено их требовательностью к "мягким" условиям реакционной среды. Снижение качества белковых препаратов при длительном хранении является дополнительным недостатком. В данный момент на рынке уже представлены десятки ферментативных препаратов и ещё больше проходят предклинические и клинические испытания. Однако если фермент, предназначенный для той или иной цели, не удастся соответствующим образом стабилизировать, его преимущества, как биокатализатора, едва ли возможно использовать на практике. Срок хранения белковых препаратов, необходимый для коммерческой прибыльности, должен составлять не менее 18 месяцев [156]. Достигнуть таких показателей бывает сложно, так как в большинстве случаев белки характеризуются умеренной стабильностью и в высокой степени подвержены деградации. Процессы деградации ферментов приводят к различным изменениям структуры белка, которые часто сопровождаются изменением взаимного расположения аминокислот, что не позволяет им участвовать в каталитическом акте или во взаимодействиях, поддерживающих нативную конформацию белковой молекулы. Процессы деградации структуры ферментов условно можно поделить на две группы: химические и физические.

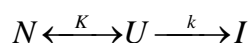
К химической деградации белков можно отнести дезаминирование, разрыв S-S связей и окисление SH-групп, гидролиз полипептидных цепей, окисление атомов железа в белках, содержащих гем. Также к этой группе процессов можно отнести такие межмолекулярные взаимодействия ферментов, как автокаталитический гидролиз и модификация функциональных групп.

В качестве физических процессов деградации белков можно привести примеры адсорбции белков на различных поверхностях, разворачивание трехмерной структуры под действием температуры, pH среды, поверхностно-активных веществ или органических растворителей, формирование агрегатов белковых молекул, диссоциация олигомерных ферментов.

Под стабильностью ферментов понимают устойчивость последних к физическим или химическим процессам деградации функциональной структуры. Во многих случаях потеря активности фермента сопряжена не с одним, а с несколькими процессами деградации. Правильно свернутая и функционально активная молекула фермента на начальном этапе, как правило, теряет свою активность благодаря конформационным изменениям. Такое разворачивание структуры называется денатурацией. Обычно денатурация кооперативна и

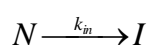
может быть обратима, если удаление фактора, вызывающего денатурацию, приводит к восстановлению активности. Развернутая денатурированная молекула фермента по сравнению с плотно упакованным нативным белком более восприимчива к различным факторам, приводящим к необратимой потере активности или инактивации [157].

Разделение процессов, приводящих к потере активности, на обратимую денатурацию и необратимую инактивацию привело к двум различным определениям термина "стабильность ферментов": термодинамическая и кинетическая стабильность. Термодинамическая стабильность подразумевает под собой устойчивость фермента к разворачиванию нативной трехмерной структуры и определяется изменением энергии Гиббса в процессе разворачивания структуры. В свою очередь кинетическая стабильность определяется устойчивостью фермента к необратимым процессам инактивации, то есть способностью сохранять ферментативную активность под действием различных факторов (температуры, pH, тип растворителя, присутствие солей и т.д.). Процессы денатурации и инактивации обычно представляют в рамках одной схемы [158]:



где N соответствует нативной, U – обратимо денатурированной, а I – инактивированной формам фермента. K – это константа равновесия между нативной и денатурированной формами, k соответствует кинетической константе скорости инактивации. Переход из нативной формы фермента в денатурированную относится к термодинамической стабильности, в то время как процесс инактивации $U \rightarrow I$ – к кинетической стабильности фермента.

В итоге, когда речь идет о продлении срока хранения ферментных препаратов, предполагается оценивать именно кинетическую стабильность фермента, так как именно она характеризует свойство фермента сохранять свою активность под действием внешних факторов. Измерение кинетической стабильности заключается в детектировании изменения каталитической активности фермента со временем, вызванного различными внешними факторами (температура, pH, присутствие низкомолекулярных соединений и прочее). Иначе говоря, оценивая кинетическую стабильность фермента, мы имеем дело с процессом перехода нативной функциональной формы фермента в необратимо инактивированную форму. Этот процесс можно представить в виде общей схемы



где N представляет нативный функциональный фермент, а I – его необратимо инактивированную форму. Математически этот процесс описывается уравнением

$$V_{in} = -\frac{d[N]}{dt} = k_{in}[N],$$

где V_{in} показывает экспериментально определяемую скорость падения активности нативной формы [159]. Часто инактивация ферментов описывается уравнением первого порядка, когда зависимость остаточной активности от времени аппроксимируется экспоненциальной кривой. Вместе с тем в литературе описаны случаи, когда зависимость остаточной активности от времени описывается более сложными кривыми, а наблюдаемая инактивация первого порядка обусловлена протеканием нескольких процессов [160].

Под стабилизацией ферментов понимают изменение физико-химических свойств среды или свойств самого фермента, приводящее к снижению скорости инактивации. Мерой стабилизации служит уменьшение константы скорости инактивации k_{in} , наблюдаемое в результате того или иного воздействия на препарат фермента [161]. Выделяют следующие подходы к стабилизации ферментов: модификация свойств среды, иммобилизация, белковая инженерия, химическая модификация фермента [162]. Ниже остановимся на каждом из этих подходов детально.

3.1. Модификация свойств среды

3.1.1. Стабилизация ферментов при помощи неорганических солей

Эффекты неорганических катионов и анионов на стабильность белковых молекул в растворе условно можно поделить на специфические и неспецифические.

Неспецифическое влияние ионов в растворе на многие биофизические явления, качественно было объяснено с помощью лиотропных рядов Гофмейстера, который исследовал способность различных солей осаждать альбумин из раствора. В ряду Гофмейстера катионы и анионы располагаются по их способности к гидратации или способности структурировать молекулы воды в ближайшем окружении. На рисунке 18, изображающем ряды Гофмейстера для ионов, слева располагаются ионы с меньшей степенью гидратации (хаотропы), справа – ионы с наибольшей степенью гидратации (космотропы). В случае плотной нативной конформации ферментов добавление хаотропов дестабилизирует структуру белка, приводя к ее разворачиванию, тогда как добавление космотропов приводит к уплотнению структуры и сохранению ферментативной активности. Данный эффект объясняется тем, что ионы с высокой степенью гидратации перетягивают молекулы воды, что, в свою очередь, приводит к увеличению числа внутримолекулярных водородных связей и более компактной структуре белка. У катионов способность к гидратации в целом ниже, чем у анионов, поэтому часто при

обсуждении эффектов стабилизации неорганических солей, не обусловленные специфическими взаимодействиями, эффектом катионов часто пренебрегают. Описанный эффект наблюдается при достаточно высоких концентрациях солей ($> 0,1 \text{ M}$) [163].

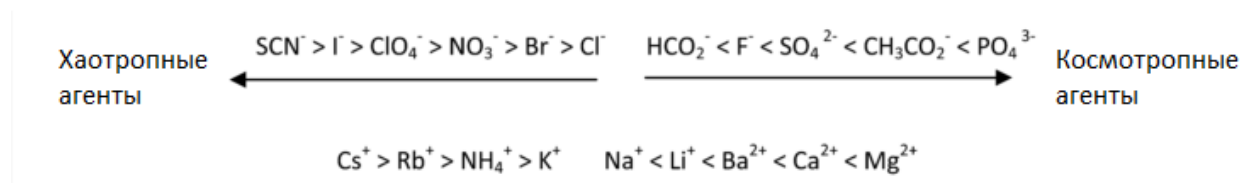


Рисунок 18. Ряды Гофмейстера для ионов.

Специфические взаимодействия катионов металлов в водных растворах и молекул ферментов часто связывают с влиянием ионов на электростатические взаимодействия заряженных остатков аминокислот в полипептидной цепи. Причем эффект катионов металлов в зависимости от их концентрации и других условий может заключаться как в стабилизации нативной структуры фермента, так и в ее дестабилизации. В качестве примера можно привести пирролизин археобактерии *Pyrococcus furiosus* – секретируемую сериновую протеазу из группы субтилаз, которая в природе функционирует в условиях горячих морских источников. Катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} при концентрациях, характерных для морской воды, оказывают дестабилизирующее действие на пирролизин, что объясняется нарушением электростатических взаимодействий поверхностных групп фермента [164]. Стабилизирующее действие катионов металлов в большинстве случаев заключается в комплексообразовании со специфическими участками на поверхности белковой глобулы, богатыми отрицательно заряженными остатками аминокислот. Отсутствие катионов металлов в этих сайтах приводит в электростатическому отталкиванию одноименно заряженных групп и дестабилизации структуры. Катион металла, размещающийся в своем центре связывания, образует солевой мостик между отрицательно заряженными группами, компенсируя их взаимное отталкивание. В результате фрагмент структуры белка, содержащий специфичный сайт, связывающий катион металла, приобретает жесткость и устойчивость к разворачиванию. Подобные структуры были показаны на примере β -галактозидазы из *Saccharopolyspora rectivirgula*, молекула которой содержит 8 сайтов связывания металлов разной степени специфичности к ионам Ca^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} . Удаление части этих катионов из их центров связывания с помощью диализа и различных хелатирующих агентов при разных температурах приводило к обратимой потере активности. Извлечение всех катионов металлов из их специфических сайтов приводило к полной и необратимой потере активности [165].

3.1.2. Стабилизация ферментов с помощью осмолитов.

Осмолиты – это вещества, регулирующие осмотическое давление в клетках и тканях, и защищающие их от слишком высокой или слишком низкой концентрации соли во внешнем пространстве. Такой активностью обладают низкомолекулярные полиолы, некоторые аминокислоты, их производные, мочевины и гуанидин.

Органические осмолиты оказывают сильное влияние на стабильность белков и широко используются для стабилизации ферментов. Присутствие осмолитов во всех живых организмах, их идентичное влияние на стабильность всех белков и отсутствие у белков специфических центров связывания осмолитов подразумевает под собой универсальный механизм действия [166].

Разные осмолиты могут оказывать как стабилизирующее (сахара, аминокислоты), так и дестабилизирующее действие (мочевина и гуанидин) в зависимости от характера межмолекулярных взаимодействий в системе белок–вода–осмолит. Присутствие осмолитов в растворе белка влияет на положение равновесия между нативной структурой белка и развернутой. Стабилизирующие осмолиты сдвигают это равновесие в сторону нативной формы, в то время как мочевины и гуанидин вызывают разворачивание белковых глобул. С точки зрения термодинамики стабилизирующие осмолиты увеличивают свободную энергию развернутого состояния белка, благоприятствуя его переходу обратно в нативную форму, денатурирующие осмолиты, напротив, снижают её, увеличивая долю денатурированных молекул белка в растворе.

Существует несколько теорий, описывающих воздействие осмолитов, но ни одна из них не претендует на полноту. К примеру, ряд авторов утверждают, что стабилизационный эффект вызван связыванием осмолитов с остовом полипептидной цепи [167,168], в то же самое время существует мнение о том, что ключевую роль могут играть изменения структуры растворителя вокруг белковой глобулы, вызванные осмолитами [169,170].

Согласно концепции преимущественных взаимодействий распределение молекул воды и осмолита в объеме раствора и вблизи поверхности белковой глобулы не одинаково. В случае, если окружение молекулы белка обогащено водой, говорят о преимущественной гидратации или об исключении осмолита из окружения белка. Обратное явление называют преимущественным связыванием осмолита. Для количественного описания этого явления используют так называемый параметр преимущественного взаимодействия ($\partial m_{\text{осмолит}}/\partial m_{\text{белок}}$), который определяется с помощью равновесного диализа. Здесь $m_{\text{белок}}$ и $m_{\text{осмолит}}$ соответствуют

молекулярным концентрациям белка и осмолита соответственно, а частная производная отражает изменение в концентрации осмолита вблизи молекулы белка при увеличении содержания белка в растворе. В случае преимущественной гидратации параметр преимущественного взаимодействия будет отрицательный, а в случае преимущественного связывания осмолита – положительный. Определение этого параметра показало, что для стабилизирующих осмолитов имеет место преимущественная гидратация. Иными словами, молекулы глицерина, сахаров, глицина, бетаина и других родственных соединений имеют тенденцию не контактировать с молекулой белка в нативном состоянии. В итоге существование молекул белка в растворе стабилизирующего осмолита менее энергетически выгодно, чем в воде. С этой точки зрения раствор осмолита можно рассматривать, как плохой растворитель для белка, как следствие, в присутствии стабилизирующих осмолитов растворимость белка падает. Концепция преимущественных взаимодействий – это описательный инструмент, позволяющий показать поведение белков в растворах осмолитов с термодинамической точки зрения [171].

Для этой же цели используется понятие сольвафильности/сольвафобности. Термин "гидрофобность" означает тенденцию неполярных молекул или функциональных групп не взаимодействовать с водой. Аналогично, сольвафобность в рассматриваемом контексте подразумевает под собой тенденцию молекул белков не взаимодействовать с молекулами осмолитов в растворе. В итоге, описание поведения белков в растворах осмолитов в терминах преимущественных взаимодействий и сольвафильности/сольвафобности взаимозаменяемы.

Существуют другие подходы, объясняющие неравномерное распределение осмолитов в объеме раствора и вблизи поверхности белка. Один из таких подходов основан на явлении поверхностного натяжения. Основная идея этого подхода заключается в том, что при денатурации фермента площадь контакта молекулы белка с раствором возрастает. Соответственно, растворитель (в нашем случае вода) за счет силы поверхностного натяжения стремится эту площадь контакта уменьшить, то есть свернуть молекулу белка в исходное нативное состояние. Осмолиты, увеличивающие поверхностное натяжение воды, будут оказывать стабилизационный эффект, и наоборот, осмолиты, уменьшающие поверхностное натяжение, будут оказывать дестабилизационный эффект [171]. Однако теория поверхностного натяжения в приложении к эффекту осмолитов на белки в ряде случаев не согласуется с экспериментальными данными. В качестве примера можно привести мочевины, которая увеличивает поверхностное натяжение воды. Согласно теории поверхностного натяжения, мочевины должны оказывать эффект преимущественной гидратации, стабилизируя фермент. Однако экспериментальные данные говорят об обратном – мочевины обладают

денатурирующими свойствами. Среди стабилизирующих осмолитов теории поверхностного натяжения противоречит триметиламин-*N*-оксид – $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$. Экспериментальные данные показывают, что он уменьшает поверхностное натяжение, в этом случае теория поверхностного натяжения предсказывает преимущественное связывание триметиламин-*N*-оксида с молекулами белка и его денатурирующий эффект. Однако на практике многими авторами показано, что это вещество обладает эффектом преимущественной гидратации, является прекрасным стабилизатором и способствует правильному фолдингу белков. Тем не менее эта теория часто используется для объяснения стабилизирующего действия сахаров и некоторых их производных [172].

3.1.3. Стабилизация ферментов с помощью комплексообразования с полиэлектролитами.

Поверхность молекул белков несет множество зарядов за счет наличия остатков лизина, аргинина, глутаминовой и аспарагиновой кислот. Как следствие, введение полиэлектролитов в раствор, содержащий белок, приводит к комплексообразованию белков и полиэлектролитов за счет электростатического притяжения разноименно заряженных функциональных групп и образования межмолекулярных водородных связей. Равновесие в системе белок–полиэлектролит смещается в сторону образования комплексов за счет энтропийного фактора, вызванного тем, что структурированные молекулы воды, гидратирующие заряженные группы белков и полиэлектролитов после образования комплекса высвобождаются в раствор. Образующаяся полиэлектролитная оболочка не должна быть слишком жесткой, иначе конформационные изменения фермента, необходимые для связывания с субстратом, станут энергетически невыгодными, что приведет к потере функциональной активности [173].

Дегидратация ферментов, сопутствующая образованию комплексов ферментов с полиэлектролитами, является важным стабилизирующим фактором. Наличие воды в гидратной оболочке ферментов, как показано на примере гексокиназы, оказывает ингибирующее действие за счет своей полярной природы. Связывание гексокиназы с полимерами молекулярной массы более 2 кДа приводит к вытеснению 65 молекул воды, часть из которых расположена возле активного центра. В результате удельная активность и стабильность гексокиназы в составе комплекса с полиэлектролитами повышается за счет более продуктивного связывания фермента с субстратом и изменения энергетики конформационных переходов [174]. Помимо частичного удаления связанной с ферментом воды стабилизирующее действие полиэлектролитов иногда объясняют повышением температуры плавления белка в

составе комплекса с полиэлектролитом. Здесь под температурой плавления понимается такая температура, при которой равновесное содержание фермента с нативной конформацией составляет 50%. Эффект поликатионов на ферменты может также заключаться в изменениях рН-зависимостей кинетических параметров и в изменении значений констант связывания субстратов, продуктов и эффекторов [175].

В целом, стратегия стабилизации ферментов с помощью образования комплексов с полиэлектролитами может быть разработана только эмпирически, так как прочность комплекса и защитный эффект зависят от множества параметров белка и полимера. В случае полиэлектролита важными характеристиками являются состав мономера, степень полимеризации (молекулярная масса), плотность заряда. Помимо этого, на устойчивость комплекса сильно влияют свойства среды. В зависимости от рН, остатки лизина, аргинина, глутаминовой и аспарагиновой кислот могут быть протонированы или депротонированы. Поэтому при разных значениях рН число межмолекулярных ионных пар будет различным, что отражается на свойствах комплекса и его составе. С возрастанием ионной силы в растворе связывание полиэлектролитов с белками ослабевает за счет того, что низкомолекулярные ионы конкурируют с полиэлектролитами за центры связывания на поверхности молекул белков. Полная диссоциация комплексов белков с полиэлектролитами наблюдается при концентрации солей выше 0,5 М [175].

В качестве удачного примера стабилизации и активации ферментов с помощью включения в комплексы с полиэлектролитами можно привести пероксидазу хрена в паре с хитозаном. Максимальная активация наблюдалась в случае использования хитозана молекулярной массы 10 кДа. Эффект объясняется сдвигом констант связывания пероксидазы с субстратом и продуктом реакции под действием хитозана. Максимальной стабильностью обладал комплекс пероксидазы с хитозаном молекулярной массы 150 кДа, который будучи иммобилизованным на пенополупетановой подложке сохранял более 50% активности после 500 дней хранения при 4 °С, что в десятки раз превышает стабильность свободного фермента в растворе [176].

Образование нековалентных комплексов с полиэлектролитами также может увеличить устойчивость ферментов по отношению к органическим растворителям. Включение тирозиназы из грибов в комплекс с катионным полимером полибреном позволило увеличить каталитическую активность фермента, значительно расширить область значений рН, при которых тирозиназа сохраняет высокую активность и сохранить функциональную активность фермента в растворе содержащем до 70 % этанола по объему [177].

3.2. Химическая модификация белков

3.2.1. Стабилизация белков с помощью химической модификации функциональных групп

Химическая модификация функциональных групп ферментов – это простой и доступный метод стабилизации белков. Лишь часть из 20 остатков аминокислот может быть подвергнута химическим превращениям в довольно мягких условиях, не денатурирующих белки. Это карбоксильные группы аспартата и глутамата, а также С-концевая карбоксильная группа, аминогруппы остатков лизина, аргинина и N-концевая аминогруппа, гидроксильные группы серина, тирозина, треонина и углеводов в составе гликопротеинов, а также имидазольная группа гистидина.

Реакционноспособные остатки аминокислот, перечисленные выше, играют разную роль в стабилизации нативной структуры белка в зависимости от химического строения, расположения и вовлечения в те или иные внутримолекулярные или межсубъединичные взаимодействия. Говоря о химической модификации белков, условно выделяют три группы аминокислотных остатков:

- к группе I относят остатки аминокислот, экспонированные в раствор. Как правило, это гидратированные полярные или заряженные группы. Группы этого типа в большинстве случаев не участвуют в стабилизирующих взаимодействиях и контактируют только с молекулами воды или ионами солей, содержащимися в растворе;
- к группе II относят остатки, расположенные вблизи поверхности молекулы белка или на ней, которые дестабилизируют глобулу по причине энергетически невыгодных взаимодействий (отталкивание одноименно заряженных групп или взаимодействие полярных групп с гидрофобными). Содержание таких групп в молекулах белка обычно невелико;
- к группе III относят остатки аминокислот, расположенные в глубине молекулы белка. Они участвуют во взаимодействиях, стабилизирующих нативную структуру белков: солевые и водородные связи. В обычных условиях аминокислотные остатки группы III не поддаются модификации из-за стерической недоступности. Их модификация осуществляется при повышенной температуре и экстремальных значениях pH, когда остатки аминокислот, расположенные внутри глобулы становятся доступными действию растворителя.

Модификация реакционноспособных остатков белка, принадлежащих к разным группам, приводит к разного рода эффектам. В большинстве случаев при степени модификации приблизительно до 50 % боковых остатков не происходит сильного изменения стабильности. При этом предположительно модифицируются остатки группы I, то есть не происходит образования новых внутримолекулярных связей между группами, приводящих к стабилизации белковой глобулы в целом. Увеличение стабильности белков при более высоких степенях модификации соотносят с модификацией функциональных групп второго типа. При этом в ряде случаев обнаруживали локальные изменения конформации, которые связывали с ростом числа и энергии внутримолекулярных связей. Максимальная степень модификации часто приводит к денатурации белковой глобулы, так как при этом затрагиваются аминокислотные остатки третьего типа, расположенные вдали от поверхности молекулы, вовлеченные в наиболее сильные стабилизирующие взаимодействия (например, притяжение двух разноименно заряженных групп в гидрофобном окружении с низкой диэлектрической проницаемостью) [178].

Таким образом при проведении химической модификации белка с целью повышения его стабильности важно подобрать как природу агента, так и степень модификации. Распределение функциональных остатков аминокислот по трем группам индивидуально для каждого белка, поэтому поиск оптимальной степени модификации осуществляется в каждом случае эмпирически. Это позволяет подобрать такую степень модификации белка, которая обеспечивает образование дополнительных внутримолекулярных связей и не влияет на взаимодействия групп третьего типа, отвечающих за поддержание нативной конформации глобулы.

В качестве примера можно привести бромелаин – тиоловую протеазу ананаса. В полипептидной цепи бромелаина присутствует 15 остатков лизина. При модификации менее 50% остатков Lys с помощью различных ангидридов не происходит заметных изменений удельной активности и термостабильности. Модификация 8–9 титруемых остатков приводит к повышенной термостабильности, что отражается на возрастании ΔG^\ddagger инактивации с 78,7 до 80,2 кДж/моль. При такой степени модификации данные ИК-спектроскопии показывают минимальные изменения структуры глобулы бромелаина, из чего авторы заключают, что такой режим модификации бромелаина не затрагивает внутренних слоев структуры фермента [179].

При химической модификации фермента возможно не только модулировать заряд поверхности белка и участков, располагающихся вблизи неё, но и изменять соотношение гидрофильных/гидрофобных фрагментов. В различных ситуациях гидрофобизация или

гидрофилизация белков может давать свои преимущества. Например, гидрофилизация поверхности белка позволяет уменьшить долю энергетически невыгодных контактов гидрофобных кластеров поверхности с водой, число которых при денатурации растёт, что в конечном итоге приводит к увеличению стабильности нативного состояния глобулы. Такой подход позволил значительно увеличить стабильность пероксидазы хрена с помощью цитраконового ангидрида, введение которого в структуру белка подразумевает появление объёмного гидрофильного заместителя [180].

3.2.2. Стабилизация белков с помощью наложения внутримолекулярных и межмолекулярных сшивок

Поддержание компактной нативной структуры белка обусловлено различными типами взаимодействий. Среди них ковалентные дисульфидные связи выделяются своей прочностью; наблюдается явная корреляция стабильности ферментов и количества S-S связей в структуре. Аналогично дисульфидным мостикам, для стабилизации нативной конформации белков применяют бифункциональные реагенты, которые образуют прочные связи между различными участками полипептидной цепочки, снижая энтропию молекулы в целом. Применение этого подхода обусловлено сравнительно высоким содержанием и разнообразием функциональных групп на поверхности белков. При химической модификации белков бифункциональным сшивающим агентом обе группы последнего взаимодействуют с различными функциональными группами одной молекулы белка, закрепляя его структуру или препятствуя диссоциации олигомерных структур [181].

Наложение внутримолекулярных сшивок является подходящим выбором в том случае, если потеря активности фермента происходит в результате нарушения нативной структуры глобулы. Как и химическая модификация, метод наложения сшивок прост в применении и не требует дорогостоящих реагентов (за некоторыми исключениями). Однако этот способ обладает рядом сложностей, среди которых можно выделить ряд конкурирующих процессов: одноточечная модификация белка, когда лишь одна из двух групп бифункционального агента вступает во взаимодействие с молекулой белка, и наложение межмолекулярных сшивок, при которой группы бифункционального агента взаимодействуют с двумя разными молекулами белков. Зачастую наложение сшивок приводит к снижению активности модифицированного фермента по сравнению с нативным, так как повышенная жесткость третичной структуры

может препятствовать конформационным изменениям фермента, необходимым для связывания субстрата и протекания каталитического акта [182].

В качестве примеров удачного применения метода наложения сшивок для повышения стабильности можно привести работу, в которой α -глюкозидаза из термофильного *Thermococcus* AN1 была модифицирована глутаровым альдегидом в присутствии бычьего сывороточного альбумина и без него. В случае наложения сшивок на гомогенный препарат α -глюкозидазы значительного изменения стабильности не наблюдалось, тогда как время полуинактивации ковалентно сшитого фермента с БСА увеличилось с 5 до 8 минут при 110 °С. Последующее введение в систему 50% трегалозы позволило увеличить время полуинактивации до 90 минут при той же температуре [183].

Как упоминалось выше, наложение межсубъединичных сшивок является эффективным средством предотвращения диссоциации олигомерных ферментов. Такой подход позволил увеличить стабильность тетрамерной *D*-гидантоиназы из *Bacillus stearothermophilus*. Наложение сшивок с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида привело к увеличению стабильности в 4 раза при 37 °С – время полуинактивации для нативного фермента составляло 9,5 минут, тогда как для сшитого – 37. Также модифицированная *D*-гидантоиназа проявляла активность при 70 °С и в присутствии 20% метанола. Аналогичные условия приводили к мгновенной инактивации нативного фермента [184].

Одним из способов подавления диссоциации ферментов является образование нековалентных комплексов с полиэлектролитами (обсуждалось выше). Однако реакции комплексообразования обратимы. Иногда по этой причине не удается предотвратить нежелательную диссоциацию. В том случае, если комплекс фермента с полиэлектролитом неустойчив, целесообразно ввести ковалентные сшивки между глобулой белка и молекулами полимера с помощью бифункциональных реагентов. Таким образом удалось значительно повысить стабильность глутаматдегидрогеназы, которая была ковалентно пришита к полиэтиленимину с помощью глутарового альдегида [185].

Наложение химических сшивок для увеличения стабильности проводят также и по отношению к ферментам в твердой фазе (в виде осадка или микрокристаллов). Этот метод можно также рассматривать, как способ иммобилизации, о которой речь пойдет далее. Однако по сравнению с другими методами стабилизации химическая сшивка фермента в осадке или микрокристаллах не требует дополнительного носителя. Стабилизационный эффект этого метода заключается в пониженной конформационной мобильности молекул фермента и в минимизации неблагоприятных контактов с растворителем. По этой причине метод введения

сшивок в микроскрсталлы и агрегаты неприменим к ферментам, специфичным по отношению к высокомолекулярным субстратам [186].

3.2.3. Стабилизация ферментов методом иммобилизации

Под иммобилизацией ферментов принято понимать любое ограничение движения белковых молекул или их фрагментов в пространстве [187]. Под это определение попадает в том числе метод наложения сшивок, описанный выше. Однако зачастую под иммобилизованными ферментами понимают ферменты, тем или иным способом связанные с носителем. Применение иммобилизованных ферментов по сравнению с их растворимыми аналогами обладает рядом технологических преимуществ. Иммобилизованный фермент легко отделить из реакционной среды, что позволяет в нужный момент остановить реакцию, использовать фермент повторно и получать продукт реакции без примесей катализатора. Также применение различных приемов иммобилизации позволяет регулировать важные характеристики ферментов, такие как стабильность, субстратную специфичность, оптимальные условия функционирования и прочее.

Широкий спектр задач, для которых требуется разработка иммобилизованных ферментов, разнообразие самих ферментов, их субстратов и продуктов не позволяет предложить какой-то общий метод иммобилизации, который подойдет во всех случаях. Для выбора конкретной стратегии иммобилизации важно учитывать следующие параметры ферментов: толерантность к иммобилизации, размер глобулы, общий заряд/pI, распределение гидрофобных и гидрофильных кластеров, характер связывания с субстратом и диссоциация продукта, химическое и физическое окружение. Каждое из этих свойств обуславливает выбор конкретного типа иммобилизации, подходящего под решение конкретной задачи. Методы иммобилизации можно поделить на физические и химические. К физическим методам относятся адсорбция на носителях, включение в гели, использование полупроницаемых оболочек (мембран). К химическим методам относятся любые методы ковалентной пришивки фермента к носителям.

Ниже рассмотрим основные типы иммобилизации с точки зрения увеличения стабильности иммобилизуемого фермента.

Метод адсорбционной иммобилизации основан на связывании и удерживании фермента на носителе за счет нековалентных взаимодействий. Среди таких взаимодействий можно выделить неспецифические ван-дер-ваальсовы взаимодействия, водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия. В том случае, если при связывании

фермент замещает на поверхности носителя связанные молекулы растворителя и/или ионы электролитов, увеличение энтропии в результате адсорбции также способствует удерживанию фермента у поверхности носителя [188].

Связывание и удерживание фермента на поверхности носителя сильно зависит от внешних условий. Основными факторами, определяющими адсорбцию фермента являются рН, ионная сила раствора, концентрация фермента, удельная площадь носителя и его пористость. Максимальное связывание фермента с носителем достигается подбором оптимальных значений параметров, указанных выше, а также с помощью предварительной модификации носителя и/или фермента. Предварительная модификация может не только увеличить эффективность связывания, но также изменить каталитические свойства иммобилизованного препарата по сравнению с исходным за счет изменения микроокружения фермента. Стабильность ферментов, адсорбированных на поверхности носителя, может достигаться за счет нескольких факторов. Во-первых, иммобилизованные ферменты за счет закрепления на носителе не участвуют в межмолекулярных взаимодействиях друг с другом, поэтому связывание с носителем превосходно подходит для повышения стабильности ферментов, склонных к агрегации или протеолизу. Во-вторых, формирование подходящего микроокружения вокруг фермента может также сохранять каталитическую активность [187]. Например, гидрофобное окружение при иммобилизации липазы В из *Candida antarctica* в порах стирол-дивинилбензоловых носителей увеличивает стабильность по отношению к пероксиду водорода [189]. В случае олигомерных ферментов адсорбция на поверхности часто значительно снижает диссоциацию субъединиц. Эффект зависит от сложности строения фермента. Димеры и тримеры в большинстве случаев более стабильны в иммобилизованном состоянии, чем в свободном. В то же время диссоциация тетрамерного белка, субъединицы которого расположены в вершинах тетраэдра едва ли может быть предотвращена, так как при любой ориентации фермента одна из субъединиц не будет взаимодействовать с носителем. В таких случаях прибегают к наложению шивок бифункциональными агентами после иммобилизации на носителе [190]. Часто, говоря о стабилизационном эффекте иммобилизации, упоминают повышенную жесткость структуры фермента, связанного с носителем по сравнению со свободным ферментом. Едва ли этот эффект велик в случае адсорбционной иммобилизации, так как связи между ферментом и носителем достаточно слабые. Связывание адсорбированного фермента на носителе носит динамический характер, то есть ряд связей всё время разрушаются и образуются новые в другом месте соприкосновения фермента с носителем. Тем не менее об ужесточении структуры фермента при адсорбции говорят, приводя

ставший уже классическим пример адсорбции липаз. При адсорбции липаз на гидрофобных носителях удастся достичь даже более высокой стабильности, чем при ковалентной иммобилизации. Эффект объясняется тем, что на носителе фиксируется открытая конформация липаз, которая наиболее стабильна [191].

Среди преимуществ иммобилизации с помощью адсорбции можно отметить простоту, обилие носителей разных форматов и их свойств. Для адсорбционной иммобилизации не требуется использования высокочистых препаратов ферментов, что является большим плюсом для крупномасштабного применения биокатализаторов, так как каждая стадия очистки повышает стоимость катализатора и конечного продукта. Основным недостатком адсорбционной иммобилизации – самопроизвольная диссоциация фермента с поверхности носителя, что приводит к загрязнению продукта ферментом [190].

Суть метода включения фермента в гель состоит в заключении молекул фермента в ячейки трехмерной сетки геля без образования ковалентных связей между ферментом и носителем. Введение фермента в гель осуществляют одним из двух способов: 1) полимеризация геля в растворе фермента, 2) внесение фермента непосредственно в раствор полимера, который в зависимости от условий может переходить из растворенного состояния в гелеобразное.

Стабильность ферментов, включенных в гель может быть в 50–100 раз выше, чем несвязанного фермента. Эффект стабилизации в большинстве случаев объясняют снижением конформационной подвижности фермента в ячейках геля [192]. Среди преимуществ метода можно отметить простоту и универсальность методики. Этот метод применим для любых ферментов, позволяет получать препараты любой геометрии (гранулы, пленки) с равномерным распределением фермента по объему. Однако полимерная матрица геля может являться диффузионным препятствием для субстрата и продукта, что снижает каталитическую активность препарата. В этом заключается основной недостаток метода [187].

При иммобилизации ферментов с использованием полупроницаемых оболочек раствор фермента отделяют от водного раствора субстрата мембранами, проницаемыми только для низкомолекулярных соединений. Отделение фермента полупроницаемой мембраной реализуется в нескольких методах, описанных ниже.

Метод микрокапсулирования основан на формировании полимерной мембраны вокруг пузырьков водной фазы в эмульсии на границе раздела вода–органический растворитель. Метод двойного эмульгирования заключается в диспергировании обратной эмульсии, содержащей фермент. В результате получается эмульсия капелек органического растворителя в

воде, внутри которых находятся ещё более мелкие капельки водной фазы, содержащие фермент. Метод включения в волокна методологически представляет собой вариант микрокапсулирования, отличие заключается лишь в морфологии частиц, содержащих фермент. Метод включения в липосомы основан на самопроизвольном образовании липосом, содержащих молекулы фермента, при смешивании липидов и раствора фермента; пустые липосомы и свободные молекулы фермента впоследствии отделяются методами хроматографии или центрифугирования [187].

Для стабилизации ферментов наибольшее распространение получил метод включения ферментов в липосомы, так как среди перечисленных выше методов здесь удается минимизировать контакт раствора фермента с неполярным растворителем, что часто приводит к инактивации. Иными словами процесс включения ферментов в липосомы минимально влияет на структуру белковых глобул, позволяя избежать потерю активности в результате иммобилизации. В качестве примера успешного использования этой методики можно привести включение каталазы из бычьей печени в липосомы, образованные 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолином. Этот пример особо показательный, так как включение в липосомы в случае каталазы позволяет добиться сразу нескольких эффектов, повышающих стабильность. Термоинактивация этого фермента в основном определяется диссоциацией активного тетрамера. При заключении фермента в липосомы диссоциация значительно подавляется. Вместе с тем повышается операционная стабильность каталазы в присутствии её субстрата – перекиси водорода. В виду высокой концентрации фермента внутри липосом, перекись водорода очень быстро разлагается и в меньшей степени расходуется на неспецифическое окисление функциональных групп фермента [193].

Ковалентная иммобилизация предполагает многоточечное связывание молекулы фермента с носителем. Основным преимуществом этого метода является прочное закрепление фермента, что главным образом минимизирует вымывание катализатора в реакционную среду и загрязнение продукта реакции ферментом. Выбирая между ковалентной иммобилизацией и адсорбцией на носителе, второй вариант предпочтительнее в случае проведения ферментативной реакции в органических растворителях, минимизирующих десорбцию фермента. Ковалентная иммобилизация предпочтительнее в случае катализа в водной среде и/или при наличии факторов, способствующих денатурации глобулы. Многоточечные ковалентные связи молекулы фермента и носителя значительно снижают конформационную подвижность и тепловые колебания, предотвращая денатурацию и разворачивание глобулы [188].

Для получения оптимального по активности и стабильности биокатализатора с помощью ковалентной иммобилизации в каждом конкретном случае требуется подбирать индивидуальные условия пришивки фермента к носителю. В зависимости от особенностей распределения функциональных групп фермента по поверхности характер связывания, формирующегося при иммобилизации, будет варьировать от случая к случаю. Однако, как правило, использование аминокрупп фермента для иммобилизации дает положительный результат (и является очень популярным), так как остатки лизина и аргинина, встречающиеся в белках в больших количествах, располагаются преимущественно ближе к поверхности. Нуклеофильные аминокруппы могут вступать в реакцию с активированными носителями, поверхность которых обогащена альдегидными или эпоксидными группами. В случае реакции с альдегидными группами происходит образование оснований Шиффа. Образование оснований Шиффа обратимо, и при кислых значениях pH равновесие смещается в сторону исходных реагентов. Для того, чтобы иммобилизация была необратима, основания Шиффа восстанавливают с помощью NaBH_4 . Также широкое распространение получил метод пришивки с участием карбоксильных групп белков и аминокрупп носителя (или наоборот) с помощью карбодиимидов [162].

Как и в случае адсорбции на носителе, при ковалентной иммобилизации можно варьировать гидрофобность/гидрофильность носителя. Дополнительно можно варьировать длину и жесткость линкера между носителем и белком. Длинные линкеры обеспечивают более высокую степень подвижности белковой глобулы, что может играть важную роль в случае ферментов, претерпевающих значительные конформационные изменения во время каталитического акта (например, липаз). С другой стороны более короткие линкеры жестче закрепляют структуру белка на носителе предотвращая денатурацию. В работе [194] показано, что стабильность препарата пенициллинацилазы, модифицированной на модифицированном аминокруппами метакрилате, повышается с уменьшением длины линкера.

В целом, ковалентная иммобилизация является превосходным методом для получения стабильных биокатализаторов многократного использования. Этот метод позволяет достичь увеличения стабильности в сотни тысяч раз [162]. Однако главный недостаток метода заключается в часто наблюдаемом снижении каталитической активности за счет жесткого многоточечного закрепления фермента на поверхности носителя.

3.2.4. Стабилизация ферментов методами белковой инженерии

Свойства ферментов, такие как активность, стабильность и специфичность, определяются первичной последовательности аминокислот. Изменение аминокислотной последовательности белка с целью придания ему желаемых свойств стало возможным с развитием технологии рекомбинантных ДНК и получило название белковой инженерии [195].

Основной задачей стабилизации ферментов методом белковой инженерии является поиск аминокислот или фрагментов полипептидной цепи, замена которых приведет к увеличению стабильности. В инженерии белков принято выделять несколько направлений: рациональный дизайн, направленная молекулярная эволюция и ряд математических методов, основанных на сравнении аминокислотных последовательностей группы родственных белков из различных организмов.

Суть этого метода рационального дизайна белков заключается в анализе последовательностей и структур известных стабильных белков. Основываясь на микроокружении и взаимодействиях аминокислот, предположительно ответственных за стабильность, в описанных стабильных формах белка, в первичную последовательность целевого фермента вводятся соответствующие замены с помощью сайт-направленного мутагенеза. Если новая мутантная не обладает желаемой стабильностью, описанный цикл операций (анализ структур → выявление заменяемых остатков → синтез белка) повторяют снова [196].

Такой подход пользуется популярностью за счет развития большого количества баз данных, содержащих различную информацию о белках. Тем не менее успех рационального дизайна белков не может быть достигнут без детальной информации о последовательностях, структурах и свойствах целевого белка и его стабильных ортологов. На практике существующие базы данных содержат информацию не о всех существующих белках, также далеко не во всех случаях удается найти стабильный родственный фермент. К тому же сравнительный анализ нескольких белков, направленный на выявление аминокислот, требующих замен для повышения стабильности, отличается сложностью, возрастает с ростом длины полипептида и не всегда дает предсказуемые результаты [197].

В качестве примера, метод рационального дизайна белков нашел применение при создании мутантных форм циклогексанонмонооксигеназы, устойчивых к окислению [198]. Основная причина инактивации циклогексанонмонооксигеназы заключается в окислении

остатков цистеина и метионина, расположенных вблизи поверхности или рядом с активным центром. Несколько остатков цистеина и метионина были выбраны для замены на основе сравнения последовательности циклогексанонмонооксигеназы и фенилацетонмонооксигеназы, отличающейся повышенной стабильностью. Были синтезированы две мутантные формы циклогексанонмонооксигеназы с заменами Met400Ile/Met412Leu и Met5Ile/Met291Ile/Met481Ala/Cys376Leu/Cys520Val. Первый мутантный белок проявлял повышенную термостабильность – инкубация при 38 °C не приводила к значительным потерям активности, тогда как фермент дикого типа полностью инактивировался в тех же условиях. Вторая мутантная форма, полученная введением 5 замен, привела к повышенной устойчивости фермента к перекиси водорода. После 3х часов инкубации в присутствии 100 мМ H₂O₂ эта мутантная форма сохраняла 40% активности, тогда как фермент дикого типа полностью терял активность в присутствии 5 мМ H₂O₂ в растворе.

Метод молекулярной эволюции основан на симуляции эволюционного процесса на молекулярном уровне *in vitro* для получения белков, ДНК или РНК с заданными свойствами. Типичный эксперимент создания мутантной формы белка методом молекулярной эволюции включает три этапа: 1) получение библиотеки мутантных ДНК с помощью случайных мутаций или перестановок; 2) тестирование и отбор полученных мутантов, обладающих желаемым свойством; 3) клонирование отобранных вариантов и наработка соответствующего гена в достаточных для секвенирования количествах с целью определения характера и количества замен по сравнению с исходным материалом.

Преимущества этого метода заключаются в том, что для его осуществления не нужно обладать какой-либо информацией о строении белка или об аминокислотах, ответственных за интересующее нас свойство. Вместе с тем, создание системы поиска мутанта с нужными свойствами в библиотеке может быть достаточно затратным по времени и усилиям [199].

Эlegantное применение метода молекулярной эволюции было продемонстрировано в работе по увеличению термостабильности люциферазы светляков [200]. В ходе работы был разработан быстрый удобный и нелетальный способ отбора мутантных колоний *E. coli*, экспрессирующих ген люциферазы, который основан на том, что колонии, выращенные на поверхности твердой питательной среды светятся, если поверх среды нанести тонкий слой буферного раствора, содержащий один из субстратов – люциферин (второй необходимый субстрат – АТФ – всегда присутствует в цитоплазме бактериальных клеток). Эволюционный цикл заключался в инкубации чашки Петри с колониями *E. coli*, экспрессирующих

люциферазу, при повышенной температуре. После этого отбирали наиболее ярко светящиеся колонии методом, описанным выше, пересеивали их, и на следующий день повторяли процедуру снова. После 4х пассажей была получена мутантная форма, содержащая 8 замен по сравнению с исходным ферментом. Четыре из восьми замен были идентифицированы, как ответственные за повышение термостабильности. В результате время полуинактивации полученной мутантной формы люциферазы составило 10 часов при 42 °C, что в 65 раз выше, чем аналогичный показатель исходного фермента [200].

В последние годы был разработан ряд биоинформатических подходов для предсказания изменения стабильности при введении замен аминокислот в первичную последовательность белков (data-driven protein design). В большинстве своем эти методы, как метод рационального дизайна, основаны на анализе последовательности аминокислот, структур белков и других доступных данных (например, данных базы ProTherm) с целью предсказать изменение стабильности, вызываемое точечной заменой одного аминокислотного остатка. Также предпринимаются попытки определения аминокислот (или участков аминокислотной последовательности), вовлеченных в энергетически невыгодные взаимодействия, способствующие таким образом денатурации глобулы [162,201].

Использование разных исходных данных, разных методов обсчета и разных тренировочных и тестовых наборов белков, приводит к результатам различной степени предсказательной способности. Например, с помощью метода опорных векторов удастся верно предсказать уменьшение или увеличение стабильности фермента в 84% случаев, исходя лишь из первичной последовательности белка [202]. В отсутствие информации о структуре целевого белка предсказание о влиянии точечной мутации на стабильность фермента можно также осуществить с помощью алгоритма, оптимизированного на основе >2000 пар белков, отличающихся одной аминокислотой [203]. Предсказательная способность этого алгоритма сильно зависит от соотношения объема заменяемой и замещающей аминокислот. Более точные предсказания получены для замен более объемных остатков на менее объемные. Подобных алгоритмов на текущий момент создано большое количество. Перечисление всех разработок, их анализ и сравнение выходят за рамки данной работы, так как методы белковой инженерии не применялись в данной работе. В заключение стоит отметить, что несмотря на обилие подходов, использующих численные методы для предсказания стабильности фермента, их предсказательная

способность существенно ограничена. Однако их применение на практике совместно с другими методами белковой инженерии дает положительные результаты.

В качестве примера использования математических методов для выбора заменяемой аминокислоты можно привести работу по увеличению стабильности кокаинэстеразы из родококков. Этот фермент в перспективе может быть использован для предотвращения негативных последствий передозировки кокаином, однако период полуинактивации кокаинэстеразы составляет 11 минут при 37 °С, что сильно ограничивает применение этого фермента на практике [204].

Методами молекулярной динамики был смоделирован процесс денатурации фермента. В результате авторы работы выявили термолабильную область вблизи активного центра и закрепили ее с помощью точечной мутации Leu169Lys, предсказанной теоретически. Время полуинактивации полученной мутантной формы составило 570 минут при 37 °С, что более чем в 50 раз превышает аналогичный показатель для исходного фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

4. Материалы

Препарат бактериофага S-394 был любезно предоставлен Пугачевым Владимиром Георгиевичем, заведующим сектором отдела биофизики и экологических исследований ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора.

В экспериментах по клонированию, выделению и очистки фермента Lys394, были использованы: дезоксинуклеотидтрифосфаты (Thermo Fisher, Литва); трис(гидроксиметил)аминометан, имидазол, NaCl, NiSO₄, RbCl (Sigma, США); акриламид, *N,N'*-метиленабисакриламид (BioRad, США); агароза (Biogene, Германия); ЭДТА, ампициллин, персульфат аммония, тетраметилэтилендиамин, бромистый этидий, изопропил-β-*D*-тиогалактозид, MOPS (AppliChem, Германия); глицин, триптон, дрожжевой экстракт, агар (Panreac, Испания); MnCl₂, ацетат калия, CaCl₂, глицерин (Fluka, Швейцария); хлороформ, уксусная и соляная кислоты (марки х.ч.) и ректифицированный этанол.

Для проведения работ по клонированию гена эндолизина были использованы следующие ферменты: Taq-полимераза, лигаза бактериофага T4, рестриктазы BamHI и HindIII (Thermo Fisher, Литва).

Для приготовления растворов использовалась вода, очищенная на установке MilliQ (Millipore, США).

При изучении свойств фермента также использовали цитрат натрия, Na₂HPO₄, NaOH, кумасси G250, фосфорную кислоту, куриный лизоцим, ZnCl₂, MgCl₂, CoCl₂, CuCl₂, NiCl₂, FeCl₂, FeCl₃, CrCl₃ (Sigma, США).

В экспериментах по увеличению проницаемости внешней мембраны *E. coli* были использованы пептиды PGLa (GMASKAGAIAGKIAKVALKAL), магаинин (GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS), протамин, поли-*L*-лизины (1–4 и 30–70 кДа), поли-*L*-аргинины (5–15 кДа, 15–70 кДа и > 70 кДа), колистин производства Sigma (США), блок-сополимеры лизина и этиленгликоля Lys₁₀ЭГ₁₁₄ и Lys₃₀ЭГ₁₁₄ производства Alamanda Polymers (США), субстрат для β-лактамаз CENTA (EMD Millipore Chemicals, США), эндолизин бактериофага SPZ7, выделенный нами самостоятельно из фаголизата клеток *Salmonella enteritidis* штамм 60 [205].

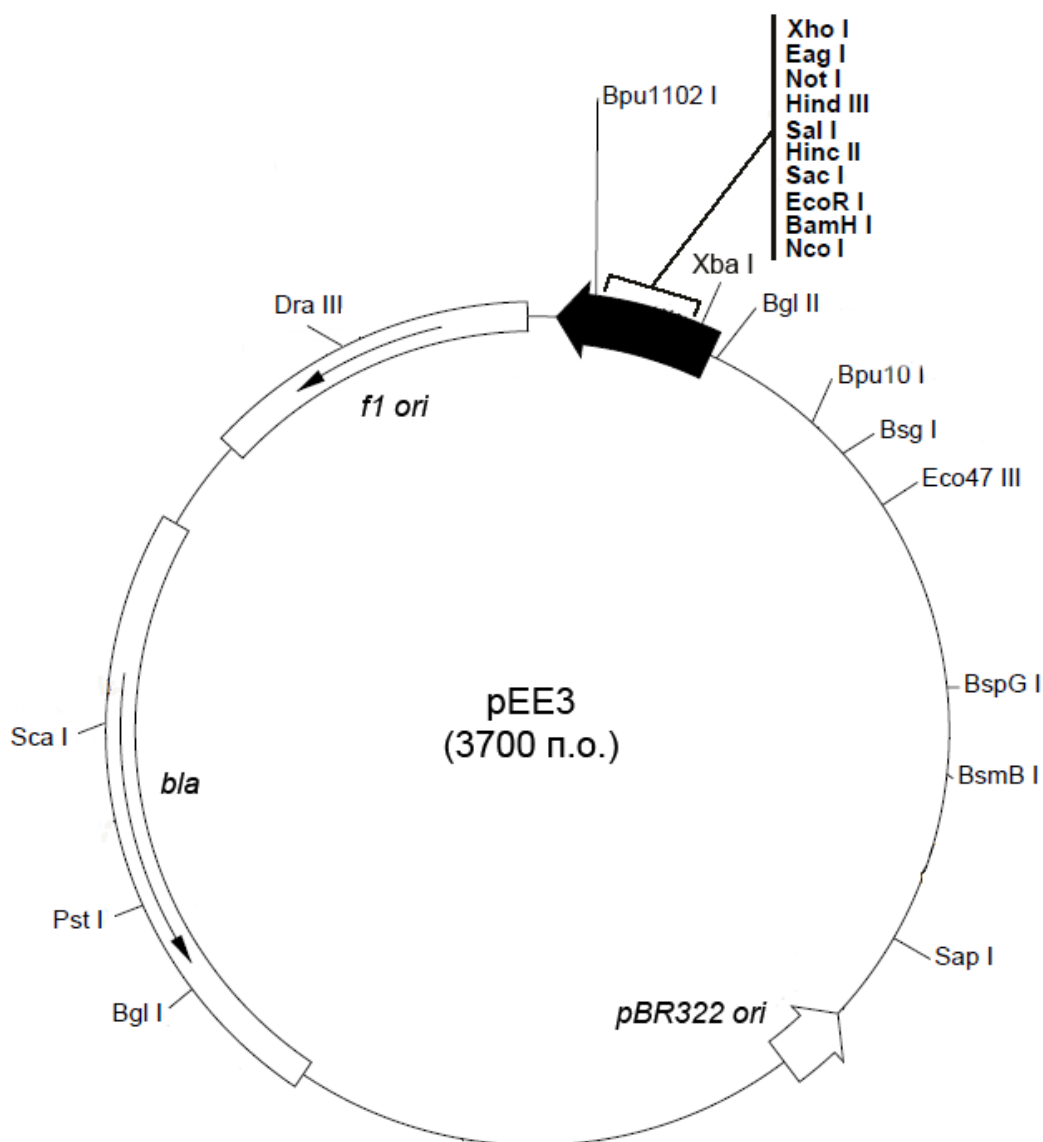
В экспериментах по стабилизации фермента Lys394 были использованы сахароза, трегалоза, фруктоза, глюкоза (Fluka, Швейцария).

Штаммы *E. coli*, использованные в работе, указаны в таблице 5.

Таблица 5. Штаммы *E. coli*, использованные в работе.

Штамм	Генотип
<i>E. coli</i> CR63	F-, λ-, serU60(AS), lamB63
<i>E. coli</i> NovaBlue	endA1 hsdR17 ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ΔM15::Tn10] (Tet ^R)
<i>E. coli</i> C41(De3)	F- ompT gal dcm hsdS _B ($r_B^- m_B^-$)(DE3)
<i>E. coli</i> C43(De3)	F ⁻ ompT gal dcm hsdS _B ($r_B^- m_B^-$)(DE3)
<i>E. coli</i> B834(De3)	F ompT gal dcm hsdS _B ($r_B^- m_B^-$) met(DE3)

Для создания генноинженерной конструкции был использован вектор рЕЕЗ, любезно предоставленный М. М. Шнейдером – сотрудником лаборатории Белковой Инженерии ИБХ РАН. Вектор рЕЕЗ был синтезирован на основе коммерческого вектора рЕТ23. Отличие двух векторов заключается в наличии у вектора рЕЕЗ участка, добавленного к 5'-концу полилинкера, кодирующего последовательность из шести остатков гистидина, а также сайт гидролиза высокоспецифичной TEV протеазой (Рисунок 19). Использование этого вектора для клонирования позволяет синтезировать целевой рекомбинантный белок с гистидиновой меткой, которую в случае необходимости можно отщепить с помощью TEV протеазы, узнающей свой сайт гидролиза с высокой специфичностью.



M G S S 6xHis S S G TEV 2 3 4...

Рисунок 19. Сверху: схема вектора pEE3, использованного для клонирования гена Lys394; снизу: схема N-концевого фрагмента рекомбинантного белка, синтезируемого с использованием плазмиды pEE3 (аминокислоты представлены в виде однобуквенного обозначения, 6xHis – гексагистидин, TEV – сайт гидролиза TEV-протеазой, цифрами обозначены номера остатков клонируемого белка).

5. Методы

5.1. Полимеразная цепная реакция

Выделение гена эндолизина Lys394 проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя амплификатор Терцик (Россия). Объем реакционной смеси составлял 30 мкл. Для проведения реакции в тонкостенную пробирку объемом 0,5 мл вносили 3 мкл 10x буфера для Taq-полимеразы, праймеры до конечной концентрации каждого 0,4 мкМ, нуклеотидтрифосфаты до конечной концентрации каждого 0,2 мМ, суспензию бактериофага в качестве ДНК-матрицы до конечной концентрации 1000 БОЕ/мл (оптимальное значение концентрации фаговых частиц было подобрано эмпирически) и 2 ед. Taq ДНК-полимеразы. Затем в пробирку добавляли минеральное масло и прогревали 5 минут при 95 °С. После чего проводили 25 циклов нагревания-охлаждения. Каждый из циклов включал 1 минуту при 95 °С, 1 минуту при температуре отжига, оптимальное значение которой подбиралось экспериментально, и 1 минуту при 72°С.

5.2. Очистка фрагментов ДНК

В зависимости от целей эксперимента очистка фрагментов ДНК проводилась одним из двух методов: с помощью набора реактивов QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Нидерланды) или с помощью набора реактивов Gel Extraction Kit (Thermo Fisher, Литва). Второй метод использовался после предварительного разделения фрагментов с помощью электрофореза в агарозном геле при необходимости выделения одного из нескольких фрагментов в смеси. Методы применялись согласно рекомендациям производителей.

5.3. Рестрикция

Рестрикцию фрагментов ДНК по сайтам BamHI и HindIII проводили в один этап в буферном растворе R+ ((Thermo Fisher, Литва) в суммарном объеме 20 мкл. Для расщепления 200 нг ДНК фрагмента использовали 2 единицы активности каждой из рестриктаз. Реакцию проводили в течение 1 часа при 37 °С.

5.4. Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез ДНК-фрагментов проводили при напряжении 5 В/см в 1 % агарозном геле в трис-ацетатном буферном растворе (40 мМ трис, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА pH 8,0). Детекцию ДНК проводили окрашиванием бромидом этидия с последующей визуализацией УФ-облучением (Vilber Lourmat, Франция).

5.5. Лигирование фрагментов ДНК

Для приготовления реакционной смеси в пробирку вносили 2 мкл 10-кратного лигазного буфера, 5 мкл линейризованной векторной ДНК, 5 мкл встраиваемого фрагмента и 8 мкл деионизованной воды. Соотношение встраиваемого фрагмента к вектору составляло 5:1. Реакцию проводили при +4 °С на протяжении ночи. Для последующей трансформации клеток *E. coli* NovaBlue использовали 5 мкл лигазной смеси.

5.6. Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Единичную колонию *E. coli* переносили в 20 мл среды 2хТУ и инкубировали в течение ночи в шейкере при 37 °С. 2,5 мл полученной культуры переносили в 250 мл среды 2хТУ и инкубировали в шейкере при 37 °С до достижения OD_{600} 0,4–0,6. Полученную культуру клеток и все используемые на следующих этапах растворы охлаждали до 0 °С на льду.

Суспензию клеток центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 минут при 4 °С, осадок ресуспандировали в стерильном буферном растворе, содержащем 100 мМ RbCl, 50 мМ MnCl₂, 30 мМ ацетата калия, 10 мМ CaCl₂, 15 % глицерина и инкубировали при 0 °С в течение 5 мин. Полученную суспензию клеток центрифугировали при 4500 об/мин в течение 5 мин. при 4 °С. Осадок клеток ресуспандировали в буферном растворе, содержащем 10 мМ MOPS (pH 6,5), 10 мМ RbCl, 75 мМ CaCl₂, 15 % глицерина. Суспензию клеток разделяли на аликвоты по 100 мкл в охлажденные стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и инкубировали 15–60 минут при 0 °С. Пробирки с суспензией компетентных клеток хранили при –70 °С.

В работе были использованы компетентные клетки *E. coli* следующих штаммов: NovaBlue, B834(De3), C41(De3), C43(De3).

5.7. Трансформация клеток *E. coli*

Непосредственно перед трансформацией пробирку с компетентными клетками *E. coli* размораживали при 0 °С. Далее в пробирку вносили 1–5 мкл плазмидной ДНК или лигазной смеси, инкубировали в течение 30 мин при 0 °С, затем 1,5 мин при 42 °С в твердотельном термостате, затем вновь при 0 °С в течение 5 мин. После этого стерильно вносили в пробирку 400 мкл питательной среды 2хТУ, инкубировали при 37 °С в течение 1 часа и высевали на чашки Петри с агаризованной средой 2хТУ, содержащей 100 мкг/мл ампициллина.

5.8. Выделение плазмидной ДНК

Наработку плазмидной ДНК осуществляли с использованием штамма *E. coli* NovaBlue. Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью набора реактивов QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Нидерланды) согласно рекомендациям производителя.

5.9. Выделение Lys394

Препаративную наработку биомассы клеток *E. coli* штаммов B834(De3), C41(De3), C43(De3) с Lys394 проводили при 37 °С в конических колбах объемом 2 л, содержащих 0,5 л среды 2xTY и 100 мкг/мл ампициллина. Культуру клеток выращивали при интенсивной аэрации до достижения оптической плотности суспензии при 600 нм $OD_{600} = 0,6-0,8$. После этого синтез Lys394 индуцировали, добавляя в культуральную среду IPTG. Выбор оптимального значения концентрации IPTG и времени синтеза Lys394 проводился экспериментально (раздел 6.3). Клетки осаждали центрифугированием 4000 об/мин на центрифуге Megafuge 2.0 (Heraeus Instruments, Германия) при 4 °С в течение 15 минут.

Клеточный осадок ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 20 mM трис-HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl (далее "стартовый буфер"). Объем раствора составлял 1:50 от исходного объема культуральной жидкости. Клетки разрушали обработкой ультразвуком (Techran UD-20, Польша) десятью импульсами по 20, чередующимися паузами 20 секунд. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием в течение 20 минут при 4 °С со скоростью 13400 об/мин (Eppendorf 5415D, Германия). Осадок, полученный на этой стадии, проверяли на отсутствие целевого белка с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Надосадочную жидкость наносили на хроматографическую колонку HisTrap HP объемом 5 мл (GE HealthCare, США), уравновешанную стартовым буфером. Элюцию целевого белка осуществляли с помощью ступенчатого градиента имидазола в том же буферном растворе. Фракции, обладающие литической активностью, объединяли и удаляли имидазол с помощью диализа против стартового буфера (мембрана Servapore MWCO 12-14 кДа).

Для удаления N-концевого гексагистидина в раствор фермента добавляли β-меркаптоэтанол до конечной концентрации 0,1 mM и 0,1 мг TEV-протеазы. Реакцию проводили при 4 °С на протяжении ночи. Далее реакцию разбавляли в 50 раз стартовым буферным раствором. Активный Lys394 отделяли от гексагистидинового фрагмента и TEV-протеазы, также несущей такой фрагмент на C-конце, пропуская смесь через хроматографическую колонку HisTrap HP объемом 1 мл (GE HealthCare, США). При этом целевой белок Lys394 не связывается с

носителем. Фракцию с материалом, несвязавшимся с носителем внутри колонки, концентрировали с помощью Centricon10 (Millipore, США). Раствор Lys394 разделяли на аликвоты по 0,5 мл и хранили при 4 °С.

Оценку чистоты полученного препарата определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, который осуществляли на установке Hoefer SE245 (США) [206].

5.10. Приготовление субстрата для определения активности Lys394

3 мл ночной культуры *E. coli* CR63 переносили в 100 мл среды 2xTY и инкубировали при 37 °С и умеренной аэрации до $OD_{600} = 0,6$. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин (Jouan BR4i, Франция), ресуспендировали в 40 мл 20 мМ трис–HCl pH 8,0, насыщенного хлороформом при комнатной температуре, и инкубировали в шейкере при 37 °С и умеренной аэрации в течение 30 минут. После этого клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин, два раза промывали буфером, содержащим 20 мМ трис–HCl pH 8,0 и разбавляли тем же буферным раствором до достижения оптической плотности $OD_{600} = 6$. Получившуюся суспензию клеток разделяли на аликвоты по 200 мкл и хранили при –70 °С в течение месяца. Для дальнейших измерений суспензию клеток размораживали на ледяной бане непосредственно перед использованием.

5.11. Измерение активности Lys394

Активность Lys394 определяли по скорости просветления суспензии клеток *E. coli*. Для этого в акриловую кювету вносили 900 мкл раствора 20 мМ трис–HCl (pH 8,5), 100 мкл концентрированной суспензии интактных или предобработанных хлороформом клеток *E. coli* штамма CR63 (до значения $OD_{600} = 0,6$) и регистрировали скорость фонового лизиса клеток. Затем к суспензии добавляли аликвоту раствора фермента (не более 20 мкл) и регистрировали скорость ферментативного лизиса, из которого впоследствии вычитали скорость фонового лизиса. Измерения проводили на спектрофотометре Ultrospec 2100-pro (GE Healthcare, США) с термостатируемым кюветным отделением при 37°С. Активность фермента рассчитывали по тангенсу угла наклона линейного участка зависимости оптической плотности от времени и выражали в единицах оптической плотности в минуту. Начало и конец линейного участка зависимости оптической плотности от времени выбирали таким образом, чтобы аппроксимирующая прямая обладала максимальным коэффициентом детерминации (R^2);

вычисление значения ферментативной активности проводились программно [207]. Все измерения проводились минимум в трех повторностях, которые впоследствии усреднялись.

5.12. Изучение влияния pH и концентрации NaCl на активность Lys394

Для определения pH-оптимума активности Lys394 готовили серию буферных растворов, содержащих 20 мМ трис-HCl, 20 мМ лимонной кислоты, 20 мМ дигидрофосфата натрия со значениями pH от 5,5 до 9,0 с шагом 0,5. Для каждого значения pH измерение проводилось следующим образом. В кювету вносили 900 мкл буферного раствора, 100 мкл суспензии клеток *E. coli*, обработанных хлороформом, регистрировали скорость фонового лизиса клеток, затем вносили 5 мкл 0,1 мг/мл раствора Lys394 и регистрировали скорость ферментативного лизиса.

Эффект NaCl на активность фермента определяли аналогичным образом за одним отличием: вместо трис-цитрат-фосфатного раствора использовали буферный раствор, содержащий 20 мМ трис-HCl (pH 8,5) и 0–400 мМ NaCl.

5.13. Изучение ингибирования активности Lys394 под действием ЭДТА и последующего восстановления активности солями металлов.

Для оценки влияния ЭДТА на ферментативную активность Lys394 реакционную смесь готовили стандартным образом (описано в 5.11). В кювету вносили 5 мкл раствора 0,1 мг/мл Lys394 и регистрировали изменение оптической плотности во времени. Затем вносили 5 мкл ЭДТА концентрации 20 мМ, по стабильности показания оптической плотности убеждались в отсутствии каталитического расщепления пептидогликана. Затем вносили 5 мкл 50 мМ водного раствора одной из следующих солей: CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂ и регистрировали скорость просветления суспензии клеток. Значение скорости реакции выражали в процентах от скорости реакции без добавления ЭДТА и солей металлов.

Чтобы исключить специфическое влияние солей металлов на Lys394, мы исследовали влияние хлоридов цинка, кальция, магния, марганца, кобальт, медь, никель, железа (Fe²⁺ и Fe³⁺) и хрома. Для типичного измерения в кювету вносили 900 мкл раствора 20 мМ трис-HCl (pH 8,5), 100 мкл суспензии клеток, обработанных хлороформом до конечной оптической плотности OD₆₀₀ = 0,6 и 5 мкл водного раствора хлорида одного из вышеперечисленных металлов (20, 50 и 100 мМ) далее процедура была аналогична измерению активности фермента, описанной в разделе 5.11.

5.14. Определение молекулярной массы активного фермента

Молекулярную массу активного Lys394 определяли с помощью гель-проникающей хроматографии на колонке длиной 65 см диаметром 1,5 см с носителем Toyopearl HW50F (Tosoh, Япония), уравновешенным раствором, содержащим 20 мМ трис-HCl pH 8,0 150 мМ NaCl. Элюцию проводили тем же раствором со скоростью 0,5 мл/мин. Колонку калибровали с помощью белковых маркеров молекулярной массы (Sigma, США): бычий сывороточный альбумин (67 кДа), овальбумин (45 кДа), химотрипсиноген А (24 кДа), миоглобин (18 кДа), цитохром С (13 кДа). Для определения мертвого объема колонки использовали голубой декстран (2000 кДа). Для построения калибровочной кривой строили график зависимости десятичного логарифма молекулярной массы от объема элюции каждого маркера. Для определения массы Lys394 на колонку наносили 2 мл раствора фермента в концентрации 1,5 мг/мл.

5.15. Изучение спектра микроорганизмов, чувствительных к действию Lys394.

Бактерии видов *E. coli*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia stuartii*, *Pantoea ananatis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella sonnei*, *Acinetobacter baumannii* предобрабатывали хлороформом согласно методике, описанной в разделе 5.10. Бактерии грамположительных видов: *Bacillus subtilis* и *S. aureus* использовали для эксперимента без предобработки. *Micrococcus luteus* использовали в виде препарата высушенных клеточных стенок (Sigma, США). Измерение скорости ферментативного лизиса проводили по протоколу, указанному в разделе 5.11, при концентрации Lys394 0,5 мкг/мл.

Данный эксперимент проводился на базе НЦЭСМП (ГИСК им. Л.А Тарасевича) совместно с З.В. Дурмановой, сотрудником лаборатории препаратов бактериофагов.

5.16. Определение увеличения проницаемости внешней мембраны *E. coli*

Изменение проницаемости внешней мембраны *E. coli* под действием различных веществ определялось по переходу β -лактамазы, в норме находящейся в периплазме, наружу. Приготовление клеток *E. coli* для анализа проводилось следующим образом. 1 мл ночной культуры клеток *E. coli* штамма CR63 переносили в 100 мл среды 2xTY и культивировали при 37 °С при умеренной аэрации до оптической плотности $OD_{600} = 0,6$. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 минут (Jouan BR4i, Франция), затем ресуспендировали в 20 мМ растворе трис-HCl (pH 8,0) объемом 30 мл. Цикл осаждения-

ресуспендирования повторяли еще дважды, чтобы удалить остатки питательной среды. В заключение оптическую плотность суспензии клеток доводили до $OD_{600} = 0,6$.

Для каждого измерения в микрцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносили 1 мл суспензии *E. coli* и 10 мкл одного из следующих растворов: 0,2 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл и 4 мг/мл в случае PGLa, магаинина или протамина (Sigma); 0,25 мг/мл, 1 мг/мл, 2,5 мг/мл и 5 мг/мл в случае поли-L-лизинов или поли-L-аргининов (Sigma); 1,5 мг/мл, 2,5 мг/мл и 5 мг/мл в случае блок-сополимеров $Lys_{10}EG_{114}$ и $Lys_{30}EG_{114}$ (Alamanda Polymers, США). В этом и последующих экспериментах были использованы поли-L-лизины фракций 1–4 кДа и 30–70 кДа и поли-L-аргинины фракций 5–15 кДа, 15–70 кДа и > 70 кДа. Смесь инкубировали 10 минут при комнатной температуре, после чего отделяли клетки центрифугированием при 13400 об/мин в течение 1 минуты (Eppendorf 5415D, Германия). Надосадочную жидкость переносили в акриловую кювету объемом 1 мл с 12 мкл раствора CENTA 1 мг/мл (EMD Millipore Chemicals, США) и регистрировали скорость увеличения оптической плотности при 405 нм. Значение лактамазной активности вычислялось по тангенсу угла наклона линейного участка зависимости оптической плотности от времени. Долю β -лактамазы, перешедшей из периплазмы в межклеточное пространство, вычисляли как отношение лактамазной активности тестируемого образца и лактамазной активности в препарате, полученным полным разрушением клеток с помощью ультразвука.

5.17. Изучение лизиса клеток *E. coli* под действием эндолизина бактериофага SPZ7 в присутствии колистина.

В кювету объемом 0,5 мл вносили 480 мкл раствора 20 мМ трис-HCl, 7 мкл суспензии клеток *E. coli* штамма TG1 (до достижения оптической плотности 0,65 при 650 нм) и 2,5 мкл 5 мг/мл раствора колистина. После регистрации значения фонового лизиса вносили 4 мкл 0,3 мг/мл раствора эндолизина бактериофага SPZ7 и регистрировали скорость ферментативного лизиса, как указано в разделе 5.11.

5.18. Лизис интактных клеток *E. coli* при совместном действии агентов, нарушающих целостность внешней мембраны *E. coli*.

Способность веществ, разупорядочивающих внешнюю мембрану, индуцировать ферментативный лизис клеток *E. coli* под действием Lys394, тестировалась в двух режимах: лизис планктонных клеток (суспензия клеток в водном растворе) и лизис газонных клеток

(выращенных на поверхности агаризованной среды 2xTY). Культуру планктонных клеток готовили по протоколу, описанному в разделе 5.16.

В случае планктонных клеток протокол состоял из следующих стадий. В акриловую кювету объемом 1 мл вносили 1 мл суспензии *E. coli* и 10 мкл раствора тестируемого вещества. Для эксперимента отбирали вещества, показавшие наилучший результат в тесте на увеличение проницаемости внешней мембраны, в тех же самых концентрациях (5.16). Если добавление раствора тестируемого вещества вызывало уменьшение оптической плотности суспензии клеток, то соответствующее значение скорости просветления вычиталось из итогового значения активности. Далее в кювету вносили 5 мкл 0,05 мг/мл раствора Lys394 и детектировали скорость просветления суспензии клеток.

Газонные клетки для лизиса готовили следующим образом. 100 мкл ночной культуры клеток *E. coli* распределяли равномерно по поверхности агаризованной среды 2xTY в чашке Петри диаметром 90 мм. Затем чашку Петри инкубировали 30 минут при 37 °С. Плотность получившегося газона клеток была оценена экспериментально смывом с последующим разведением и высевом и составляла в среднем 5×10^6 КОЕ/см².

Для приготовления тестируемых образцов были использованы следующие растворы: (1) 400 мМ трис-HCl pH 8,5; (2) Lys394 (5 и 2 мг/мл); (3) PGLa (0,2 и 0,5 мг/мл) или 5–15 кДа поли-L-аргинин (0,25 мг/мл); (4) ЭДТА (5 и 10 мМ). Тестируемые образцы покрывали все сочетания эффекторов и были приготовлены следующим образом: (1) отрицательный контроль, 1 мкл раствора 1 и 9 мкл H₂O; (2) 1 мкл раствора 1, 7 мкл of H₂O, 2 мкл раствора 3; (3) 1 мкл раствора 1, 6 мкл H₂O, 2 мкл раствора 3, 1 мкл раствора 4; (4) 1 мкл раствора 1, 4 мкл H₂O, 5 мкл раствора 2; (5) 1 мкл раствора 1, 2 мкл H₂O, 2 мкл раствора 3 и 5 мкл раствора 2; (6) 1 мкл раствора 1, 3 мкл H₂O, 1 мкл раствора 4 and 5 мкл раствора 2; (7) 1 мкл раствора 1, 8 мкл H₂O, 1 мкл раствора 4; (8) 1 мкл раствора 1, 1 мкл H₂O, 2 мкл раствора 3, 1 мкл раствора 4 и 5 мкл раствора 2. 10 мкл каждого из образцов наносили на поверхность газона клеток и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Из центра каждого пятна лизиса отбирали пробу клеток, касаясь кончиком стерильного наконечника для дозатора на 10 мкл. Бактерии с наконечника ресуспендировали в 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора, готовили серию разведений, высевали на чашки с агаризованной средой 2xTY, которые инкубировали в течение ночи при 37 °С. Литическую активность каждого из образцов представляли в виде $\log_{10}(N_0/N_i)$, где N_0 – это число КОЕ в отрицательном контроле, N_i – число КОЕ в тестируемом образце. Каждое измерение проводили минимум трижды.

5.19. Изучение термоинактивации Lys394

Изучение термоинактивации фермента концентрации 0,1 – 3 мг/мл проводили в диапазоне температур от 20 до 50 °С в составе буферного раствора, содержащего 20 мМ трис-НСl и 50–500 мМ NaCl.

Для каждого эксперимента раствор фермента стерилизовали с помощью фильтрующей шприцевой насадки Millex с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США) и помещали по 50 мкл раствора в 15 стерильных микроцентрифужных пробирок объемом 0,5 мл. Пробирки помещали в суховоздушный или твердотельный термостат, прогретый до нужной температуры. В определенный момент времени одну пробирку доставали, измеряли ферментативную активность, как описано в разделе 5.11, охлаждали до 0 °С во льду и измеряли активность ещё раз. Термоинактивацию Lys394 проводили до достижения ферментативной активности не более 10% от начального значения. Интервалы между отборами проб подбирали таким образом, чтобы от начала до конца процесса термоинактивации было проведено 10 измерений.

Константы скорости термоинактивации Lys394 вычисляли по тангенсу угла наклона зависимости натурального логарифма остаточной активности от времени методом линейной регрессии. Время полуинактивации вычисляли по формуле $\tau_{1/2} = \ln(2)/k_{in}$, где k_{in} – константа инативации фермента.

5.20. Изучение влияния добавок на активность и стабильность Lys394

Методика оценки влияния катионов металлов на активность Lys394 описана в разделе 5.13. Среди низкомолекулярных веществ были также использованы полиолы: глюкоза, фруктоза, сахароза, трегалоза, глицерин в диапазоне концентраций 1 – 50 % по массе. Для изучения влияния полиолов на активность использовали стандартную методику измерения активности за одним исключением: буферный раствор, используемый для приготовления реакционной смеси имел в составе 1–50 % одного из полиолов, указанных выше.

Для изучения влияния добавок на стабильность, готовили раствор, содержащий 0,5 мг/мл Lys394, одну или несколько добавок (хлориды металлов в диапазоне концентраций 0,1 до 5 мМ, полиолы 1–50%, поли-L-лизин 1–4 кДа или поли-L-аргинин 5–15 кДа в диапазоне концентраций 5 – 80 мкг/мл), 20 мМ трис-НСl (рН 8,0) и 150 мМ NaCl. Инкубацию растворов проводили при 20 и 37 °С по протоколу, описанному в разделе 5.19.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

6. Выделение и очистка рекомбинантного эндолизина бактериофага S-394.

6.1. Анализ последовательности аминокислот пептидогликангидролазы бактериофага S-394

Бактериофаг S-394 был выделен Пугачевым В.Г. и коллегами (ГНЦ ВБ «Вектор», г. Кольцово) из промышленных сточных вод. Изначально культура бактериофага была получена с использованием *Salmonella enterica serovar typhimurium* в качестве бактерии-хозяина, поэтому согласно современной номенклатуре бактериофаг S-394 носит название vB_SenS_394 [208]. Впоследствии было показано, что бактериофаг S-394 обладает поливалентной литической активностью по отношению к широкому спектру хозяев семейства *Enterobacteriaceae*, включая бактерии родов *Escherichia*, *Salmonella* и *Shigella*; по морфологическим признакам и рестрикционному анализу ДНК бактериофаг относится к роду *Caudovirales* семейства *Siphoviridae* и является T5-подобным фагом [209].

При частичном секвенировании генома бактериофага был выявлен ген длиной 414 п.о., кодирующий фермент длиной 137 а.о., обладающий литической активностью по отношению к бактериальному пептидогликану. Обнаруженный фермент получил название Lys394, его аминокислотная последовательность, указанная на рисунке 20, депонирована в базу данных NCBI GenBank под идентификатором KC295451.1 наряду с последовательностью соответствующего гена.

Доменная организация фермента Lys394 была теоретически предсказана с помощью поиска в базе консервативных доменов Pfam (<http://www.pfam.xfam.org/>). Было показано, что молекула Lys394 содержит единственный каталитический домен Peptidase_M15_4. По данным базы Pfam такой домен встречается в пептидазах семейства M15. Ферменты, содержащие этот домен, относятся как к *D-Ala-D-Ala*-карбоксипептидазам, так и к *L-Ala-D-Glu*-эндопептидазам. Несмотря на различные типы катализируемых реакций, соответствующие каталитические домены обладают высокой степенью гомологии и осуществляют катализ с помощью координированного атома металла. В молекуле Lys394 домен Peptidase_M15_4 занимает участок с 62 по 121 а.о.

Отсутствие домена связывания с субстратом – типичное явление для пептидогликангидролаз, специфичных к грамотрицательным бактериям. Наличие домена связывания с субстратом за редким исключением (эндолизина бактериофагов EL188 и KZ)

характерно для пептидогликангидролаз, специфичных к грамположительным микроорганизмам, которые, как правило, имеют существенно более высокую молекулярную массу и более сложную пространственную организацию белковой глобулы.

S-394	---MSFKFGK	NSEKQLATVK	PELQKVARRA	LELSPYDFTI	37
EPS7	-----	-----	-----	-----	
T5	---MSFKFGK	NSEKQLATVK	PELQKVARRA	LELSPYDFTI	37
SPC35	---MSFKFSQ	RSLDRLKGVH	PDLVRVTHRA	LELSPYDFTI	37
RB43	----MFKLAK	KSINNLKGVK	PELVKVVQRA	LELSPEDFGV	36
ST64T	MQTNKFKFSQ	RSEKNLNGVN	PDLVKVIRRA	LEITPVDFIV	40
H. influenza	--MSKFKLSA	ASEEKLVGVH	ADLVKVVHRA	IELSVVDFKV	38
S-394	VQGIRTVAQS	AQNIANGTSF	LKDPSKSKHV	TGDAIDFAPY	77
EPS7	-----	-----	MKDPSKSKHV	TGDAIDFAPY	20
T5	VQGIRTVAQS	AQNIANGTSF	LKDPSKSKHI	TGDAIDFAPY	77
SPC35	TEGLRSLEQS	AKNIANGTSF	LKDPSKSKHV	QGRAVDFAPL	77
RB43	REGLRTVEQQ	REYVRTGA--	-SQTMNSKHI	TGDAVDLYPS	73
ST64T	IEGVRTQARQ	KDMVATGK--	-SQTMNSRHL	SGNAVDIIP-	76
H. influenza	IEGKRTLERQ	KELFAKKA--	-TKTMNSRHL	TGHAVDLVP-	74
S-394	INGKIDWK-D	LEAFWAVKKA	FEQAGKELGI	KLRFGADWNS	116
EPS7	INGKIDWK-D	LEAFWAVKKA	FEQAGKELGV	KLRFGADWNS	59
T5	INGKIDWN-D	LEAFWAVKKA	FEQAGKELGI	KLRFGADWNA	116
SPC35	KDGKIDWN-D	LESFKLVADA	FFKAAEELGV	KIRWGGDWNQ	116
RB43	-KLPEGWQKN	PKVWLPVINA	MKKAGDELGV	KLRFGINWKN	112
ST64T	--VNTTWK--	IIEEFKPLLKA	VKQAADEQGM	KLRFGINWKH	112
H. influenza	--LPVWNW-D	REPFKNVASA	MFQAAKQLGV	AIRWGGDWNM	111
S-394	SGDYHDEIDR	GTYDGGHVEL	V-----	137	
EPS7	SGDYHDEIDR	GTYDGGHVEL	V-----	80	
T5	SGDYHDEIKR	GTYDGGHVEL	V-----	137	
SPC35	NGSYKDEIQR	GTFDGPHEIL	V-----	137	
RB43	--DPNLPIET	KFIDAPHIEL	A-----	131	
ST64T	--DPSLPIET	KFIDAPHVEI	PA----	132	
H. influenza	--NESS-NDE	RFYDGPHEFEL	LRSVYP	134	

Рисунок 20. Множественное выравнивание последовательностей аминокислот эндолизинов бактериофагов S-394, EPS7, T5, SPC35, RB43, ST64T и пептидазы бактерии Haemophilus influenza. Выравнивание осуществлено с помощью программы CLUSTALW2. Аминокислоты, совпадающие во всех последовательностях, отмечены серым. Консервативные аминокислоты, участвующие в связывании иона металла показаны черным.

Анализ последовательности аминокислот выявленного белка с помощью BLAST по базе протеаз MEROPS показал, что Lys394 относится к семейству металлозависимых пептидаз M15C,

представители которого гидролизуют пептидную связь между остатками *L*-аланина и *D*-глутаминовой кислоты (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=m15c>). Типичными представителями пептидаз семейства M15C являются пептидогликангидролазы бактериофагов A118, A500, A511, A2, T5, а также бактериальные пептидазы, например, фермент *uscD* из *Bacillus subtilis*.

Поиск гомологичных последовательностей с помощью PSI-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&RUN_PSIBLAST=on) выявил большое число белков, схожих с эндолизином Lys394 по аминокислотному составу. Наиболее близкими оказались *L*-аланил-*D*-глутамат пептидаза бактериофага T5 (E-value 4×10^{-93} , степень гомологии 97%) [210], лизоцим бактериофага EPS7 (E-value 2×10^{-50} , степень гомологии 98%) [211], лизоцим бактериофага bV_EcoS_AKFV33 (E-value 1×10^{-92} , степень гомологии 96%) [212], лизоцим бактериофага phiR201 (E-value 6×10^{-84} , степень гомологии 86%), лизоцим бактериофага SPC35 (E-value 6×10^{-57} , степень гомологии 64%) [213]. Белки с меньшей степенью гомологии (< 45 %) относятся к бактериальным и фаговым пептидазам либо к ферментам, активность которых неохарактеризована. Присутствие ферментов бактериального происхождения среди гомологов Lys394 вероятно указывает на наличие профагов в геномах соответствующих микроорганизмов.

Примечательно, что ближайшими гомологами Lys394 оказались пептидогликангидролазы бактериофагов, специфичных к грамотрицательным микроорганизмам. Однако среди более отдаленных гомологов (степень идентичности последовательности 25 % и менее) обнаруживаются принадлежащие к семейству M15C пептидогликангидролазы Ply118 и Ply500 бактериофагов A118 и A500, инфицирующих грамположительные бактерии рода *Listeria* [214]. Известна также бактериальная *L*-аланил-*D*-глутамат пептидаза семейства M15C, выделенная из грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* [215], тип активности которой был доказан экспериментально. Грамположительные бактерии родов *Bacillus* и *Listeria* эволюционно далеко отстоят от энтеробактерий, однако структуры пептидогликана у них устроены схожим образом и относятся к одному и тому же хемотипу A1 γ , что по всей видимости и является причиной сходства отдельных участков аминокислотной последовательности Lys394 с одной стороны и Ply118/Ply500 с другой.

На рисунке 20 показано множественно выравненные последовательности белков разной степени гомологии, обнаруженных с помощью PSI-BLAST. Среди остатков, консервативных для всех приведенных последовательностей, можно выделить четыре остатка (His66, Asp73, Asp130

и His133; на рисунке отмечены черным цветом), которые отвечают за связывание иона металла в активном центре [35] и типичны для всех металлопептидаз семейства M15.

Наиболее близкий из приведенных гомологов – лизоцим бактериофага EPS7 – выделяется среди остальных ферментов отсутствием 57 аминокислот с *N*-конца последовательности (по сравнению с последовательностью Lys394). Отсутствие *N*-концевого фрагмента обусловлено однонуклеотидной вставкой в соответствующей позиции гена лизоцима фага EPS7, а высокая степень гомологии пептидогликангидролазы фага EPS7 и Lys394 рассчитана на основе фрагмента 58 – 114 а. о. (нумерация по Lys394). Роль *N*-концевого фрагмента остается неясной, так как пептидогликангидролаза бактериофага EPS7 не была выделена и охарактеризована экспериментально.

На текущий момент в литературе не содержится упоминаний об успешных попытках кристаллизации и получения данных рентгеноструктурного анализа для ближайших гомологов Lys394, что могло бы дать более детальную информацию о пространственной организации Lys394. Тем не менее анализ первичной последовательности фермента позволяет утверждать, что Lys394 относится к классу пептидаз и катализирует гидролиз одной из связей в пептидной части пептидогликана.

Теоретические расчеты физико-химических параметров белка были проведены с помощью утилиты ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Для последовательности аминокислот Lys394, указанной на рисунке 20 были определены следующие характеристики: значение *pI* 6,84, общее число положительно заряженных заместителей (остатки Lys и Arg) равно числу отрицательно заряженных заместителей и составляет 19; коэффициент экстинкции при 280 нм равен $22460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, это соответствует оптической плотности раствора Lys394 1,471 единиц при 280 нм, концентрации белка 1 мг/мл и длине оптического пути 1 см.

6.2. Создание генно-инженерных конструкций для получения рекомбинантного Lys394

Для изучения свойств Lys394 необходимо было получить плазмиду с геном фермента и высокоэффективный штамм-продуцент рекомбинантного фермента.

В качестве продуцента рекомбинантного Lys394 был выбран штамм *E. coli*, не смотря на то, что Lys394 обладает литической активностью по отношению к бактериям этого вида. Использование *E. coli* в качестве бактерии-продуцента для текущей задачи возможно благодаря тому, что активный фермент в процессе синтеза накапливается в цитоплазме и не имеет доступа к пептидогликану, отделенному от цитоплазмы непроницаемой для Lys394 липидной мембраной. Аналогичная ситуация реализуется также *in vivo* – активная пептидогликангидролаза в процессе репликации вирусных частиц накапливается в цитоплазме клетки, не вызывая лизиса, а гидролиз пептидогликана происходит только в момент включения системы, отвечающей за транспорт эндолизина в периплазматическое пространство сквозь внутреннюю липидную мембрану [216]. В литературе имеются многочисленные данные об успешном использовании *E. coli* для получения штаммов-продуцентов пептидогликангидролаз, специфичных к грамотрицательным бактериям, в частности к энтеробактериям. В качестве примеров можно привести методы, разработанные для синтеза эндолизинов фагов T5 и EL в штаммах *E. coli* BL21(De3) и BL21(De3)pLysS [210,217].

На стадии создания генноинженерной конструкции оставался нерешенным вопрос о стартовом кодоне рамки считывания, кодирующей фермент Lys394. Неопределенность стартового кодона связана с тем, что гены двух ближайших гомологов Lys394 – пептидогликангидролазы бактериофагов T5 и EPS7 – имеют разную длину. Полноразмерный вариант фермента, характерный для бактериофага T5, не реализуется в случае фага EPS7 по причине наличия однонуклеотидной вставки в геноме бактериофага EPS7 в гене эндолизина, которая вызывает появление стоп-кодона (Таблица 6). Основываясь на этих данных, было решено клонировать ген фермента Lys394 в двух вариантах: полноразмерный по типу эндолизина фага T5 и укороченный по типу эндолизина бактериофага EPS7. Эксперименты по созданию генноинженерной конструкции для синтеза Lys394 проводили совместно с М. М. Шнейдером – сотрудником лаборатории молекулярной биоинженерии ИБХ РАН.

Таблица 6. Сравнение отдельных фрагментов генов эндолизинов бактериофагов S-394, T5 и EPS7. Звездочкой отмечена позиция вставки в гене eps7. Жирным выделены стоп-кодон в гене eps7, возникающий из-за сдвига рамки считывания и положение стартового кодона гена eps7. Серым цветом выделены нуклеотиды, отличающиеся в приведенных генах. Отсчет нуклеотидов начинается со стартового кодона гена эндолизина бактериофага T5.

Ген	Последовательность нуклеотидов			
	1	*	стоп	60
eps7	atgagttttaatttaggtaaaaataag	acgaaaaacaattagcaactgt	taag	ccccgagct
lys394	atgagttttaaatttggtaaaaatag	cgaaaaacaattagcaactgt	taag	ccccgagct
t5	atgagttttaaatttggtaaaaatag	cgaaaaacaattagccaccg	ttaag	ccccgaact
	121		старт	180
eps7	tattcgtacagtagcacaaagtgcccaaaac	attgctaattggtacttcattt	TTG	aaaga
lys394	tattcgtacagtagcacaaagtgcccaaaat	attgctaattggtacttcattt	ctt	gaaaga
t5	tattcgtacagtagcacaaagtgccagaac	attgctaattggtacttcattt	ctt	aaaaga

На основе этих данных были сконструированы праймеры для клонирования гена Lys394 с помощью ПЦР:

Lys394-full-forw: 5'-ataggatccagttttaaatttggtaaaaata-3'

Lys394-trunc-forw: 5'-ataggatccagtaagaccctagcaaaagt-3'

Lys394-rev: 5'-ataaagccttagactaattctacgtgaccac-3'

В названиях праймеров "forw" означает прямой праймер, "rev" – обратный праймер, "full" – праймер для клонирования полноразмерного варианта гена, "trunc" – праймер для клонирования укороченного варианта гена. Подчеркиванием выделены сайты рестрикции, использованные для клонирования, – BamHI и HindIII соответственно.

Оптимизацию условий ПЦР проводили, варьируя температуру отжига праймеров и количество ДНК-матрицы. В качестве ДНК-матрицы использовали очищенный препарат бактериофага S-39. Максимальный выход целевых ДНК-фрагментов при отсутствии побочных продуктов реакции наблюдался при температурах отжига 49 °C в случае пары праймеров Lys394-full-forw и Lys394-rev и 53 °C в случае пары праймеров Lys394-trunc-forw и Lys394-rev, оптимальная концентрация фаговых частиц в реакционной смеси составила 1000 БОЕ/мл. Электрофорез в агарозном геле показал, что в результате ПЦР были получены фрагменты ДНК длиной около 400 и 240 п.о., что соответствует размерам полноразмерного и укороченного вариантов генов белка-предшественника (Рисунок 21).

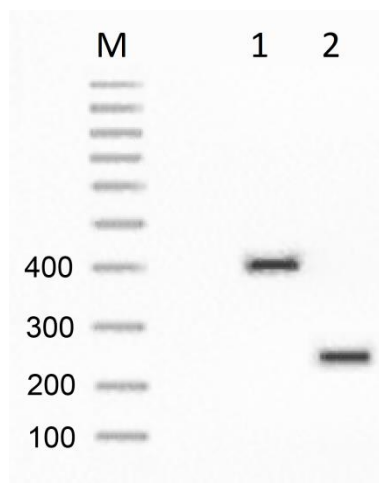


Рисунок 21. ДНК-электрофорез продуктов ПЦР при оптимальных условиях проведения реакции. М – маркеры молекулярной массы, 1 – "полноразмерный" амплификат, 2 – "укороченный" амплификат.

Полученные ПЦР-продукты были обработаны рестриктазами BamHI и HindIII для получения липких концов и клонированы в экспрессионный вектор pEE3, обработанный тем же рестриктазами. После лигирования вектора с каждым из ДНК фрагментов, полученными плазмидами трансформировали компетентные клетки *E. coli* NovaBlue. По 5 колоний трансформантов каждого типа случайным образом были отобраны и использованы для выделения плазмидной ДНК. Наличие вставки гена в плазмиде каждого из отобранных клонов было проверено секвенированием, которое показало идентичность соответствующих конструкций с укороченным или полноразмерным вариантом гена Lys394 с учетом наличия дополнительных нуклеотидов, предусмотренных строением вектора pEE3. Нуклеотидная последовательность полноразмерного гена Lys394, полученная с помощью секвенирования экспрессионной плазмиды, представлена на рисунке 22.

6.3. Получение рекомбинантного Lys394 в клетках *E. coli*

6.3.1. Выбор штамма-продуцента

Для синтеза Lys394 были выбраны лизогенные λ De3 штаммы *E. coli*, содержащие ген T7-РНК-полимеразы в хромосомной ДНК. Такие штаммы позволяют синтезировать целевой белок, ген которого находится в плазмиде под управлением T7 промотора, используемого в выбранном нами pEE3 векторе, а экспрессия индуцируется добавлением ИПТГ.

	10	20	30	40	50	60	
						
1	<u>ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGGCAGAGAATCTGTATTTCCAGGGA</u>						60
	M G S S H H H H H S S G E N L Y F Q G						
	70	80	90	100	110	120	
						
61	<u>TCCAGTTTTAAATTTGGTAAAAATAGCGAAAAACAATTAGCAACTGTTAAGCCCCGAGCTA</u>						120
	S S F K F G K N S E K Q L A T V K P E L						
	130	140	150	160	170	180	
						
121	<u>CAAAAGGTAGCTCGTAGGGCTTTAGAACTATCCCCATACGATTTTACAATCGTACAAGGT</u>						180
	Q K V A R R A L E L S P Y D F T I V Q G						
	190	200	210	220	230	240	
						
181	<u>ATTCGTACAGTAGCACAAAGTGCCCAAAATATTGCTAATGGTACTTCATTCTTGAAAGAC</u>						240
	I R T V A Q S A Q N I A N G T S F L K D						
	250	260	270	280	290	300	
						
241	<u>CCTAGCAAAAGTAAGCATGTAAGTGGAGACGCTATAGATTTTGCACCATATATTAATGGT</u>						300
	P S K S K H V T G D A I D F A P Y I N G						
	310	320	330	340	350	360	
						
301	<u>AAGATTGATTGGAAGATCTGGAAGCATTTTGGGCTGTTAAGAAGGCTTTTGAACAAGCC</u>						360
	K I D W K D L E A F W A V K K A F E Q A						
	370	380	390	400	410	420	
						
361	<u>GGTAAGGAAGTGGTATCAAAGTTCGTTTTGGTGCCGACTGGAATAGTTCTGGTGATTAT</u>						420
	G K E L G I K L R F G A D W N S S G D Y						
	430	440	450	460	470	480	
						
421	<u>CATGATGAGATCGATCGTGGTACTTACGACGGTGGTCACGTAGAATTAGTCTAA</u>						474
	H D E I D R G T Y D G G H V E L V Stop						

Рисунок 22. Нуклеотидная и аминокислотные последовательности полноразмерного гена Lys394. Подчеркиванием отмечены гексагистидиновая последовательность (нуклеотиды с 13 по 30), сайт гидролиза TEV-протеазой (нуклеотиды с 40 по 60), участок, отсутствующий у укороченного варианта гена (по аналогии с пептидогликангидролазой фага EPS7).

Оптимальный штамм-продуцент мы выбирали среди штаммов B834(De3), C41(De3) и C43(De3), характеризующимися пониженным уровнем выработки протеаз. Штамм B834(De3) широко используется для рутинного синтеза белков в *E. coli* и является предшественником популярного экспрессионного штамма BL21(De3). Штаммы C41(De3) и C43(De3) созданы на основе BL21(De3) и позволяют синтезировать белки с повышенной токсичностью по отношению *E. coli* [218].

Предварительно экспрессию укороченной и полноразмерной версий Lys394 мы проводили в следующих условиях: температура 37 °С, богатая среда 2xTY, индукцию экспрессии осуществляли добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ при значении OD₆₀₀ культуры клеток продуцентов 0,6, время инкубации культуры клеток после добавления индуктора составляло 3 часа. В этих условиях синтез укороченного и полноразмерного вариантов Lys394 не наблюдался в штамме B834(De3); полноразмерный Lys394 синтезировался в штамме C41(De3) в количестве не более 40 мг растворимого фермента с литра культуральной среды, укороченный – не более 20 мг с литра культуры. В штамме C43(De3) удалось получить не более 5 мг фермента в обоих вариантах (Рисунок 23).

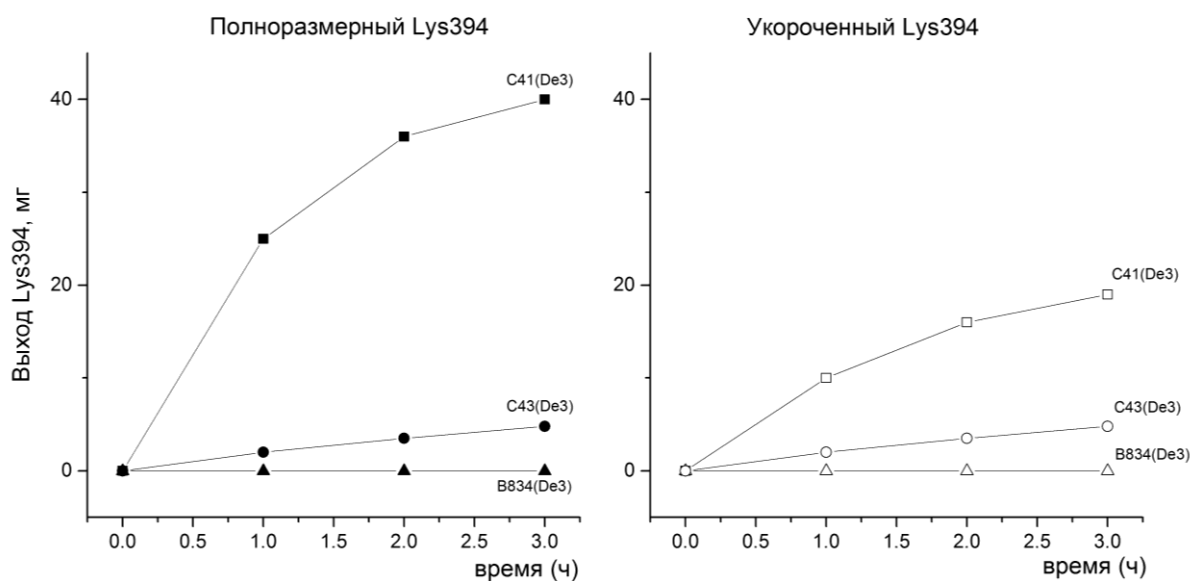


Рисунок 23. Выход полноразмерного (слева) и укороченного (справа) Lys394 в растворимом виде при их синтезе в *E. coli* штаммов C41(De3) (■), C43(De3) (●) и B834(De3) (▲). Синтез индуцировали добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ при достижении OD₆₀₀ бактериальной культуры значения 0,6. Синтез проводили при 37 °С в среде 2xTY.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что Lys394 обладает заметной токсичностью по отношению к клеткам *E. coli*, так как при прочих равных условиях синтез фермента наблюдается только в штаммах с повышенной устойчивостью к токсичным белкам: C41(De3) и C43(De3). Из графиков также видно, что для укороченного и полноразмерного Lys394 по истечении трех часов скорость синтеза заметно падает, поэтому проведение синтеза в течение более длительного времени выглядит нецелесообразным. В итоге, синтез Lys394 решено было проводить в штамме C41(De3) в течение 3х часов, так как в этих условиях наблюдается наилучший выход целевого белка при приемлемых временных затратах.

6.3.2. Подбор оптимальных значений температуры и концентрации индуктора.

На следующем этапе для оптимизации условий синтеза полноразмерного и укороченного вариантов Lys394 мы варьировали температуру и концентрацию индуктора. Для этого мы провели серию синтезов Lys394 в штамме-продуcente *E. coli* C41(De3) при концентрациях ИПТГ от 0,5 до 1 мМ и температурах от 20 до 37 °С. На рисунке 24 приведены диаграммы, полученные по итогам эксперимента. По осям диаграмм отложены температура и концентрация ИПТГ, а полученный выход Lys394 (в мг растворимого фермента с литра культуральной среды) показан в виде зон, границы которых были интерполированы с помощью программы Origin 2015.

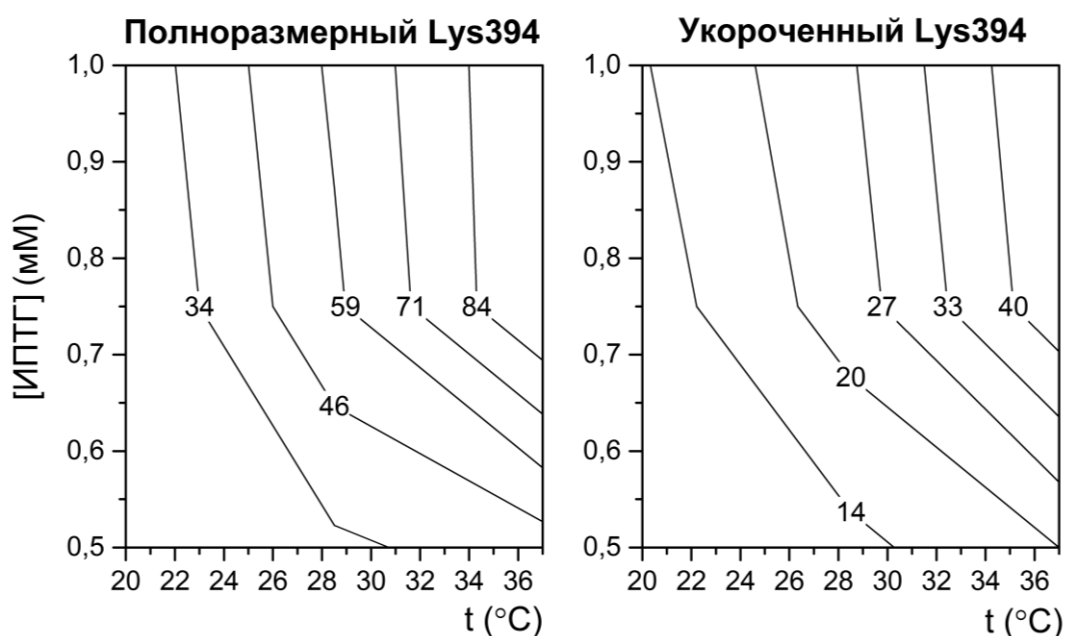


Рисунок 24. Выход полноразмерного и укороченного вариантов Lys394 в зависимости от температуры культивирования и концентрации ИПТГ. Условия синтеза: штамм *E. coli* C41(De3), питательная среда 2xTY, индукция экспрессии при плотности клеток $OD_{600} = 0,6$, продолжительность культивирования после добавления индуктора – 3 ч.

Как видно из рисунков выше, максимальный выход Lys394 (среди протестированных условий) достигается при концентрации ИПТГ выше 0,7 мМ и при температурах выше 34 – 35 °С. В дальнейшем синтез фермента проводился при 37 °С исключительно по причине удобства.

Таким образом, была разработана конструкция и подобраны условия синтеза растворимого Lys394 в полноразмерном и укороченном вариантах.

6.3.3. Очистка рекомбинантного Lys394

Очистку полноразмерного и укороченного вариантов Lys394 проводили по стандартной методике очистки рекомбинантных белков, имеющих гексагистидиновую последовательность. Вкратце, бактериальные клетки-продуценты разрушают ультразвуком, затем целевой белок отделяют от клеточного экстракта с помощью Ni^{2+} -аффинной хроматографии. Элюцию Lys394 осуществляли с помощью ступенчатого градиента имидазола.

Концентрацию имидазола, обеспечивающую наилучшее разделение целевого белка от белков, связывающихся с носителем неспецифично, подбирали экспериментально. Наилучшее разделение целевого белка и фракции белков, неспецифично связывающихся с носителем, достигалось при элюции носителя раствором 70 мМ имидазола. При этом неспецифично удерживающиеся белки удалялись из колонки, а Lys394 удерживался на носителе и элюировался впоследствии при промывки колонки буферным раствором, содержащим 200 мМ имидазола. На рисунке 25 представлены типичные хроматограмма и электрофореграммы, полученные по итогам очистки для полноразмерного и укороченного Lys394.

Используя описанный протокол очистки, удавалось получать гомогенные препараты полноразмерного и укороченного Lys394 по данным белкового электрофореза при окрашивании гелей с помощью кумасси.

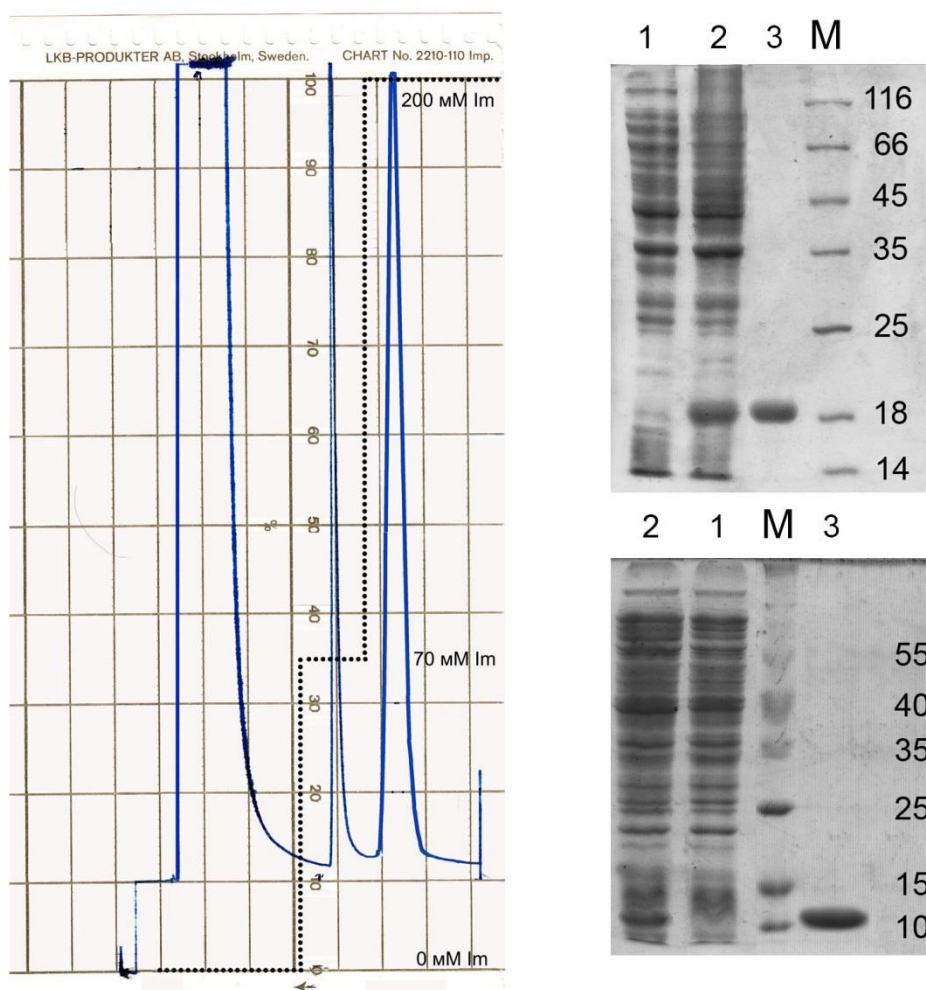


Рисунок 25. Слева: типичная Ni^{2+} -аффинная хроматограмма очистки рекомбинантного Lys394. Сплошная линия – значение OD_{280} ; пунктирная линия – ступенчатый градиент концентрации имидазола. Справа: электрофореграммы препаратов полноразмерного (сверху) и укороченного (снизу) Lys394. Дорожки: 1 – белковый профиль *E. coli* до добавления индуктора, 2 – то же спустя 3 часа после добавления индуктора, 3 – очищенная фракция Lys394, M – дорожка белковых маркеров, молекулярная масса полос маркеров показана в кДа.

7. Физико-химические свойства рекомбинантного Lys394

7.1. Ферментативная активность полноразмерного и укороченного Lys394

Деградация пептидогликана под действием эндолизинов бактериофагов вызывает лизис бактериальной клетки. Количественно скорость и/или глубину лизиса оценивают визуально или фотометрически по просветлению суспензии бактериальных клеток или по развитию зоны просветления в газоне клеток, выращенных на поверхности агаризованной питательной среды. Несмотря на использование универсального подхода для расчета активности пептидогликангидролаз в растворе, устоявшийся и общепринятый метод на данный момент не сложился. В различных источниках скорость просветления суспензии рассчитывают исходя из разных параметров кинетической кривой. Наряду с применением разных методов предварительной подготовки субстрата это негативно отражается на воспроизводимости и интерпретируемости результатов, опубликованных в литературе.

В данной работе расчет ферментативной активности производили по тангенсу угла наклона линейного участка зависимости оптической плотности от времени. Начало и конец линейного участка зависимости оптической плотности от времени определяется таким образом, чтобы максимизировать коэффициент детерминации (R^2) [207]. Преимущество этого метода заключается в наличии объективного статистического критерия, позволяющего достоверно определить начало и конец линейного участка зависимости оптической плотности от времени. В отличие от альтернативных методов такой подход позволяет адекватно рассчитывать как высокую, так и низкую скорость просветления суспензии, а также снизить погрешности, связанные с субъективным определением начала и конца линейного участка кривой, что положительно сказывается на воспроизводимости результатов. Авторами метода была разработана и опубликована в открытом доступе программа, позволяющая автоматизировать расчеты, что обеспечивает корректность применения алгоритма.

Зависимость ферментативной активности от концентрации фермента для полноразмерного Lys394 имеет вид кривой с насыщением (Рисунок 26 слева). Из графика видно, что скорость гидролиза пептидогликана является лимитирующим процессом лизиса клеток в суспензии при концентрациях фермента от 0 до 0,5 мг/мл в реакционной смеси, так как зависимость активности от концентрации линейна. При более высоких значениях концентрации фермента линейность нарушается, что вероятно указывает на смену лимитирующей стадии в пользу физического распада компонентов клетки.

В идентичных условиях укороченный вариант Lys394 не проявляет активности вовсе (Рисунок 26 справа), что указывает на необходимость первых 56 аминокислот для полноценного функционирования эндолизина фага S-394. Причина отсутствия этого участка у эндолизина бактериофага EPS7 остается невыясненной, так как этот фермента не был выделен и охарактеризован. Вероятно, при секвенировании или на стадии сборки генома бактериофага из отдельных фрагментов была допущена ошибка, так как EPS7 относится к литическим фагам, что предполагает синтез активной пептидогликангидролазы *in vivo* на конечной стадии жизненного цикла [211]. Исходя из этого, все последующие эксперименты проводились с использованием полноразмерного Lys394 со стартовым кодоном аналогичным L-аланил-D-глутамат пептидазе бактериофага T5 (Рисунок 20).

Отщепление гексагистидиновой последовательности под действием TEV-протеазы не приводит к изменению активности, поэтому здесь и далее все экспериментальные данные приведены для фермента с неотщепленным 6×His фрагментом.

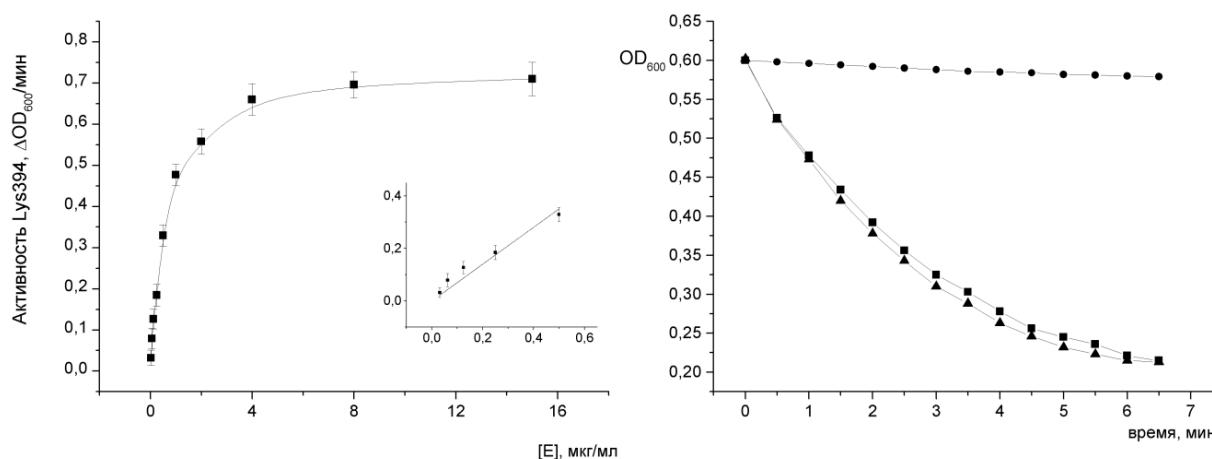


Рисунок 26. Слева: зависимость активности полноразмерного Lys394 от концентрации фермента в реакционной смеси. Начальное значение OD_{600} суспензии бактериальных клеток составляла 0,6 единиц. Каждое значение активности на графике соответствует среднему значению по итогам трех измерений \pm стандартное отклонение. Справа: лизис суспензии *E. coli* CR63, обработанных хлороформом, под действием 0,15 мкг/мл полноразмерного Lys394 (■), 2 мкг/мл лизоцима куриных яиц (▲) и 0,15 мкг/мл укороченного Lys394 (●). Реакцию проводили в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис/HCl (pH 8,5) при 25 °С.

Lys394 проявляет активность при щелочных значениях pH в области 7,5 – 9 единиц с максимумом при pH 8,5 (Рисунок 27). Это значение превышает pH оптимум для большинства охарактеризованных пептидогликангидролаз бактериофагов и соответствует таковому для

близкого гомолога Lys 394 – L-аланил-D-глутамат пептидазы бактериофага T5, а также для эндолизина бактериофага SPZ7, проявляющего схожую специфичность к патогенам, что и S-394.

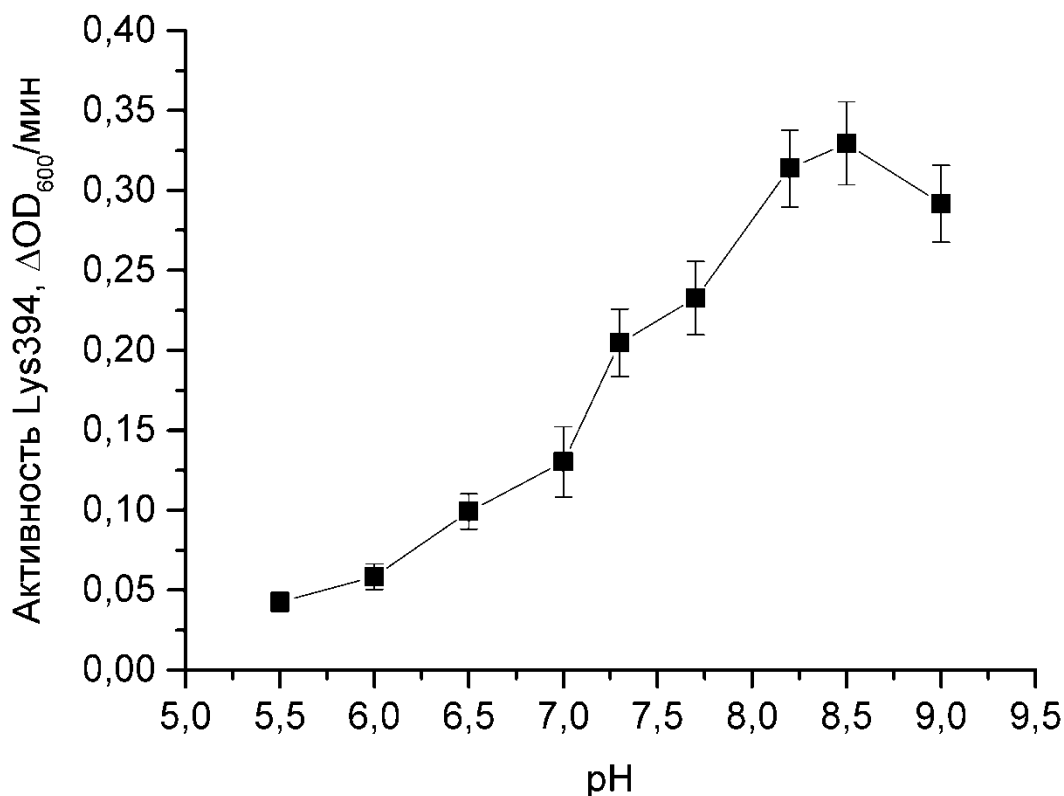


Рисунок 27. Влияние pH на активность Lys394. Реакция проводилась в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис/HCl, 20 мМ Na₂HPO₄ и 20 мМ цитрата натрия, при 25 °С. Концентрация Lys394 составляла 0,5 мкг/мл в реакционной смеси. Субстрат – *E. coli* CR63, предобработанные хлороформом.

На лизис клеток под действием исследуемого фермента заметное влияние оказывает значение ионной силы в реакционной смеси. Как видно из рисунка 28, с увеличением концентрации NaCl в растворе активность Lys394 падает – подобная тенденция характерна для многих эндолизинов бактериофагов. Этот эффект может быть объяснен как влиянием соли непосредственно на глобулу фермента, так и ухудшением последующей деградации бактериальных клеток под действием понижения осмотического давления, по скорости которой определяется активность фермента.

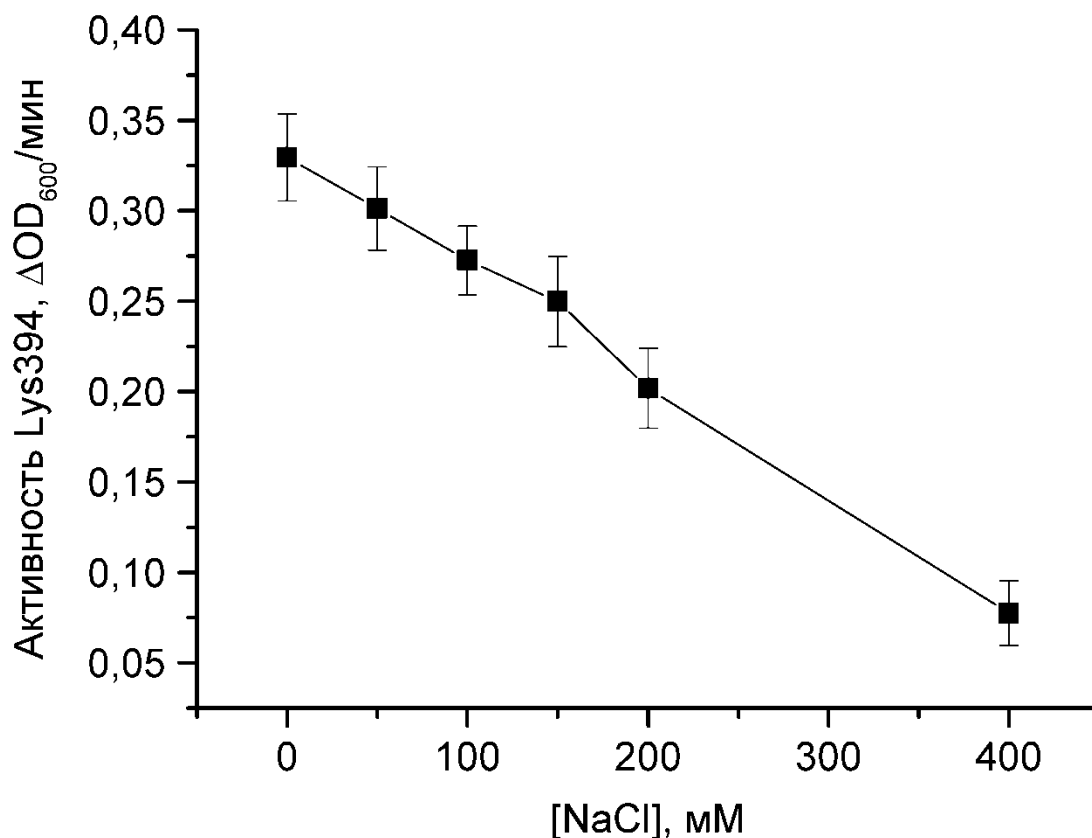


Рисунок 28. Зависимость ферментативной активности Lys394 от концентрации NaCl. Активность измеряли в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис/HCl (pH 8,5) при 25 °C. Концентрация Lys394 составляла 0,5 мкг/мл в реакционной смеси. Все величины являются средними трех измерений \pm стандартное отклонение.

Анализ аминокислотной последовательности Lys394 (Рисунок 20) показал, что Lys394 относится к группе металл-зависимых пептидаз. Наличие катиона металла также было доказано экспериментально по ингибированию ферментативной активности в присутствии ЭДТА (Рисунок 29).

Ближайший гомолог Lys394, для которого была определена пространственная структура белковой глобулы, – эндолизин бактериофага A500 – содержит катион цинка, что характерно для большинства пептидаз семейства M15. Тем не менее в семействе нередко встречаются пептидазы с другими катионами в активном центре, в том числе пептидазы в значительной степени гомологичные друг другу.

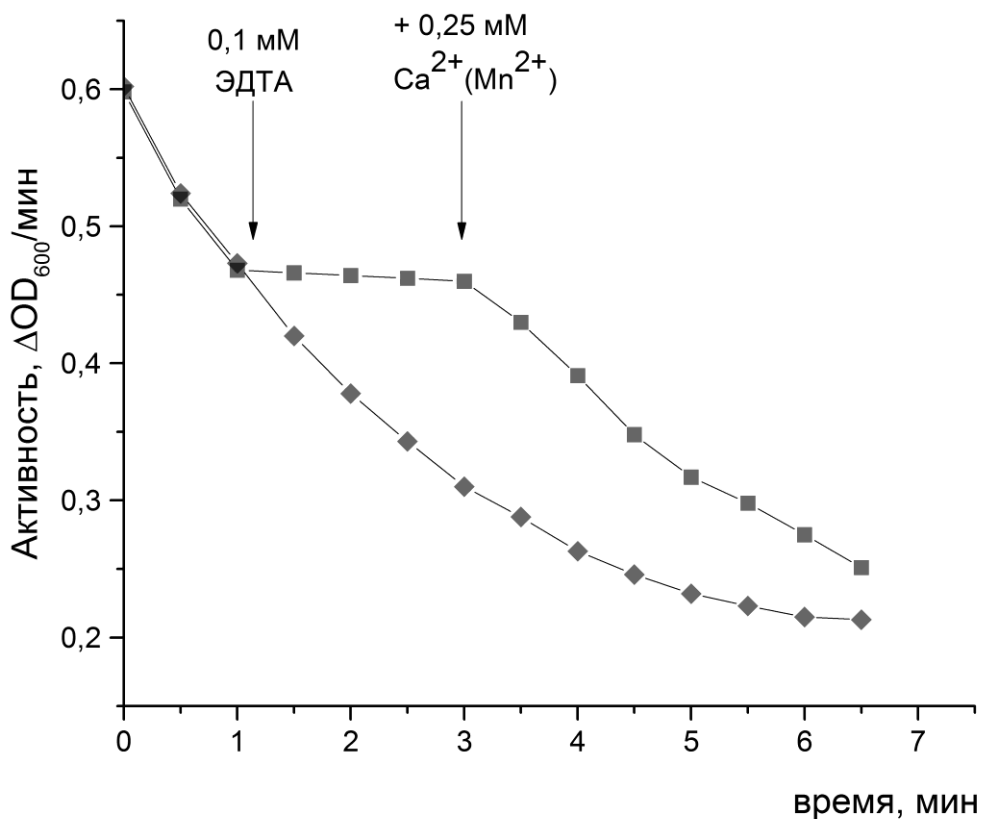


Рисунок 29. Ингибирование активности Lys394 под действием ЭДТА и ее последующее восстановление добавлением хлоридов Ca или Mn. Реакция проводилась в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис/HCl (pH 8,5), концентрация Lys394 0,5 мг/мл.

Однозначно определить катион металла, находящегося в активном центре Lys394, можно было бы с помощью дифракции рентгеновских лучей на кристалле белка. Однако на данный момент получить кристаллический осадок Lys394 не удалось (равно как и для ближайшего гомолога – L-аланил-D-глутамат пептидазы бактериофага T5). Поэтому определение возможного кандидата на роль катиона в активном центре Lys394 проводилось кинетическими методами. Для этого в реакционную смесь, содержащую фермент, субстрат и 0,1 мМ ЭДТА, вносили хлориды различных металлов до конечной концентрации 0,25 мМ и регистрировали скорость ферментативного лизиса клеток *E. coli*, обработанных хлороформом. Предварительно в качестве контроля была исследована зависимость активности Lys394 от концентрации ионов металлов в реакционной смеси (Рисунок 30).

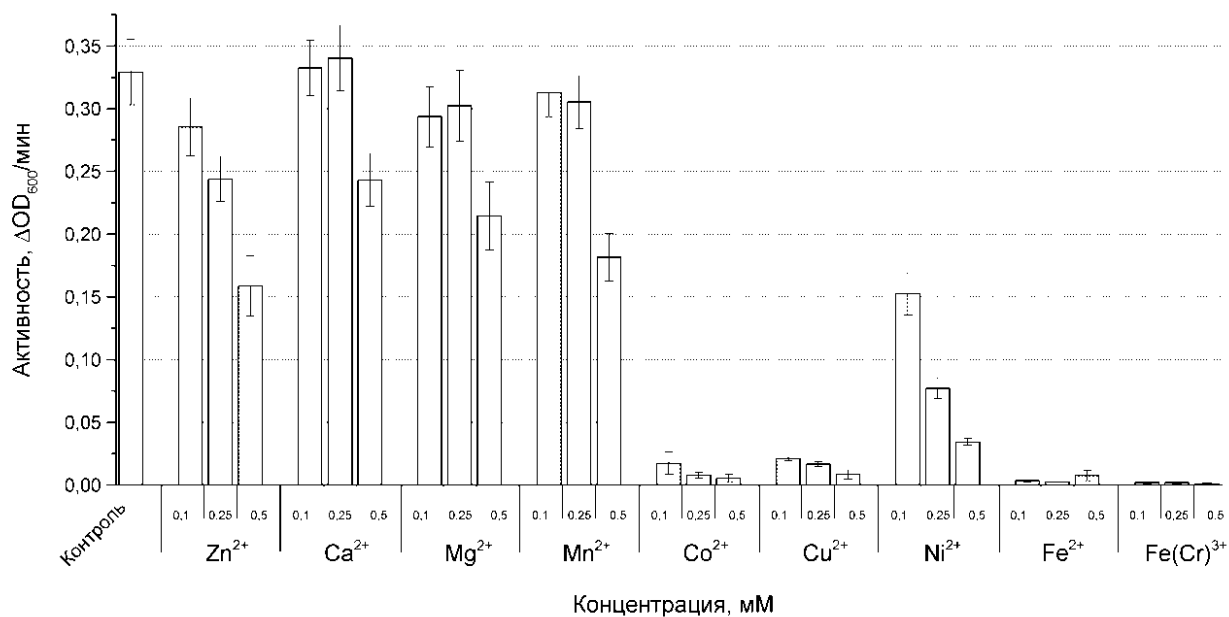


Рисунок 30. Влияние катионов металлов на активность Lys394. Контрольное значение (слева) соответствует скорости лизиса клеточной суспензии в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис/HCl (pH 8,5) при концентрации фермента 0,5 мкг/мл. Представленные величины соответствуют среднему значению 3х измерений \pm стандартное отклонение.

Из диаграммы видно, что наличие в реакционной смеси катионов некоторых двух- и трехвалентных катионов в разной степени ингибирует активность Lys394. В случае Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} и Cr^{3+} добавление соли к суспензии клеток вызывало повышение оптической плотности, что указывает на слипание клеток, по всей вероятности вызываемое изменением поверхностного заряда. Повышение концентрации хлоридов указанных металлов до 5 мМ приводит к быстрому осаждению клеток *E. coli* из суспензии. Изменение поверхностного заряда клеток *E. coli* может быть причиной ухудшения связывания фермента, что приводит к уменьшению наблюдаемой скорости лизиса вплоть до полной остановки. Полученные данные не в полной мере соответствуют результатам аналогичного эксперимента с эндолизином бактериофага T5, проведенного в работе [210]. Отличия могут быть обусловлены использованием авторами Тритона X-100 в качестве компонента реакционной среды, который определенно влияет на проницаемость внешней мембраны клеток *E. coli*, используемых в качестве субстрата.

Таким образом, для восстановления активности фермента, предварительно ингибированного ЭДТА были использованы соли Zn, Ca, Mg, Mn в концентрациях 0,1 – 0,5 мМ. Среди перечисленных солей полное восстановление ферментативной активности до начального значения наблюдалось в случае хлоридов кальция и марганца (Таблица 7). Добавление хлоридов магния и цинка также приводило к появлению ферментативной активности, однако в данном случае наблюдаемая скорость лизиса составляла не более 35% от начальной. Вероятно наблюдаемый эффект связан с тем, что Mg^{2+} и Zn^{2+} вытесняют часть катионов, ранее находившихся в активном центре фермента, из комплекса с ЭДТА. Высвобожденные катионы затем могут вновь встроиться в активный центр Lys394.

Таблица 7. Восстановление ферментативной активности Lys394 катионами металлов после ингибирования Lys394 с помощью 0,1 мМ ЭДТА. Реакцию проводили в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис-HCl (pH 8,5), 0,1 мМ ЭДТА и 0,5 мкг/мл Lys394. Реакцию инициировали добавлением хлорида соответствующего металла. Значения активности представлены в процентах от активности 0,5 мкг/мл Lys394 в отсутствие ЭДТА и являются средним не менее 3х измерений \pm стандартное отклонение.

	Концентрация катиона, мМ	Относительная активность, %
Контроль	0	100,2 \pm 0,2
Ca^{2+}	0,1	110,1 \pm 0,2
	0,25	107,7 \pm 9,9
	0,5	85,8 \pm 9,2
Mg^{2+}	0,1	27,1 \pm 4,1
	0,25	23,2 \pm 5,6
	0,5	12,7 \pm 4,4
Mn^{2+}	0,1	101,2 \pm 6,8
	0,25	99,3 \pm 8,4
	0,5	102,7 \pm 6,3
Zn^{2+}	0,1	45,4 \pm 3,9
	0,25	42,5 \pm 5,1
	0,5	18,2 \pm 4,2

На данный момент о роли кальция или марганца в жизненном цикле бактериофага S-394 данных не опубликовано, однако для хорошо изученного родственного фага T5 наличие ионов кальция является необходимым для нормального протекания многих жизненно важных стадий: инфицирования бактериальной клетки, синтеза фаговой РНК и белков. Также для Zn²⁺-зависимой аминопептидазы А семейства M1 (глиузинцин) показана активирующая роль Ca²⁺ и Mn²⁺. В случае аминопептидазы А катионы Ca²⁺ и Mn²⁺ связывают аспарагиновую кислоту полипептидной цепи фермента и N-концевой аспартат или глутамат субстрата, что способствует правильной ориентации субстрата в активном центре [219]. По аналогии можно предположить, что D-глутаминовая кислота в пептидном фрагменте пептидогликана *E. coli* (Рисунок 2) может принимать активное участие в каталитическом акте или в связывании Lys394 с субстратом.

Ингибирующее действие ЭДТА наряду с наличием консервативных остатков гистидина и аспарагиновой кислоты в аминокислотной последовательности Lys394, координирующих катион металла (His66, Asp73, Asp130 и His133), позволяет отнести исследуемый фермент к классу металлоэндопептидаз (ЕС 3.4.24.-). Окончательно об этом можно будет утверждать после экспериментального определения связи, гидролизуемой в пептидогликане под действием Lys394.

7.2. Субъединичная организация Lys394.

С помощью гель-проникающей хроматографии было показано, что Lys394 в растворе находится в виде мономера и не образует мультимерных комплексов. Это характерно для всех описанных эндолизинов, специфичных к грамотрицательным микроорганизмам (подробнее в разделе 7.3.Рисунок 31).

7.3. Спектр гидролизуемых микроорганизмов

Для установления спектра микроорганизмов, лизируемых под действием исследуемого фермента, были взяты 9 грамотрицательных и 3 грамположительных вида бактерий. Грамотрицательные бактерии были предобработаны хлороформом, с использованием стандартной методики приготовления клеточного субстрата (раздел 5.10).

Все грамотрицательные бактерии среди протестированных микроорганизмов в равной степени подвергались лизису (Рисунок 31.Таблица 8). Такая широкая специфичность – характерная черта эндолизинов бактериофагов, специфичных к грамотрицательным бактериям. Причина этого заключается в том, что пептидогликан всех грамотрицательных

бактерий относится к одному и тому же хемотипу A1γ, образует более тонкий слой, чем в случае грамположительных бактерий, а также менее вариативен от вида к виду.

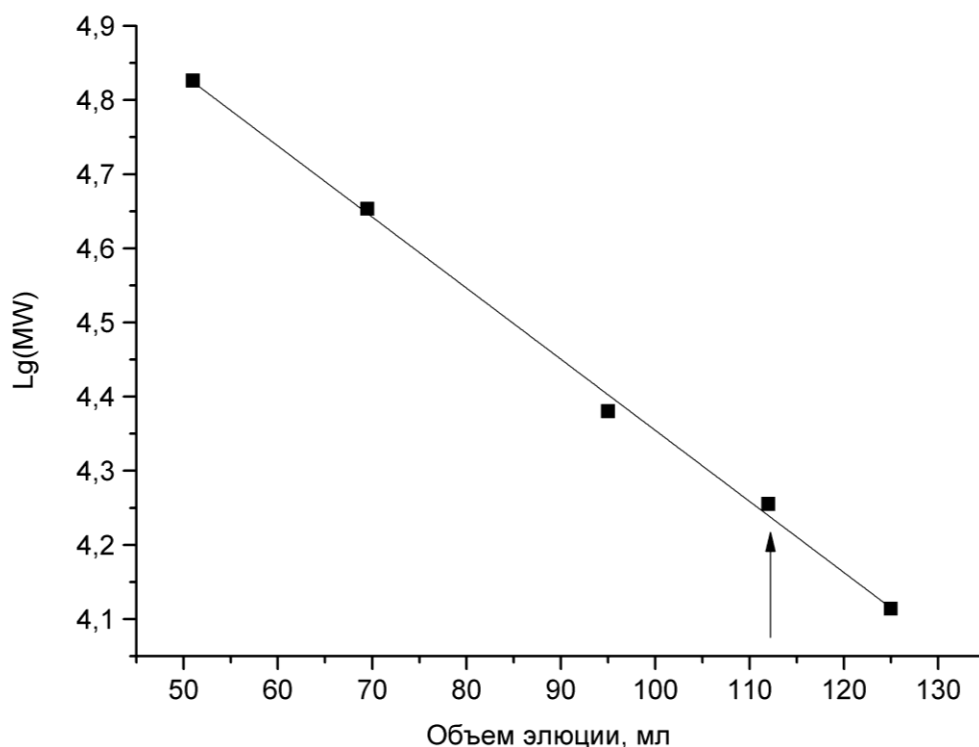


Рисунок 31. Калибровочная кривая для гель-фильтрационной колонки. Стрелкой указан объем элюции для очищенного препарата Lys394. Для хроматографии использовали колонку 65 × 1,5 см, уравновешенную буферным раствором, содержащим 20 мМ трис/HCl pH 8,0 и 150 мМ NaCl. Элюцию проводили тем же раствором при скорости 0,5 мл/мин. Маркеры молекулярной массы: бычий сывороточный альбумин (67 кДа), овальбумин (45 кДа), химотрипсиноген А (24 кДа), миоглобин (18 кДа) и цитохром С (13 кДа).

Отличия в наблюдаемых скоростях лизиса для разных видов грамотрицательных бактерий могут быть объяснены различиями в структуре пептидогликанов (количество цепей гликана в слое их длина, степень сшивки и т.д.), а также в разной эффективности процедуры предобработки хлороформом для разных видов бактерий.

В случае грамположительных бактерий уменьшение мутности суспензии клеток было сравнимо с фоновым лизисом клеток под действием компонентов буферного раствора даже в случае относительно высокой концентрации фермента – 10 мкг/мл в реакционной смеси – и инкубации в течение часа. Таким образом, эндолизин Lys394 является строго специфичным по отношению к грамотрицательным бактериям. Причем спектр микроорганизмов, подверженных

лизису в присутствии фермента, не ограничивается семейством энтеробактерий, на которых изначально был культивирован фаг S-394 – источник исследуемого фермента.

Таблица 8. Лизис бактерий различных видов под действием эндолизина Lys394. Реакция проводилась в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис/HCl (pH 8,5), концентрация фермента 0,5 мкг/мл. Клетки грамотрицательных бактерий перед измерениями были предобработаны буферным раствором, насыщенным хлороформом. Представленные значения являются средними для трех измерений \pm стандартное отклонение.

Вид бактерии	Скорость лизиса, $\Delta OD_{600}/\text{мин}$
<i>E. coli</i>	0.33 ± 0.03
<i>S. typhimurium</i>	0.30 ± 0.02
<i>P. aeruginosa</i>	0.36 ± 0.03
<i>P. stuartii</i>	0.25 ± 0.03
<i>P. ananatis</i>	0.37 ± 0.05
<i>P. vulgaris</i>	0.37 ± 0.04
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	0.22 ± 0.04
<i>Sh. sonnei</i>	0.26 ± 0.03
<i>A. baumannii</i>	0.26 ± 0.02
<i>M. luteus</i>	0
<i>S. aureus</i>	0
<i>B. subtilis</i>	0

8. Применение рекомбинантного Lys394 снаружи клеток

8.1. Увеличение проницаемости внешней мембраны *E. coli*

8.1.1. Выбор агентов для увеличения проницаемости внешней мембраны *E. coli*

Ферментативный лизис бактериальных клеток *in vivo* на последней стадии жизненного цикла фагов происходит строго в определенный момент с участием особых систем, которые обеспечивают доставку эндолизинов из цитоплазмы через внутреннюю мембрану к пептидогликану. Напротив, в случае применения эндолизинов в качестве противомикробных препаратов предполагается применение фермента извне клетки.

В отличие от грамположительных бактерий, у которых пептидогликан экспонирован во внешнюю среду, клетки грамотрицательных бактерий дополнительно покрыты снаружи внешней мембраной, основу которой составляет ассиметричный липидный бислой. Внешняя сторона липидного бислоя сформирована отрицательно заряженными липополисахаридами, дополнительно стабилизированными бивалентными катионами (глава 2). Поэтому внешняя мембрана грамотрицательных бактерий является непроницаемой для большинства веществ. Самопроизвольно через внешнюю мембрану могут проникать лишь небольшие гидрофильные молекулы; для высокомолекулярных веществ типа ферментов внешняя мембрана является непреодолимым барьером. Следовательно, для эффективного применения пептидогликангидролаз извне клетки требуется предварительное нарушение целостности внешней мембраны достаточное для проникновения молекул белка через образовавшиеся разрывы к пептидогликану.

Наличие бивалентных катионов во внешней мембране является одним из основных факторов ее устойчивости. Удаление (или замещение) катионов металлов, связанных с липополисахаридами, приводит к дестабилизации и разупорядочиванию внешнего липидного бислоя и, как следствие, к многократному увеличению восприимчивости грамотрицательных клеток к антибиотикам и даже к проницаемости внешней мембраны для небольших ферментов, например для куриного лизоцима (раздел 2.5).

Нами была поставлена задача увеличения проницаемости внешней мембраны клеток лабораторного штамма *E. coli* CR63 для фермента Lys394. Липополисахариды, входящие в состав внешней мембраны клеток этого штамма относятся к хемотипу Ra, как и в случае всех лабораторных штаммов *E. coli*, происходящих от штамма K12 (подробнее в разделе 2.2). Иными словами, большинство лабораторных штаммов *E. coli*, включая штамм CR63, утратили бóльшую

часть полисахаридной оболочки, которая могла бы затруднять транспорт фермента через внешнюю мембрану снаружи вовнутрь. Поэтому при решении текущей задачи мы не предпринимали мер, направленных на дестабилизацию полисахаридной капсулы клеток.

В случае исследуемого в данной работе фермента помимо наличия внешней мембраны существует ещё одно обстоятельство, мешающее эффективному применению Lys394 для контроля грамотрицательной микрофлоры. Экспериментально определенное значение изоэлектрической точки Lys394 близко к 7 (Рисунок 32). Это означает, что при значениях pH, оптимальных для функционирования Lys394 (pH 8,5), молекула фермента и бактериальные клетки несут одноименный заряд и электростатически отталкиваются.

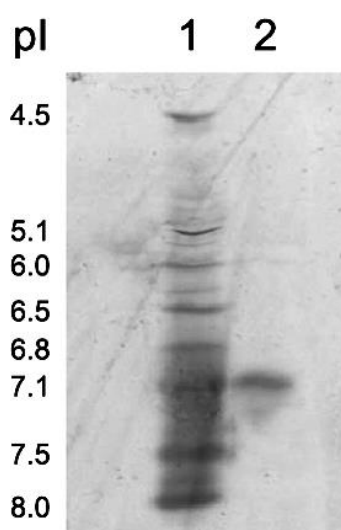


Рисунок 32. Изоэлектрофокусирование Lys394. Дорожка 1 – маркеры pI; дорожка 2 – Lys394.

На основе данных о строении внешней мембраны грамотрицательных бактерий мы выбрали ряд веществ для увеличения проницаемости внешней мембраны. Выбор потенциальных агентов для разупорядочивания внешней мембраны осуществлялся по двум критериям: имеющаяся в литературе информация, прямо или косвенно указывающая на их способность сделать внешнюю мембрану проницаемой для фермента относительно небольшого размера, а также их коммерческая доступность. В итоге мы остановили свой выбор на следующем наборе веществ: полилизин и полиаргинин различной длины, сополимеры ПЭГ-полилизин, протамин из молок лосося и антибактериальные пептиды PGLa и магаинин, входящие в состав слизистых оболочек гладкой шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*).

Полилизин и полиаргинин широко известны своей способностью разупорядочивать внешнюю мембрану, увеличивая эффективность действия многих антибиотиков. Причем эффект поли-L-аминокислот зависит от их длины. Включение блоков полиэтиленгликоля в

состав полимеров на основе аминокислот может снизить токсичность сополимера, что делает последний более привлекательным для медицинского применения.

Выбранные олигопептиды природного происхождения – протамин, магаинин и PGLa – также взаимодействуют с липидными мембранами. Из литературных данных известно, что протамин способен вызывать нарушения мембраны, достаточные для перехода содержимого периплазмы во внешнюю среду. А взаимодействие PGLa и магаинина с внешней мембраной грамотрицательных клеток относят к "ковровому" механизму, что в теории должно приводить к образованию пор во внешней мембране соразмерных с белковыми глобулами (подробнее см. раздел 2.5). В целом, применение катионных пептидов для совместного использования с бактериолитическими ферментами очень перспективно. Так, в ходе работы было показано, что присутствие 25 мкг/мл колистина в реакционной смеси с эндолизином бактериофага SPZ7 позволяет увеличить скорость лизиса клеток *E. coli* в два с половиной раза. Особого внимания заслуживает то, что такая концентрация колистина не вызывает существенного фонового лизиса и не ингибирует рост культуры клеток. Применение положительно заряженных олигопептидов в нашем случае также может решить проблему электростатического отталкивания отрицательно заряженного фермента и клеточной мембраны, улучшая таким образом связывание фермента с субстратом.

8.1.2. Взаимодействие гомополимеров аминокислот и катионных олигопептидов с интактными клетками *E. coli*

Увеличение проницаемости внешней мембраны *E. coli* под действием выбранных агентов регистрировали спекрофотометрически по высвобождению во внешнюю среду бактериальных β -лактамаз, в норме находящихся в периплазматическом пространстве. По сравнению с другими методами, применяемыми для оценки целостности бактериальных мембран, этот метод позволяет напрямую фиксировать наличие разрывов во внешней мембране *E. coli*, размер которых достаточен для свободного транспорта ферментов. Учитывая тот факт, что молекулярная масса большинства бактериальных β -лактамаз превышает таковую для Lys394, можно предположить, что появление β -лактамазной активности в межклеточном пространстве является достаточным условием для проникновения Lys394 к пептидогликану извне.

Эффект, наблюдаемый при добавлении гомополилизинов или гомополиаргининов к суспензии интактных клеток *E. coli* зависит от длины полимера. Наиболее короткий из протестированных полилизинов с распределением молекулярной массы от 1 до 4 кДа не

вызывал переход β -лактамазы во внешнюю среду. В то же самое время препараты, наиболее длинных из протестированных полилизин (30–70 кДа) и полиаргинин (15–70 кДа и > 70 кДа), вызывали агглютинацию клеток *E. coli*. При этом высвобождение β -лактамаз из клеток в реакционную смесь также не наблюдалось. Максимальное увеличение проницаемости внешней мембраны *E. coli* наблюдалось при использовании полиаргинина с распределением молекулярной массы полимера от 5 до 15 кДа. В случае использования этого препарата доля β -лактамазы в межклеточном пространстве зависит от количества полимера в реакционной смеси в области концентраций от 2 до 25 мкг/мл. При концентрации 25 мкг/мл доля β -лактамазы, перешедшей из периплазмы во внешнюю среду, составляла 70%. Дальнейшее увеличение концентрации полиаргинина в растворе не приводило к увеличению этого значения (Рисунок 33).

В случае использования блок-сополимерв лизина и этиленгликоля также явно прослеживается зависимость уровня β -лактамазной активности в растворе от количества положительных зарядов в цепи полимера. Поли-*L*-лизин-полиэтиленгликоль, содержащий 10 остатков лизина в цепи, также как и самый короткий из протестированных гомополимеров лизина, не вызывал высвобождение β -лактамазы из перимплазмы. При увеличении количества остатков лизина с 10 до 30 в цепи блок-сополимера эффект проявляется, но по сравнению с действием полиаргинина с распределением молекулярной массы полимера 5–15 кДа доля β -лактамазы в растворе приблизительно в два раза меньше. Это явление может быть связано как с количеством положительных зарядов в полимерной цепочке сравниваемых полимеров, с химической природой заряженной группы, так и с наличием блока полиэтиленгликоля.

Наряду с гомо- и блок-сополимерами аминокислот мы протестировали три природных олигопептида – PGLa, магаинин и протамин – на их способность вызывать переход периплазматической β -лактамазы *E. coli* наружу.

Добавление протамина к интактным *E. coli* в концентрации от 1 до 50 мкг/мл приводило к увеличению оптической плотности (OD_{600}) суспензии клеток (Рисунок 34). При этом высвобождения β -лактамазы из периплазмы во внешний раствор не наблюдалось.

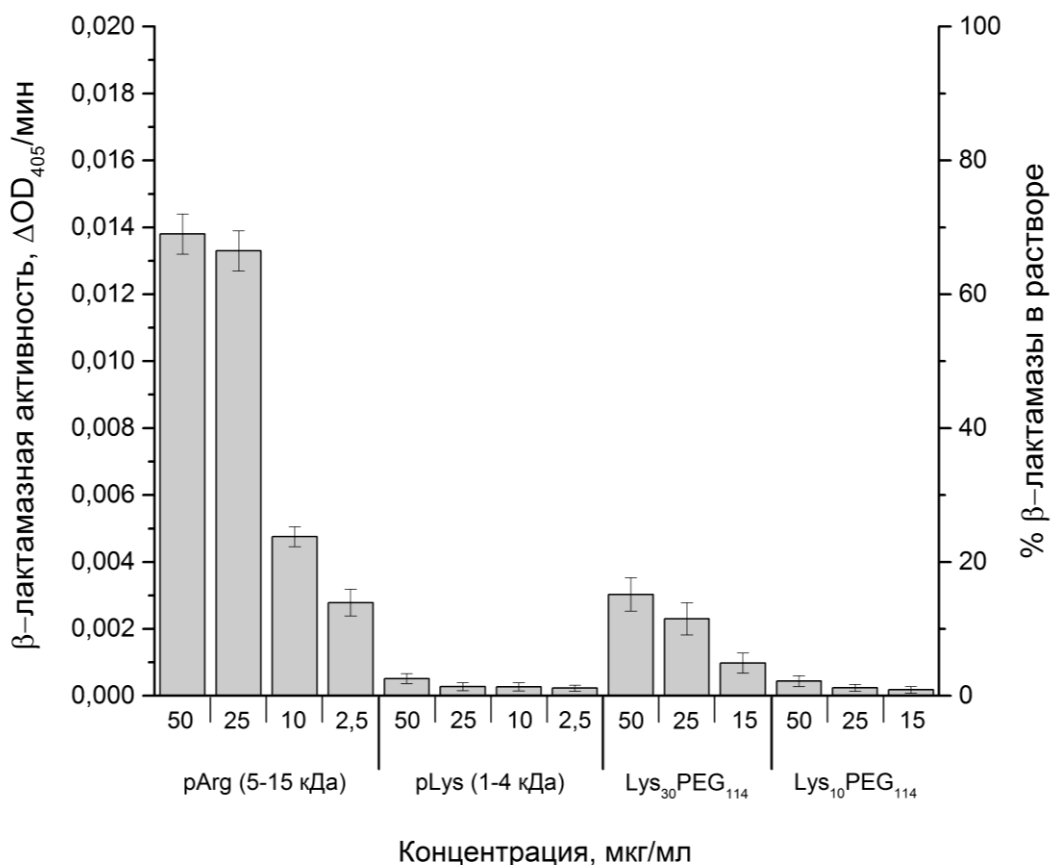


Рисунок 33. Переход β-лактамазы из периплазмы интактных клеток *E. coli* CR63 наружу под действием поли-L-аргинина 5–15 кДа (pArg), поли-L-лизина 1–4 кДа (pLys), блоксополимеров Lys₃₀PEG₁₁₄ и Lys₁₀PEG₁₁₄. В-лактамазную активность в растворе регистрировали спектрофотометрически с помощью хромогенного субстрата широкой специфичности CENTA. На левой оси отложены значения β-лактамазной активности. Каждое из измеренных значений отнесено к доле β-лактамазы в растворе. Значению 100% соответствует β-лактамазная активность в растворе после полного разрушения клеток *E. coli* ультразвуком. Указанные значения соответствуют среднему ± стандартное отклонение.

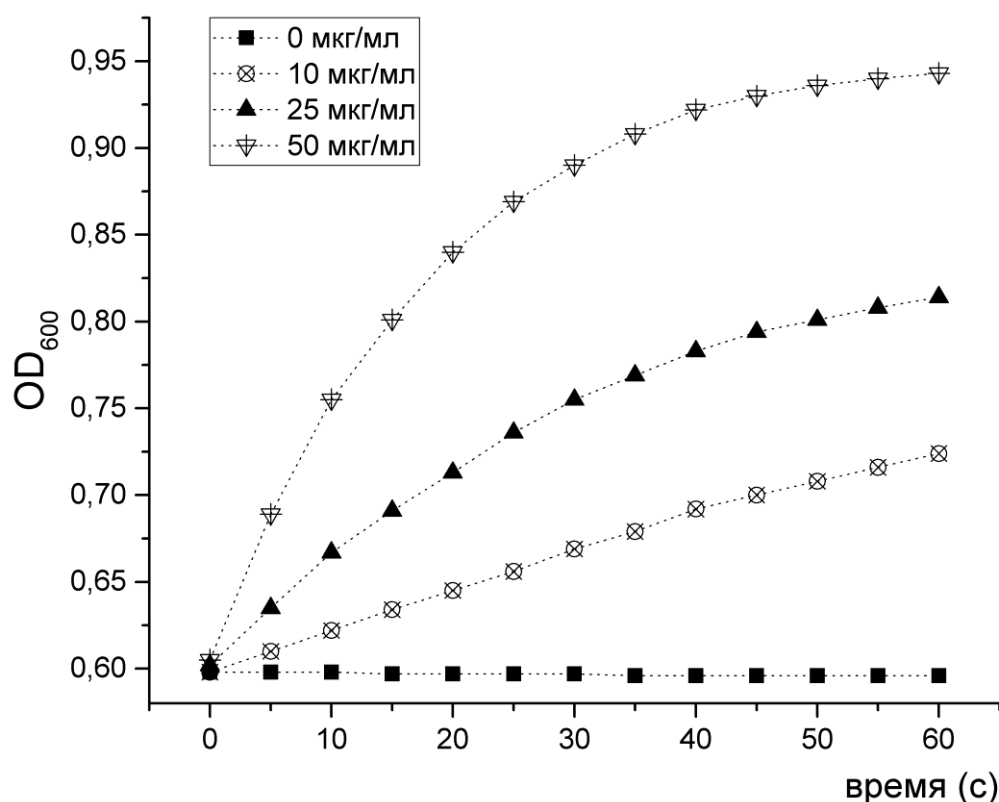


Рисунок 34. Увеличение оптической плотности суспензии клеток под действием различных концентраций протамина. Состав буферного раствора: 20 мМ трис/HCl (pH 8,5).

При наблюдении в оптический микроскоп визуально было установлено, что в присутствии протамина клетки *E. coli* теряли подвижность и становились более шероховатыми. Предположительно наблюдаемая шероховатость клеток обуславливала более высокую способность клеток отражать свет, что в итоге приводило к повышению наблюдаемой оптической плотности суспензии клеток в присутствии протамина. Такая морфология клеток может быть связана с потерей внешней мембраной некоторой доли липополисахаридов, так как из литературы известно, что действие протамина на внешнюю мембрану близкородственной *Salmonella enterica serovar typhimurium* сопровождается именно высвобождением ЛПС из состава внешней мембраны. Тем не менее полученные в ходе эксперимента данные свидетельствуют о том, что в присутствии протамина внешняя мембрана недостаточно сильно дестабилизирована для перехода периплазматической β -лактамазы наружу.

Остальные два олигопептида – PGLa и магаинин – вызывают переход β -лактамазы из периплазмы интактных клеток *E. coli* в окружающий раствор. Наблюдаемый эффект (доля β -лактамазы в растворе) зависит от количества олигопептида в области концентраций от 2 до 40 мкг/мл (Рисунок 35). Дальнейшее повышение концентрации пептидов в реакционной смеси не приводило к значимому увеличению высвобождения β -лактамазы из клеток.

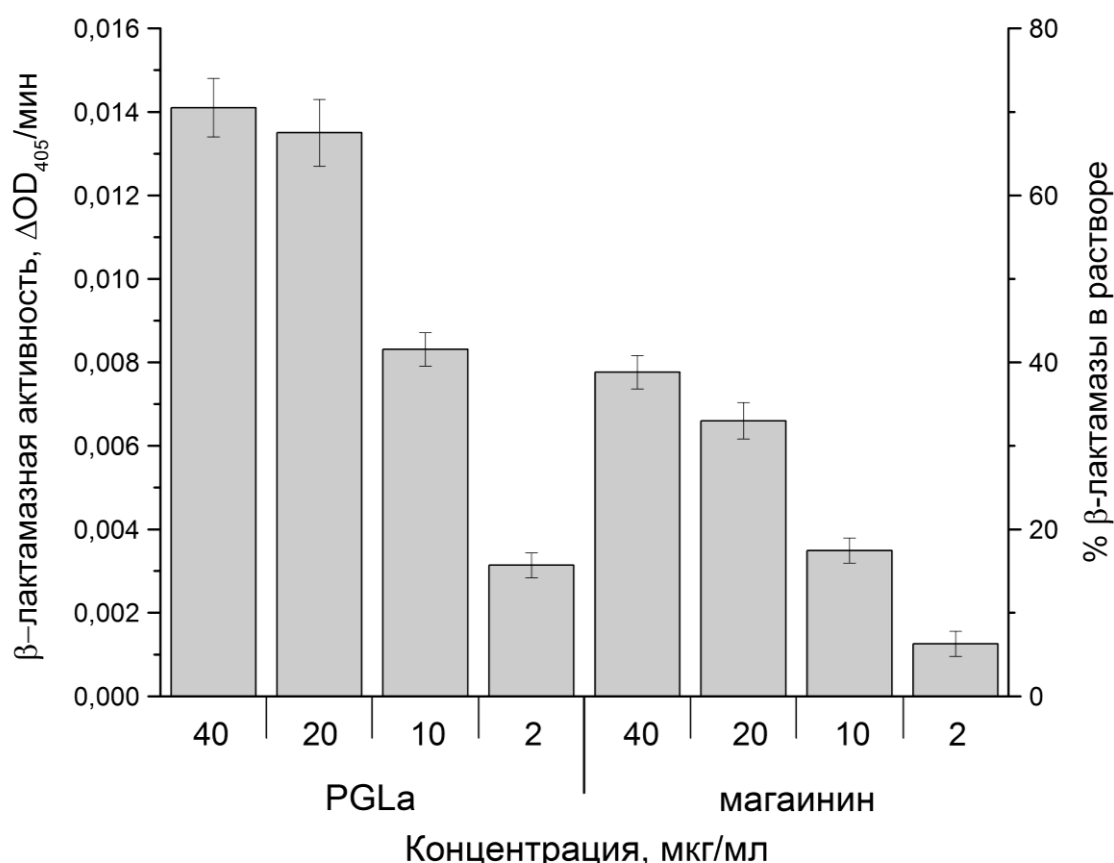


Рисунок 35. Переход β -лактамазы из периплазмы интактных клеток *E. coli* CR63 наружу под действием олигопептидов PGLa и магаинина. Каждое значение β -лактамазной активности отнесено к доле β -лактамазы в растворе. Значению 100% соответствует β -лактамазная активность в растворе после полного разрушения клеток *E. coli* ультразвуком. Указанные значения соответствуют среднему \pm стандартное отклонение.

Из литературных данных известно, что взаимодействие пептидов PGLa и магаинина с мембранами грамотрицательных клеток и с модельными липидными мембранами описывается в рамках одной и той же модели, а именно модели "коврового" взаимодействия (Рисунок 17). Вкратце, отличительной чертой этой модели является первичное накопление пептида на поверхности внешней мембраны с последующим образованием

неструктурированных пор, происходящим при превышении концентрации пептида некоего порогового значения. Для пептидов, взаимодействующих с мембранами согласно "ковровой" модели, характерными действующими концентрациями являются 2–20 мкмоль/л, что с учетом перевода единиц концентраций из мкмоль/л в мкг/мл хорошо согласуется со значениями концентраций, при которых мы наблюдали высвобождение бактериальных β -лактамаз из периплазмы в раствор.

Данные, приведенные на рисунке 35, свидетельствуют о том, что PGLa по сравнению с магаином более эффективно разупорядочивает внешнюю мембрану *E. coli*. При практически равном количестве аминокислотных остатков (PGLa содержит 21 а.о. в цепи, магаинин – 23) и равном количестве положительных зарядов (по 4 положительных заряда для каждого из пептидов) наблюдаемое отличие может быть объяснено различиями в качественном составе магаинина и PGLa. Магаинин, наряду с четырьмя остатками лизина, содержит остаток глутаминовой кислоты, что понижает суммарный положительный заряд молекулы пептида и может снижать эффективность связывания пептида с отрицательно заряженной внешней мембраной. Помимо суммарного заряда важными факторами взаимодействия олигопептидов с внешней мембраной являются расположение положительных зарядов по цепи и индекс гидрофобности пептида. PGLa является более гидрофобным, что облегчает встраивание пептида в липидный бислой. Йорг Андра с соавторами в своей работе отмечают важность расположения положительных зарядов ближе к C-концу, что характерно для PGLa, в то время как в молекуле магаинина все положительные заряды находятся в N-концевой половине последовательности [154].

8.2. Лизис интактных клеток *E. coli* под действием Lys394 в присутствии агентов, разупорядочивающих внешнюю мембрану

Эффективность лизиса интактных клеток *E. coli* в присутствии агентов, увеличивающих проницаемость внешней мембраны, была протестирована в двух режимах: лизис планктонных клеток (суспензия бактерий в буферном растворе) и лизис клеток, выросших на поверхности агаризованной питательной среды. Для проведения этого эксперимента мы отобрали те агенты, увеличивающие проницаемость внешней мембраны, которые приводили к наибольшему высвобождению β -лактамазы из периплазмы в предыдущих опытах, а именно поли-L-аргинин (5–15 кДа) и олигопептид PGLa.

8.2.1. Лизис суспензии клеток *E. coli*

Лизис интактных клеток *E.coli*, сенсibilизированных с помощью агентов, увеличивающих проницаемость внешней мембраны, регистрировали спектрофотометрически по просветлению клеточной суспензии. В каждом эксперименте скорость лизиса оценивали с помощью метода линейной регрессии, примененного к зависимости оптической плотности от времени.

Для лизиса планктонных клеток *E. coli* мы применяли PGLa и поли-L-аргинин в тех концентрациях, при которых наблюдался эффект высвобождения периплазматической β -лактамазы, зависящий от дозы агента. Lys394 применяли в концентрации 0,25 мкг/мл, что соответствует середине линейного участка зависимости активности фермента от его концентрации в реакционной смеси (Рисунок 28). При такой концентрации фермента скорость гидролиза пептидогликана является лимитирующим процессом просветления суспензии клеток. Поэтому увеличение скорости гидролиза пептидогликана под действием фермента может быть достоверно зафиксировано.

Полученные данные свидетельствуют о том, что и PGLa и поли-L-аргинин (5–15 кДа) в присутствии Lys394 вызывают быстрый лизис интактных клеток *E. coli*. Скорость лизиса клеток зависит от концентрации каждого из указанных выше веществ в реакционной смеси (Рисунок 36).

Достигнутая максимальная скорость лизиса интактных клеток *E. coli* в этом эксперименте составляет примерно 50% от скорости лизиса клеток, обработанных хлороформом, в аналогичных условиях, но без вспомогательных агентов, увеличивающих проницаемость внешней мембраны.

Основным недостатком использования PGLa и поли-L-аргинина в качестве аддитивов к пептидогликангидролазам является следующий аргумент. Согласно литературным данным вещества поликатионной природы обладают выраженным токсическим действием, поэтому авторы многих работ сходятся во мнении, что применение поликатионов и катионных олигопептидов ограничено неинвазивным применением [36]. В то же время, в последние годы активно проводятся исследования о влиянии структуры олигопептидов на их активность в отношении бактериальных мембран, токсичность и подверженность протеолизу. Среди наиболее значимых результатов в этой области можно отметить получение синтетических пептидов, обладающих ярко выраженной антимикробной активностью, с пониженным

уровнем токсичности по отношению к клеткам млекопитающих и пониженной гемолитической активностью.

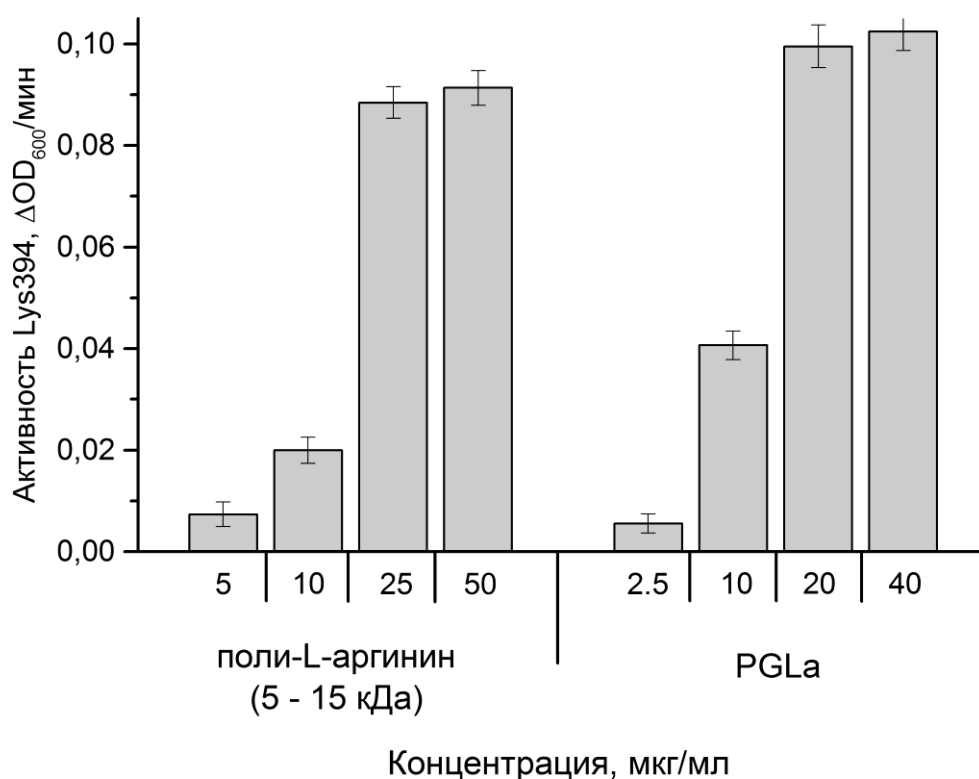


Рисунок 36. Лизис интактных клеток *E. coli* CR63 под действием Lys394 в присутствии поли-L-аргинина (5–15 кДа) и PGLa. Реакция проводилась в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис-НСI (рН 8,5). Концентрация фермента составляла 0,25 мкг/мл. Указанные значения соответствуют среднему \pm стандартное отклонение.

В качестве примера пептида с такими характеристиками можно привести синтетический $(\text{KLAKLAK})_2$ [220]. Таким образом, варьируя последовательность пептида, можно добиться снижения его токсичности без ущерба для антимикробной активности. Вследствие этого применение эндолизинов в смеси с антибактериальными пептидами или в виде ковалентной сшивки эндолизин–пептид представляет собой метод контроля патогенной грамотрицательной микрофлоры с высоким потенциалом.

8.2.2. Лизис газонных клеток *E. coli*

Во многих случаях патогенные бактерии развиваются не в планктонном виде, а на различных поверхностях. Здесь достаточно упомянуть кожные инфекции бактериального происхождения, заражение помещений, вентиляции, рабочих поверхностей, медицинских

инструментов. Поэтому наряду с применением Lys394 к бактериальной суспензии мы протестировали эффективность лизиса *E. coli*, культивированных на поверхности, под действием Lys394 совместно с PGLa и поли-L-аргинином (5–15 кДа).

В качестве модели культуры бактерий, развивающейся на поверхности, мы выбрали разреженный газон *E. coli* ($\approx 5 \times 10^6$ КОЕ/см²), выращенный на агаризованной среде 2xTY. Лизис клеток регистрировали с помощью пересева клеток из пятна лизиса и последующего подсчета колоний.

В целом, эффективный лизис газонных клеток наблюдался при более высоких концентрациях действующих веществ по сравнению с лизисом планктонных клеток. Поли-L-аргинин оказался непригоден для совместного применения с Lys394 для лизиса газона бактерий. При концентрациях полиаргинина, характерных для лизиса планктонных клеток (до 40 мкг/мл), лизиса газонной культуры не наблюдалось, а при концентрациях выше 100 мкг/мл наблюдалось соосаждение Lys394 и поли-L-аргинина.

Использование PGLa в той же концентрации и той же дозы фермента, при которых наблюдался лизис бактериальной суспензии, гибели клеток, культивированных на поверхности агаризованной среды, практически не происходило – десятичный логарифм доли выживших клеток составил 0,16 (Таблица 9). Такая низкая эффективность может быть обусловлена следующими причинами. Во-первых, непосредственному действию Lys394 и PGLa в полной мере подвергаются лишь верхние слои клеток газона. Во-вторых, высвобождение внутриклеточных компонентов в процессе лизиса может заметно смещать pH реакционной среды, ионную силу и вязкость, что в итоге может выражаться в понижении ферментативной активности Lys394 и в снижении активности PGLa.

В итоге глубокий лизис газонной культуры клеток *E. coli* (гибель >99,99 % в течение 30 минут) был достигнут введением в реакционную систему ЭДТА. Механизм действия ЭДТА на внешнюю мембрану *E. coli* отличается от механизма действия PGLa и заключается в хелатировании катионов Ca²⁺ и Mg²⁺, удерживающие молекулы ЛПС вместе. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что совместное применение двух агентов, дестабилизирующих мембрану, приводит к синергетическому усилению лизиса клеток.

Полученные данные несколько не согласуются с тем, что Lys394 является металл-зависимым ферментом и ингибируется под действием ЭДТА (Рисунок 29). С другой стороны, полученные данные свидетельствуют о положительном эффекте ЭДТА с высокой степенью статистической достоверности. Мы полагаем, что при концентрациях до 1 мМ ЭДТА преимущественно расходуется на связывание катионов, входящих в состав клеточной стенки,

не затрагивая существенным образом катионы в активном центре фермента. При повышении концентрации ЭДТА до 5 мМ в реакционной смеси происходит ингибирование действия фермента. В этом случае наличие или отсутствие фермента не влияет на падение титра выживших клеток. Увеличение концентрации ЭДТА до 10 мМ в реакционной смеси приводит к полному отсутствию жизнеспособных клеток спустя 30 минут после обработки.

Таблица 9. Литическая активность смесей, содержащих Lys394, PGLa и ЭДТА в различных соотношениях, в отношении газона E. coli. Антибактериальная активность выражена в $\log_{10}(N_0/N_i)$, N_0 – количество жизнеспособных клеток в контроле, N_i – количество жизнеспособных клеток после обработки одной из комбинаций Lys394/PGLa/ЭДТА. Представленные значения являются средним арифметическим трех измерений \pm стандартное отклонение.

Доза Lys394 (мкг)	Концентрация PGLa, мг/мл		
	0	0,02	0,05
0 мМ ЭДТА			
0	0	0,09 \pm 0,04	0,12 \pm 0,05
10	0,07 \pm 0,04	0,11 \pm 0,06	0,16 \pm 0,05
25	0,10 \pm 0,05	0,12 \pm 0,05	0,16 \pm 0,05
1 мМ ЭДТА			
0	0,07 \pm 0,03	0,19 \pm 0,04	0,75 \pm 0,08
10	0,38 \pm 0,11	0,56 \pm 0,09	2,79 \pm 0,21
25	0,49 \pm 0,11	1,84 \pm 0,25	4,08 \pm 0,25
5 мМ ЭДТА			
0	0,51 \pm 0,14	0,56 \pm 0,12	0,75 \pm 0,08
10	0,55 \pm 0,14	0,58 \pm 0,16	0,69 \pm 0,21
25	0,57 \pm 0,14	0,59 \pm 0,21	0,77 \pm 0,18

Таким образом, применение Lys394 совместно с антимикробным пептидом PGLa и ЭДТА может стать эффективным методом контроля широкого спектра грамотрицательных бактерий. Вместе с тем, полученные данные свидетельствуют о том, что характер лизиса планктонных и газонных клеток значительным образом отличаются, поэтому при тестировании препаратов для поверхностного применения необходимо использовать релевантную модель.

9. Термостабильность и стабилизация Lys394

9.1. Кинетика термоинактивации фермента Lys394

В ходе работы мы исследовали термоинактивацию Lys394 в диапазоне температур 20–50 °С при pH 8,0. Было показано, что в этих условиях термоинактивация протекала необратимо.

В полулогарифмических координатах процесс термоинактивации описывается линейной зависимостью. Из тангенса угла наклона полученных прямых были определены эффективные константы термоинактивации при разных температурах. Линейная зависимость натурального логарифма остаточной активности от времени свидетельствует о том, что инактивация фермента протекает согласно кинетике реакции первого порядка (Рисунок 37).

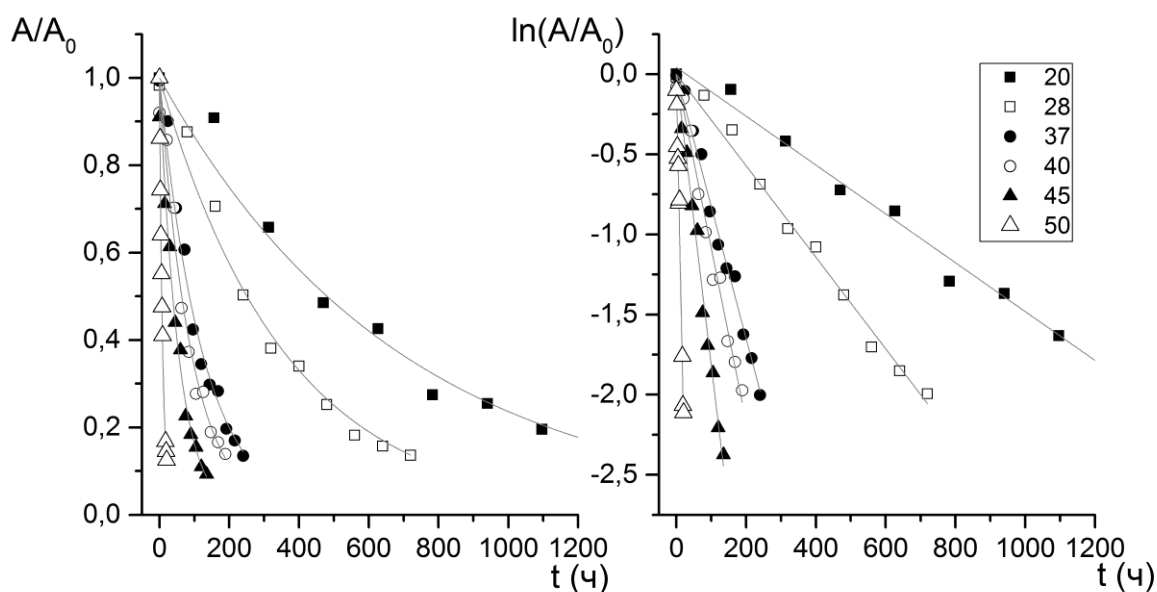


Рисунок 37. Кинетика термоинактивации Lys394 при различных температурах. Слева – график в прямых координатах, справа – в полулогарифмических. 20 mM трис–HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl. Каждая точка на графике является средним значением минимум трех измерений.

В протестированном диапазоне температур скорость термоинактивации Lys394 не зависит от концентрации фермента, что указывает на то, что этот процесс протекает по мономолекулярному механизму. В итоге, полученные данные указывают на то, что основным механизмом термоинактивации является денатурация белковой глобулы.

В исследованном диапазоне температур закономерности процесса термоинактивации оставались неизменными (первый порядок реакции, необратимость и независимость от концентрации фермента). Поэтому для удобства стабилизационный эффект различных факторов исследовался при 37 °С, а потом проверялся при 20 °С. Исследование влияния

различных условий и компонентов на скорость термоинактивации проводилось при концентрации фермента 0,5 мкг/мл, так как это значение соответствует концу линейного участка зависимости активности фермента от концентрации.

9.2. Стабилизация фермента Lys394

9.2.1. Стратегия стабилизации фермента Lys394

После финальной стадии очистки препарат фермента представляет собой водный раствор Lys394 в концентрации 3 – 3,5 мг/мл, гомогенный по белку, содержащий дополнительно 20 мМ трис/HCl (pH 8,0) и 200 мМ NaCl. Как указывалось ранее, срок хранения коммерческих белковых препаратов должен составлять не менее 18 месяцев, в то время как при +20 °С период полуинактивации фермента составляет 20 суток. Поэтому при разработке стратегии стабилизации Lys394 нашей конечной целью было подобрать такие условия, при которых время полуинактивации Lys394 при 20 °С увеличилось бы до 18 месяцев.

Среди факторов, стабилизирующих пространственную структуру белка можно выделить водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия, а также комплексообразование с катионами металлов (дисульфидные мостики, как фактор, стабилизирующий структуру белковой глобулы, здесь не рассмотрен, так как в структуре Lys394 остатки цистеина отсутствуют). Основной вклад в поддержание трехмерной структуры белков вносят гидрофобные взаимодействия и в меньшей степени – остальные.

Известно, что модулировать внутримолекулярные гидрофобные взаимодействия в белковой глобуле можно, изменяя свойства среды (pH, ионную силу) [221] и используя различные добавки, например, полиолы. Эффект усиления гидрофобных взаимодействий, по мнению одних авторов, является основным механизмом стабилизации белковой глобулы в присутствии полиолов [222], хотя существуют и альтернативные объяснения стабилизирующего действия: специфическое связывание с некоторыми белками, образование водородных связей и прочее (подробнее описано в разделе 3.1.2).

Учитывая тот факт, что при pH 8,0 молекула фермента Lys394 отрицательно заряжена (pI 7,0), перспективной стратегией стабилизации Lys394 может быть использование поликатионов, которые за счет многоточечного кулоновского взаимодействия с молекулой фермента, способны препятствовать разворачиванию глобулы и предотвращать потерю активности.

Учитывая вышесказанное, для увеличения стабильности Lys394 был предложен следующий ряд задач:

- Подобрать оптимальную ионную силу и солевой состав буферного раствора, при которой Lys394 наиболее стабилен;
- Исследовать влияние различных полиолов на стабильность Lys394;
- Исследовать влияние различных поликатионов на стабильность Lys394;
- Выбрать оптимальные сочетания компонентов раствора, при которых стабильность Lys394 максимальна.

9.2.2. Влияние ионной силы и солевого состава буферного раствора на стабильность фермента Lys394

Ионная сила и солевой состав буферного раствора являются важными параметрами, влияющими на активность и стабильность фермента. Стабильность Lys394 при 37 и 20°C не зависит от концентрации трис/HCl в диапазоне 20 – 200 мМ. Исходя из этого, в качестве вещества, поддерживающего рН равный 8,0, было решено использовать трис/HCl в концентрации 20 мМ. В качестве компонента, регулирующего ионную силу раствора, был использован NaCl.

Зависимость константы инактивации первого порядка при 37 °С от концентрации хлорида натрия в растворе имеет вид кривой с минимумом (Рисунок 38). Как видно из графика, Lys394 наиболее стабилен в диапазоне концентраций NaCl от 150 до 300 мМ (минимум k_{in}). Дестабилизация фермента при концентрации NaCl выше 300 мМ может происходить из-за ослабления внутримолекулярных электростатических взаимодействий, необходимых для поддержания нативной конформации глобулы белка. При низкой ионной силе, как известно, ослабляются гидрофобные взаимодействия. Рост константы инактивации первого порядка, вызываемый снижением ионной силы, косвенно указывает на то, что гидрофобные взаимодействия являются существенным фактором, поддерживающим нативную конформацию белка.

С учетом выявленных закономерностей, для последующих экспериментов мы использовали препарат фермента, содержащий 150 мМ NaCl. Именно это значение концентрации NaCl является минимальным, при которой Lys394 проявлял наибольшую стабильность. Выбор минимальной активности NaCl из диапазона оптимальных значений обусловлен тем, что в последующих экспериментах мы планировали использовать поликатионы в качестве стабилизатора. Электростатическое связывание поликатиона и молекулы фермента тем сильнее, чем ниже ионная сила буферного раствора.

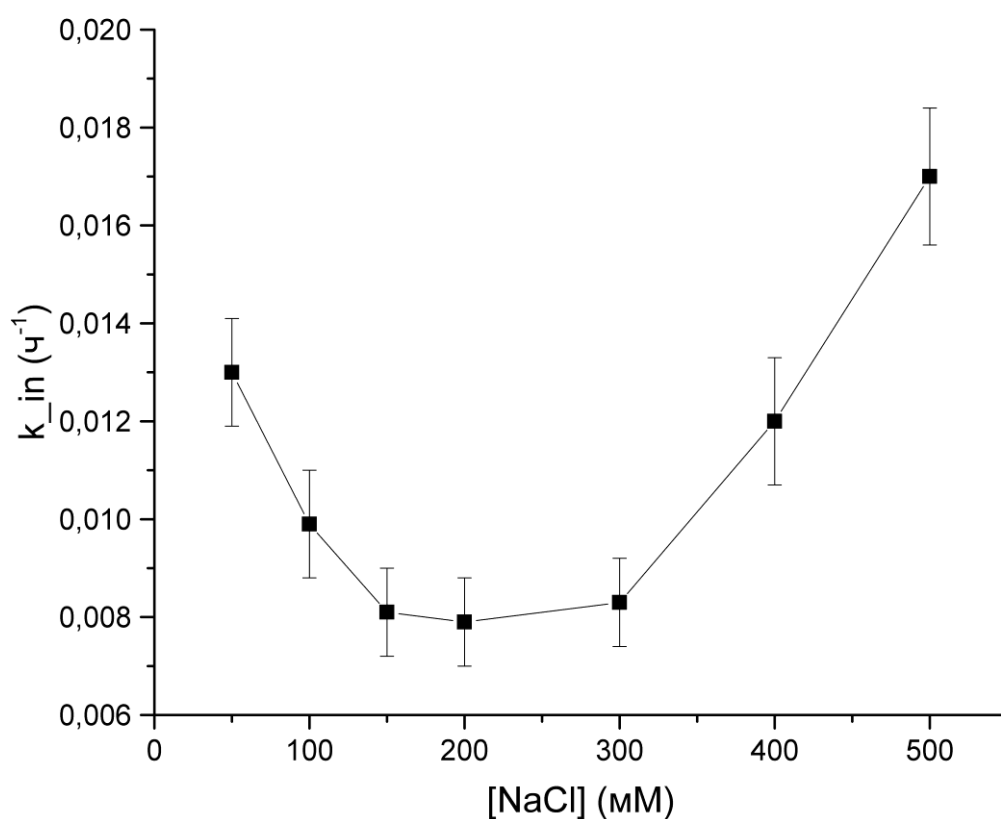


Рисунок 38. Зависимость константы инактивации первого порядка Lys394 при 37 °C от концентрации NaCl. 20 мМ трис-HCl pH 8,0.

Lys394 является металл-зависимым ферментом. По нашим данным, с молекулой Lys394 ассоциирован катион Ca^{2+} или Mn^{2+} (подробнее смотри раздел 7.1). Исходя из этого, присутствие солей кальция или марганца в буферном растворе может подавлять диссоциацию катиона из состава молекулы фермента, как следствие, снижать скорость потери активности.

В присутствии 0,5 мМ Ca^{2+} период полуинактивации Lys394 при 37 °C составляет 14 суток, что в 4 раза превышает период полуинактивации фермента в отсутствие Ca^{2+} (Рисунок 39).

Повышение концентрации Ca^{2+} в буферном растворе вплоть до 5 мМ не приводило к увеличению стабильности препарата фермента. Инкубация Lys394 в присутствии 0,5 мМ хлорида марганца также приводит к увеличению стабильности Lys394. Однако эффект не так ярко выражен – наличие ионов Mn^{2+} (0,5 мМ) в растворе увеличивает время полуинактивации Lys394 с 3,5 до 6,5 суток.

9.2.3. Стабилизация Lys394 с помощью полиолов

В ходе работы мы исследовали влияние ряда полиолов на активность и стабильность Lys394. Для эксперимента были взяты низкомолекулярные полиолы: глицерин, сахароза, глюкоза, трегалоза и фруктоза.

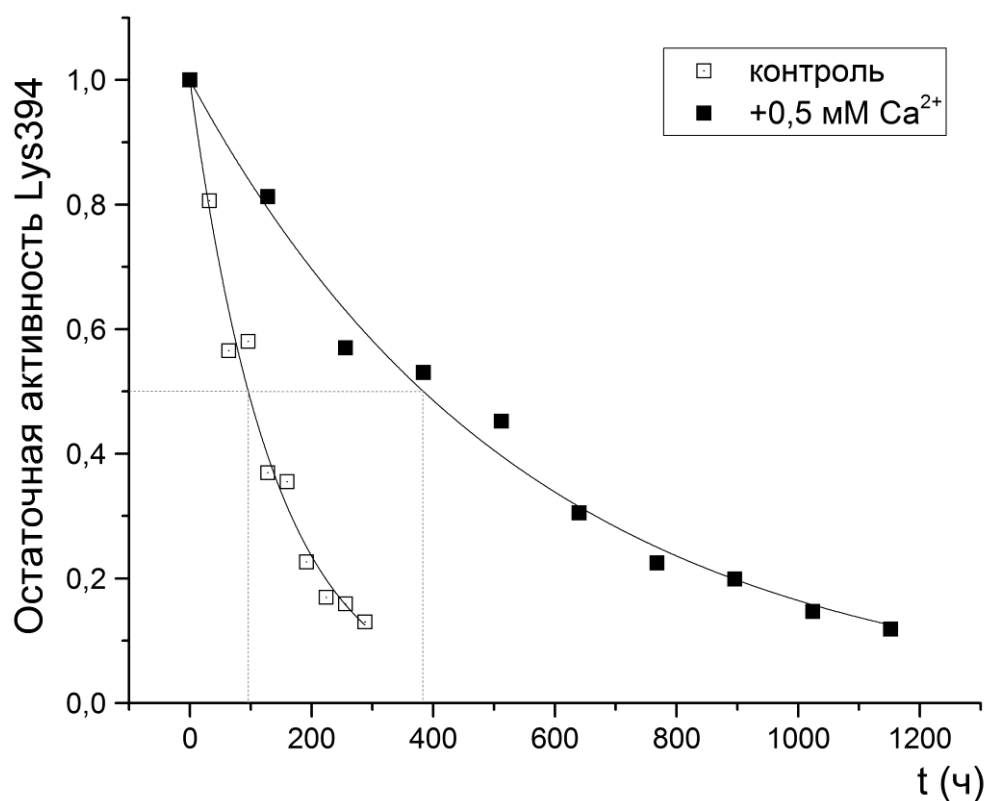


Рисунок 39. Влияние 0,5 мМ Ca^{2+} на термоинактивацию Lys394 при 37 °С. 20 мМ трис/HCl (pH 8,0) 150 мМ NaCl. Серыми пунктирными линиями показаны значения времени полуинактивации.

Сначала мы исследовали влияние указанных выше веществ на активность Lys394. Все протестированные полиолы в разной степени понижают ферментативную активность Lys394. Эффект снижения активности зависит как от природы полиола, так и от его концентрации (Рисунок 40). Минимальная потеря активности наблюдается в присутствии глицерина и трегалозы, тогда как наибольшая потеря активности (до 40%) наблюдалась в случае сахарозы. Наблюдаемая потеря активности может быть связана с воздействием добавок как на фермент, так и на клетки *E. coli*, используемые в качестве субстрата.

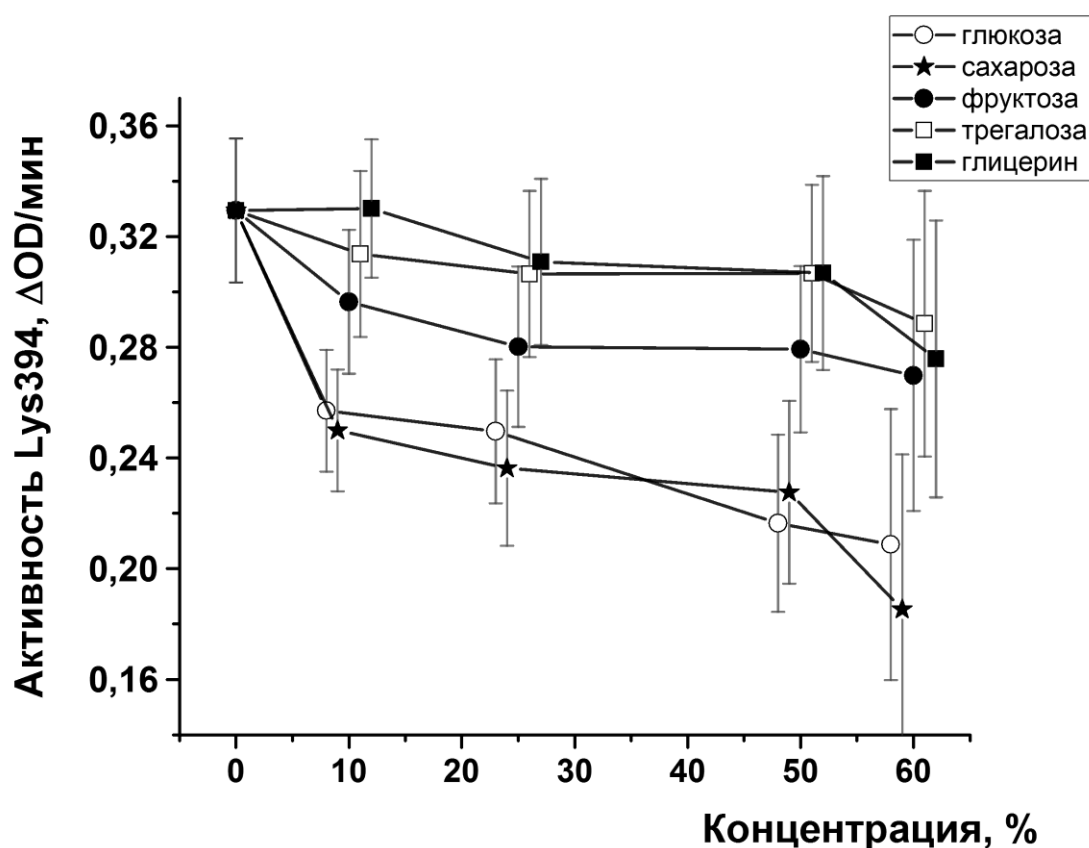


Рисунок 40. Влияние сахаров на ферментативную активность Lys394. 20 мМ трис-HCl (pH 8,0) 150 мМ NaCl, конечная концентрация Lys394 0,5 мкг/мл. Приведенные значения являются средним арифметическим не менее трех измерений \pm 95% доверительный интервал.

Характерной чертой во всех случаях было увеличение погрешности измерения ферментативной активности с ростом концентрации полиола. Мы связали этот эффект с увеличением плотности препарата фермента, как следствие, с менее воспроизводимым перемешиванием компонентов реакционной смеси. Поэтому влияние полиолов на стабильность Lys394 проводилось при концентрациях добавок равных 50% (по массе), когда погрешность измерения активности и итоговая погрешность расчетной константы инактивации первого порядка не превышают 20%.

Все протестированные низкомолекулярные полиолы стабилизируют Lys394 при 37 °C (Рисунок 41). Величина эффекта в случае каждой из добавок увеличивается с ростом концентрации полиола в растворе. Максимальный стабилизирующий эффект наблюдался в присутствии глицерина – период полуинактивации Lys394 при 37 °C в присутствии 50% глицерина увеличился в 13 раз с 3,5 суток до 45 суток. При +20 °C такой препарат сохраняет 90% активности спустя 2 месяца хранения, что соответствует периоду полуинактивации около 7,5 месяцев с учетом того, что процесс инактивации подчиняется кинетике первого порядка.

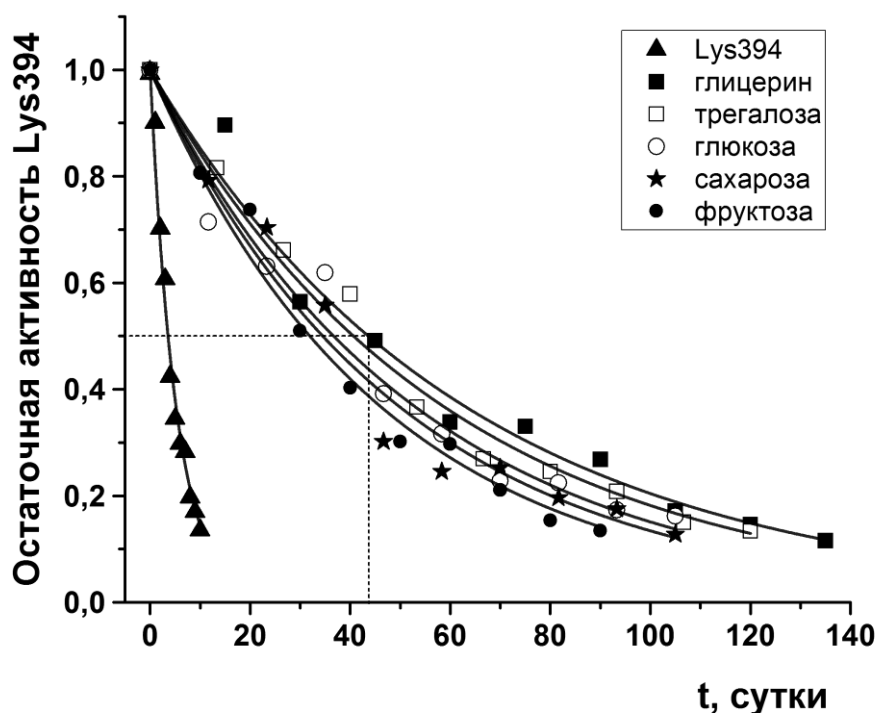


Рисунок 41. Термоинактивация Lys394 в присутствии 50% полиолов при 37 °C. 20 мМ трис/HCl (pH 8,0) 150 мМ NaCl, конечная концентрация Lys394 0,5 мкг/мл.

На основании теории о том, что механизм стабилизации белков в присутствии полиолов заключается в усилении внутрибелковых гидрофобных взаимодействий, можно сделать вывод о том, что гидрофобные взаимодействия в молекуле Lys394 являются одним из ключевых факторов в поддержании нативной конформации.

Использование наилучшего стабилизирующего полиола – глицерина – в составе буфера с оптимальным для хранения значением pH и концентрацией NaCl недостаточно для решения поставленной задачи увеличения стабильности Lys394. Поэтому на следующем этапе исследования мы изучили возможность стабилизации Lys394 с помощью поликатионов.

9.2.4. Стабилизация Lys394 с помощью поликатионов

Помимо усиления внутримолекулярных гидрофобных взаимодействий подавить разворачивание глобулы фермента можно с использованием полиэлектролитов. При pH 8,0 молекула Lys394 заряжена отрицательно, так как экспериментально полученное значение pI для фермента 7,0, поэтому для стабилизации Lys394 были использованы поликатионы: поли-L-лизин (1–4 кДа) и поли-L-аргинин (5–15 кДа). pKa боковых заместителей лизина и аргинина составляют приблизительно 10,5 и 12,5 соответственно, что определяет их положительный

заряд при pH 8,0 и возможность электростатического притяжения с молекулой Lys394. Более длинные полилизины и полиаргинины неприменимы в нашем случае, так как ранее в этой работе было показано, что они вызывают агглютинацию клеток *E. coli*, увеличивая оптическую плотность клеточной суспензии и не позволяя достоверно регистрировать лизис клеток под действием Lys394.

Присутствие каждого из поликатионов в буферном растворе с ферментом приводило к увеличению его стабильности. Увеличение концентрации поликатиона в обоих случаях сопровождалось увеличением периода полуинактивации Lys394 вплоть до концентраций полиэлектролитов 80 мкг/мл, выше которой значение периода полуинактивации оставалось неизменным. Наиболее стабильным при 37 °С оказался препарат, содержащий 0,08 мг/мл поли-L-аргинина (5–15 кДа) (Рисунок 42). Период полуинактивации Lys394 в составе такого препарата составил 22 суток, что приблизительно в 6 раз превышает период полуинактивации Lys394 без добавок. При 20 °С в присутствии 0,08 мг/мл поли-L-аргинина исследуемый фермент сохраняет 75 % активности после инкубации в течение 50 суток.

В ходе работы для целей стабилизации фермента мы также протестировали действие блок-сополимеров Lys₁₀ЭГ₁₁₄ и Lys₃₀ЭГ₁₁₄. Их присутствие в составе буферного раствора с ферментом также приводило к замедлению процесса инактивации, однако эффект блоксополимеров оказался менее значительным (максимальное увеличение периода полуинактивации не более чем в 1,5–2 раза).

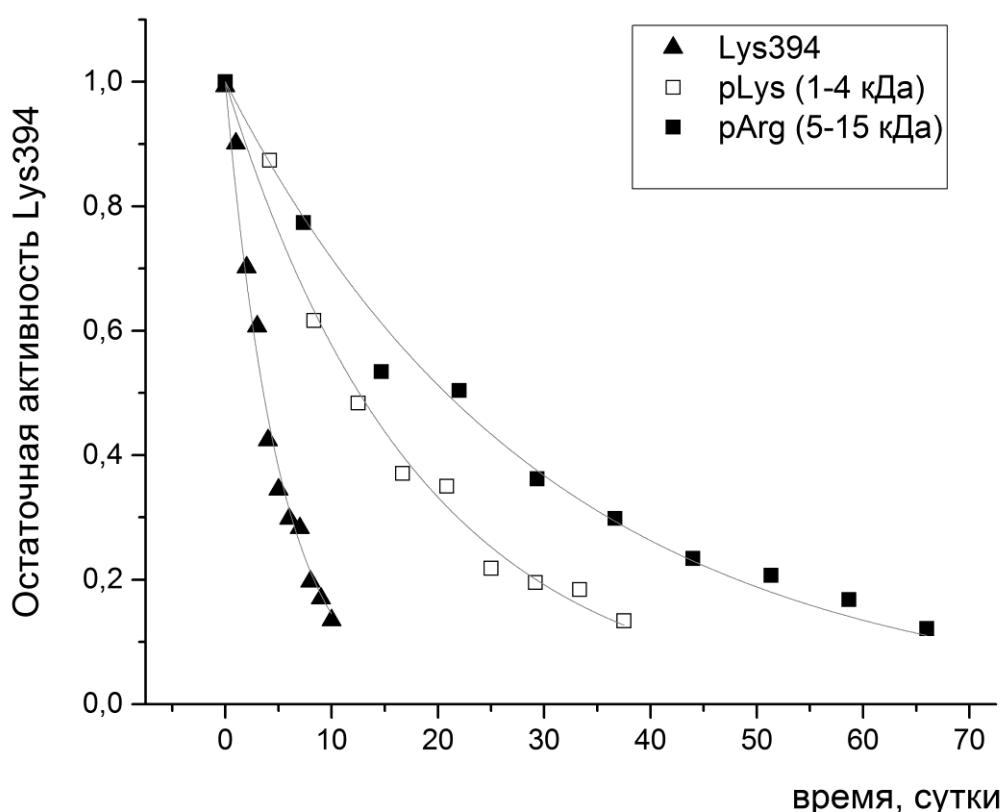


Рисунок 42. Влияние поликатионов в концентрации 80 мкг/мл на стабильность Lys394 при 37 °С. 20 мМ трис-HCl (pH 8,0) 150 мМ NaCl, конечная концентрация Lys394 0,5 мкг/мл.

9.2.5. Выбор оптимального сочетания эффекторов для стабилизации Lys394.

В ходе работы мы подобрали ряд стабилизаторов, использование которых по отдельности замедляло термоинактивацию фермента. Среди неорганических катионов максимальный стабилизационный эффект наблюдался в присутствии 0,5 мМ Ca²⁺, среди полиолов – в присутствии 50% глицерина, среди поликатионов – в присутствии 80 мкг/мл поли-L-аргинина (5–15 кДа). Логичным продолжением проведенной серии экспериментов стало тестирование совместного действия выбранных эффекторов и выбор их оптимального сочетания на основе времен полуинактивации Lys394 при +37 и при +20 °С. Для этого мы составили 4 композиции на основе выбранных стабилизаторов (3 композиции с попарными сочетаниями CaCl₂, поли-L-аргинина и глицерина и 4я композиция, включающая все эффекторы) и проверили их влияние на стабильность Lys394.

Исследование процесса термоинактивации Lys394 при 37 °С в составе каждой из смесей показало, что наименьшая скорость инактивации фермента наблюдались в двух случаях:

композиция, содержащая глицерин/полиаргинин/ Ca^{2+} и композиция глицерин/полиаргинин. По итогам эксперимента была выявлена следующая особенность: дополнительное внесение хлорида кальция в композицию, содержащую полиаргинин, не приводит к снижению скорости инактивации Lys394. Это видно по одинаковому периоду полуинактивации Lys394 в присутствии полиаргинина по сравнению с композицией полиаргинин/ Ca^{2+} , а также при сравнении композиций полиаргинин/глицерин/ Ca^{2+} и полиаргинин/глицерин. Однако эффекты каждого компонента по отдельности достоверно отличаются друг от друга. (Рисунок 43)

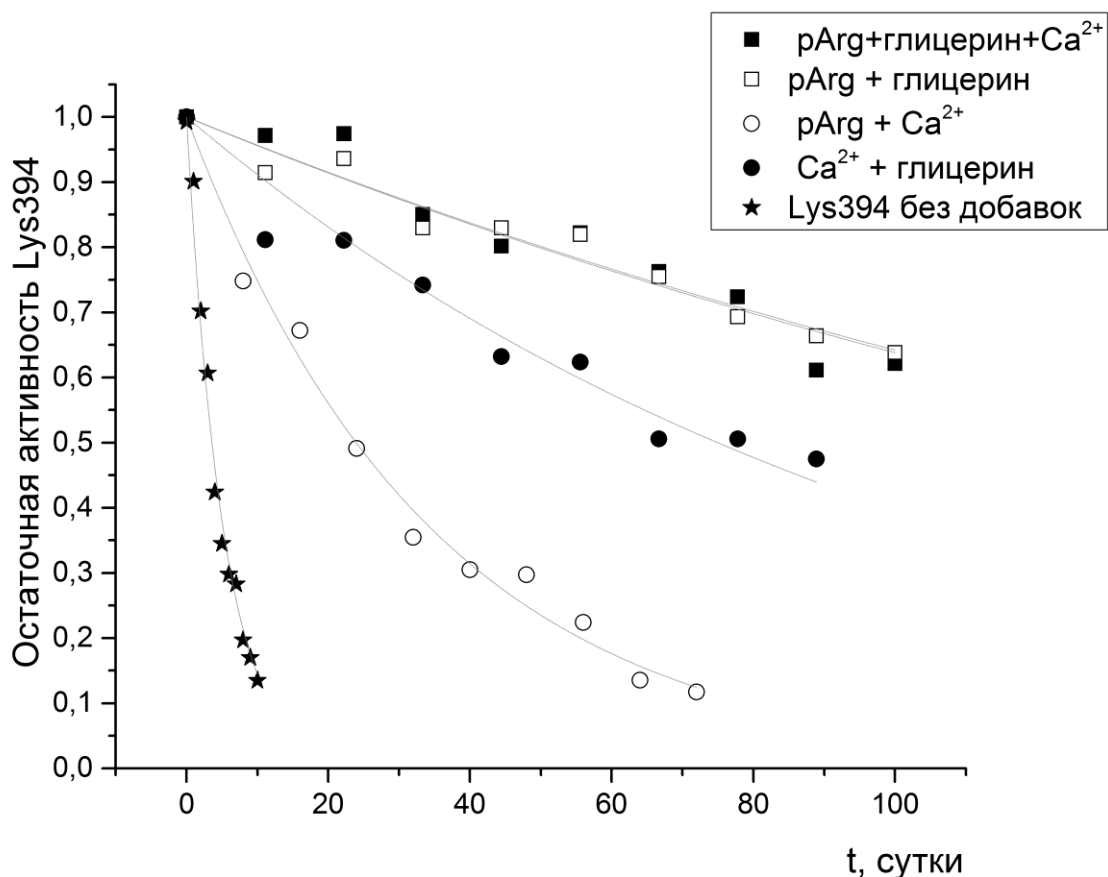


Рисунок 43. Термоинактивация Lys394 при 37 °C в составе композиций эффекторов: ■ – 80 мкг/мл полиаргинина (5–15 кДа), 50% глицерина, 0,5 мМ CaCl_2 ; □ – 80 мкг/мл поли-L-аргинина (5–15 кДа), 50% глицерина; ○ – 80 мкг/мл полиаргинина (5–15 кДа), 0,5 мМ CaCl_2 ; ● – 0,5 мМ CaCl_2 , 50% глицерина. 20 мМ трис-HCl (pH 8,0) 150 мМ NaCl, конечная концентрация Lys394 0,5 мкг/мл.

В присутствии наиболее оптимального сочетания стабилизаторов – полиаргинин/глицерин или полиаргинин/глицерин/ Ca^{2+} – Lys394 сохраняет около 60% активности спустя 100 дней инкубации при 37 °C, что соответствует приблизительно времени

полуинактивации равному 150 суткам. На данный момент после 4 месяцев инкубации при +20 °С оба препарата сохраняют более 90 % активности, что позволяет сделать предварительный вывод о том, что период их полуинактивации окажется более 18 месяцев с учетом протекания процесса согласно кинетике первого порядка.

ВЫВОДЫ

1. Клонирован ген эндолизина бактериофага S-394 и создан штамм-продуцент рекомбинантного фермента Lys394. Оптимизированы условия культивирования, выделения и очистки фермента до гомогенного состояния.

2. Изучены физико-химические свойства фермента Lys394. Показано, что активной формой является мономер массой 18 кДа со значением pI близким к 7. Обнаружено, что оптимальными условиями функционирования фермента являются pH 8,5 и низкая концентрация соли (0 – 150 мМ). Обнаружено, что ключевую роль для катализа играет катион Ca^{2+} или Mn^{2+} . Выявлена широкая субстратная специфичность Lys394 по отношению к пептидогликанам грамотрицательных микроорганизмов.

3. Подобраны агенты, обеспечивающие функционирование Lys394 на живых клетках *E. coli* лабораторного штамма CR63 в виде суспензии и газона. Обнаружено, что лизис суспензии клеток под действием Lys394 наиболее быстро протекает в присутствии 20 мкг/мл пептида PGLa или 25 мкг/мл полиаргинина фракции 5–15 кДа. Показано, что гибель > 99,99 % газонных клеток *E. coli* происходит под действием Lys394 в течение 10 минут в присутствии 0,05 мг/мл PGLa и 1 мМ ЭДТА.

4. На основе выявленных закономерностей термоинактивации Lys394 разработан способ стабилизации фермента. Показано, что в присутствии 50 % глицерина и 80 мкг/мл поли-L-аргинина фракции 5–15 кДа время полуинактивации Lys394 увеличивается с 3,5 до 150 суток при 37 °С. При 20 °С такой набор добавок позволяет сохранить 90 % активности в течение 4 месяцев инкубации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Покровский В.И. и др. Инфекционные болезни и эпидемиология. 2е изд. Москва: ГЭОТАР-медиа, 2007.
2. Diene S.M., Rolain J.-M. Investigation of antibiotic resistance in the genomic era of multidrug-resistant Gram-negative bacilli, especially Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2013. Vol. 11, № 3. P. 277–296.
3. Tumbarello M. et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. Vol. 51, № 6. P. 1987–1994.
4. Kumarasamy K.K. et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study // *Lancet Infect. Dis.* 2010. Vol. 10, № 9. P. 597–602.
5. Projan S.J. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? // *Curr. Opin. Microbiol.* 2003. Vol. 6, № 5. P. 427–430.
6. Мирошников К.А. и др. Пептидогликанлизирующие ферменты бактериофагов - перспективные противобактериальные агенты // *Успехи биологической химии.* 2006. Т. 46. С. 65–98.
7. Irshad Ul Haq Maha Nadeem Akhtar, Saadia Andleeb, Ishtiaq Qadri W.N.C. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review // *Virol. J.* 2012. Vol. 9, № 9.
8. William Wiley Navarre O.S. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. Vol. 63, № 1. P. 174–229.
9. Beveridge T.J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles // *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181, № 16. P. 4725–4733.
10. Vollmer W., Holtje J.-V. The Architecture of the Murein (Peptidoglycan) in Gram-Negative Bacteria : Vertical Scaffold or Horizontal Layer(s)? // *J. Bacteriol.* 2004. Vol. 186, № 18. P. 5978–5987.
11. Vollmer W. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. Vol. 32, № 2. P. 287–306.
12. Vollmer W., Blanot D., Miguel de P. Peptidoglycan structure and architecture // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. Vol. 32, № 2. P. 149–167.
13. Bellais S. et al. Aslfm, the D-aspartate ligase responsible for the addition of D-aspartic acid onto the peptidoglycan precursor of *Enterococcus faecium*. // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 17. P. 11586–11594.
14. Snowden M.A., Perkins H.R. Peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*. An apparent random polymerisation process. // *Eur. J. Biochem.* 1990. Vol. 191, № 2. P. 373–377.
15. Höltje J. V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998. Vol. 62, № 1. P. 181–203.
16. Glauner B., Höltje J. V. Growth pattern of the murein sacculus of *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265, № 31. P. 18988–18996.
17. Blasco B., Pisabarro A.G., de Pedro M.A. Peptidoglycan biosynthesis in stationary-phase cells of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1988. Vol. 170, № 11. P. 5224–5228.
18. Prats R., de Pedro M.A. Normal growth and division of *Escherichia coli* with a reduced amount of murein // *J. Bacteriol.* 1989. Vol. 171, № 7. P. 3740–3745.
19. Shen Y. et al. Phage-based Enzybiotics // *Bacteriophages Heal. Disease.* 1st ed. / ed. Hyman P., Abedon

- S. CABI, 2012. P. 217–239.
20. Pritchard D.G. et al. LambdaSa1 and LambdaSa2 prophage lysins of *Streptococcus agalactiae* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. Vol. 73, № 22. P. 7150–7154.
 21. Weaver L.H. et al. Comparison of goose-type, chicken-type, and phage-type lysozymes illustrates the changes that occur in both amino acid sequence and three-dimensional structure during evolution. // *J. Mol. Evol.* 1985. Vol. 21, № 2. P. 97–111.
 22. García J.L. et al. Cloning, purification, and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysin // *J. Virol.* 1987. Vol. 61, № 8. P. 2573–2580.
 23. Weaver L.H., Matthews B.W. Structure of bacteriophage T4 lysozyme refined at 1.7 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 1987. Vol. 193, № 1. P. 189–199.
 24. Paradis-Bleau C. et al. Peptidoglycan lytic activity of the *Pseudomonas aeruginosa* phage phiKZ gp144 lytic transglycosylase. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2007. Vol. 266, № 2. P. 201–209.
 25. Evrard C., Declercq J.P., Fastrez J. Crystallization and preliminary X-ray analysis of bacteriophage lambda lysozyme in which all tryptophans have been replaced by aza-tryptophans // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 1997. Vol. 53, № Pt 2. P. 217–219.
 26. Blake C.C. et al. Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1967. Vol. 167, № 9. P. 378–388.
 27. Phillips D.C. The Hen Egg-White Lysozyme Molecule // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1967. Vol. 57, № 3. P. 483–495.
 28. Hardy L.W., Poteete A.R. Reexamination of the role of Asp20 in catalysis by bacteriophage T4 lysozyme // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30, № 39. P. 9457–9463.
 29. Kuroki R., Weaver L.H., Matthews B.W. A covalent enzyme-substrate intermediate with saccharide distortion in a mutant T4 lysozyme // *Science.* 1993. Vol. 262, № 5142. P. 2030–2033.
 30. Hadfield A.T. et al. Crystal structure of the mutant D52S hen egg white lysozyme with an oligosaccharide product // *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 243, № 5. P. 856–872.
 31. Thunnissen A.M. et al. Structure of the 70-kDa soluble lytic transglycosylase complexed with bulgecin A. Implications for the enzymatic mechanism // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34, № 39. P. 12729–12737.
 32. Reid C.W. et al. Inhibition of membrane-bound lytic transglycosylase B by NAG-thiazoline // *FEBS Lett.* 2004. Vol. 574, № 1-3. P. 73–79.
 33. Thunnissen A.M. et al. Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X-ray crystallography // *Nature.* 1994. Vol. 367, № 6465. P. 750–753.
 34. Cheng X. et al. The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994. Vol. 91, № 9. P. 4034–4038.
 35. Korndörfer I.P. et al. Structural analysis of the L-alanoyl-D-glutamate endopeptidase domain of *Listeria* bacteriophage endolysin Ply500 reveals a new member of the LAS peptidase family. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2008. Vol. 64, № Pt 6. P. 644–650.
 36. Schmelcher M., Donovan D., Loessner M. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials // *Future Microbiol.* 2012. Vol. 7, № 10. P. 1147–1171.
 37. Nelson D.C. et al. Endolysins as antimicrobials // *Adv. Virus Res.* 2012. Vol. 83. P. 299–365.
 38. Loessner M.J. et al. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates // *Mol. Microbiol.* 2002. Vol. 44, № 2. P. 335–349.
 39. Briers Y. et al. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa*

- bacteriophages phiKZ and EL // *Mol. Microbiol.* 2007. Vol. 65, № 5. P. 1334–1344.
40. Schmelcher M. et al. Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. Vol. 76, № 17. P. 5745–5756.
 41. Briers Y. et al. The high-affinity peptidoglycan binding domain of *Pseudomonas* phage endolysin KZ144 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. Vol. 383, № 2. P. 187–191.
 42. Becker S.C. et al. Differentially conserved staphylococcal SH3b_5 cell wall binding domains confer increased staphylolytic and streptolytic activity to a streptococcal prophage endolysin domain. // *Gene.* 2009. Vol. 443, № 1-2. P. 32–41.
 43. O’Flaherty S. et al. The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *J. Bacteriol.* 2005. Vol. 187, № 20. P. 7161–7164.
 44. Juan A Hermoso Pedro Garcí’a J.L.G. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics // *Curr. Opin. Microbiol.* 2007. Vol. 10. P. 461–472.
 45. Nelson D. et al. PlyC: a multimeric bacteriophage lysin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. Vol. 103, № 28. P. 10765–10770.
 46. Fischetti V.A. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens // *Int. J. Med. Microbiol.* 2010. Vol. 300, № 6. P. 357–362.
 47. Entenza J.M. et al. Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. Vol. 49, № 11. P. 4789–4792.
 48. Loeffler J.M., Djurkovic S., Fischetti V.A. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia // *Infect. Immun.* 2003. Vol. 71, № 11. P. 6199–6204.
 49. Nelson D., Loomis L., Fischetti V.A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98, № 7. P. 4107–4112.
 50. Cheng Q. et al. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. Vol. 49, № 1. P. 111–117.
 51. Yoong P. et al. PlyPH, a bacteriolytic enzyme with a broad pH range of activity and lytic action against *Bacillus anthracis* // *J. Bacteriol.* 2006. Vol. 188, № 7. P. 2711–2714.
 52. Gu J. et al. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection // *J. Clin. Microbiol.* 2011. Vol. 49, № 1. P. 111–117.
 53. Mayer M.J. et al. Genomic sequence and characterization of the virulent bacteriophage phiCTP1 from *Clostridium tyrobutyricum* and heterologous expression of its endolysin // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. Vol. 76, № 16. P. 5415–5422.
 54. Callewaert L. et al. Food applications of bacterial cell wall hydrolases // *Curr. Opin. Biotechnol.* Elsevier Ltd, 2011. Vol. 22, № 2. P. 164–171.
 55. Sinigaglia M. et al. Use of active compounds for prolonging the shelf life of mozzarella cheese // *Int. Dairy J.* 2008. Vol. 18, № 6. P. 624–630.
 56. Mastromatteo M. et al. Use of lysozyme, nisin, and EDTA combined treatments for maintaining quality of packed ostrich patties // *J. Food Sci.* 2010. Vol. 75, № 3. P. M178–M186.
 57. During K. et al. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* // *Plant J.* 1993. Vol. 3, № 4. P. 587–598.

58. Oey M. et al. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic // *Plant J.* 2009. Vol. 57, № 3. P. 436–445.
59. Oldham E.R., Daley M.J. Lysostaphin: use of a recombinant bactericidal enzyme as a mastitis therapeutic // *J. Dairy Sci.* 1991. Vol. 74, № 12. P. 4175–4182.
60. Hoopes J.T. et al. Use of a bacteriophage lysin, PlyC, as an enzyme disinfectant against *Streptococcus equi* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75, № 5. P. 1388–1394.
61. Briers Y. et al. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. Vol. 58, № 7. P. 3774–3784.
62. Levashov P. et al. Quantitative turbidimetric assay of enzymatic gram-negative bacteria lysis. // *Anal. Chem.* 2010. Vol. 82, № 5. P. 2161–2163.
63. Birch-Andersen A., Maaloe O., Sjostrand F.S. High-resolution electron micrographs of sections of *E. coli* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1953. Vol. 12, № 3. P. 395–400.
64. Kellenberger E., Ryter A. Cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1958. Vol. 4, № 3. P. 323–326.
65. Murray R.G., Steed P., Elson H.E. The Location of the Mucopolysaccharide in Sections of the Cell Wall of *Escherichia coli* and Other Gram-Negative Bacteria // *Can. J. Microbiol.* 1965. Vol. 11. P. 547–560.
66. Nikaido H. Outer Membrane // *Escherichia coli Salmonella Cell. Mol. Biol.* 2nd Editio / ed. Neidhardt F.C. ASM Press, 1996. P. 29–47.
67. Smit J., Kamio Y., Nikaido H. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: chemical analysis and freeze-fracture studies with lipopolysaccharide mutants // *J. Bacteriol.* 1975. Vol. 124, № 2. P. 942–958.
68. Kadner R.J. Cytoplasmic membrane // *Escherichia coli Salmonella Cell. Mol. Biol.* 2nd ed. / ed. Neidhardt F.C. 1996. P. 58–87.
69. Raetz C.R.H. Bacterial Lipopolysaccharides: a Remarkable Family of Bioactive Macroamphiphiles // *Escherichia coli Salmonella Cell. Mol. Biol.* 2nd Editio. ASM Press, 1996. P. 1035–1063.
70. Raetz C.R. et al. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction // *FASEB J.* 1991. Vol. 5, № 12. P. 2652–2660.
71. Holst O. The structures of core regions from enterobacterial lipopolysaccharides - an update // *FEMS Microbiol. Lett.* 2007. Vol. 271, № 1. P. 3–11.
72. Holst O., Brade H. Isolation and identification of 3-deoxy-5-O-alpha-L-rhamnopyranosyl-D-manno-2-octulopyranosonate from the inner core region of the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* K-12 // *Carbohydr. Res.* 1990. Vol. 207, № 2. P. 327–331.
73. Holst O., Röhrscheidt-Andrzejewski E., Brade H. Isolation and characterisation of 3-deoxy-D-manno-2-octulopyranosonate 7-(2-aminoethyl phosphate) from the inner core region of *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella minnesota* lipopolysaccharides // *Carbohydr. Res.* 1990. Vol. 204. P. 93–102.
74. Schnaitman C.A., Klena J.D. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria // *Microbiol. Rev.* 1993. Vol. 57, № 3. P. 655–682.
75. Parker C.T. et al. Role of the *rfaG* and *rfaP* genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12 // *J. Bacteriol.* 1992. Vol. 174, № 8. P. 2525–2538.
76. de Cock H., Tommassen J. Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly-competent intermediate of outer-membrane protein PhoE of *E. coli* // *EMBO J.* 1996. Vol. 15, № 20. P. 5567–5573.
77. Reeves P. Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide // *Bact. Cell Wall New Compr. Biochem.* / ed. Ghuyssen J.-M., Hakenbeck R. Elsevier, 1994. Vol. 27. P. 281–317.

78. Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I.R. Structure and function of lipopolysaccharides // *Microbes Infect.* 2002. Vol. 4, № 8. P. 837–851.
79. Stevenson G. et al. Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its rfb gene cluster // *J. Bacteriol.* 1994. Vol. 176, № 13. P. 4144–4156.
80. Wang L. et al. Species-Wide Variation in the *Escherichia coli* Flagellin (H-Antigen) Gene // *J. Bacteriol.* 2003. Vol. 185, № 9. P. 2936–2943.
81. Rick P.D., Silver R.P. Enterobacterial Common Antigen And Capsular Polysaccharides // *Escherichia coli Salmonella Cell. Mol. Biol.* 2nd ed. / ed. Neidhardt F.C. ASM Press, 1996. P. 105–122.
82. Kunin C.M., Beard M. V., Halmagyi N.E. Evidence for a Common Hapten Associated with Endotoxin Fractions of *E. coli* and other Enterobacteriaceae. // *Exp. Biol. Med.* SAGE Publications, 1962. Vol. 111, № 1. P. 160–166.
83. Duda K.A. et al. ECA-immunogenicity of *Proteus mirabilis* strains. // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 2009. Vol. 57, № 2. P. 147–151.
84. Kuhn H. ECA, the enterobacterial common antigen // *FEMS Microbiol. Lett.* 1988. Vol. 54, № 3. P. 195–222.
85. Vinogradov E. V. et al. The structure of the cyclic enterobacterial common antigen (ECA) from *Yersinia pestis* // *Carbohydr. Res.* 1994. Vol. 258, № null. P. 223–232.
86. Dell A. et al. The enterobacterial common-antigen, a cyclic polysaccharide // *Carbohydr. Res.* 1984. Vol. 133, № 1. P. 95–104.
87. Rinno J., Golecki J.R., Mayer H. Localization of enterobacterial common antigen: immunogenic and nonimmunogenic enterobacterial common antigen-containing *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1980. Vol. 141, № 2. P. 814–821.
88. Acker G., Schmidt G., Mayer H. Accessibility of enterobacterial common antigen to antibodies in encapsulated and non-capsulated S and R forms of *Escherichia coli* // *J. Gen. Microbiol.* 1982. Vol. 128, № 7. P. 1577–1583.
89. Lugowski C., Romanowska E. Enterobacterial Common Antigen: Isolation from *Shigella sonnei*, Purification and Immunochemical Characterization // *Eur. J. Biochem.* 1978. Vol. 91, № 1. P. 89–97.
90. Whitfield C., Valvano M.A. Biosynthesis and Expression of Cell-Surface Polysaccharides in Gram-Negative Bacteria // *Adv. Microb. Physiol.* 1993. Vol. 35. P. 135–246.
91. Orskov F., Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli* // *Methods Mol. Biol.* / ed. Microbiology T.B.B.T.-M. in. Academic Press, 1984. Vol. Volume 14. P. 43–112.
92. Jann K., Jann B. Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance // *Can. J. Microbiol.* 1992. Vol. 38, № 7. P. 705–710.
93. Jann B., Jann K. Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli* // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1990. Vol. 150. P. 19–42.
94. Bortolussi R., Ferrieri P., Quie P.G. Influence of growth temperature of *Escherichia coli* on K1 capsular antigen production and resistance to opsonization // *Infect. Immun.* 1983. Vol. 39, № 3. P. 1136–1141.
95. Schmidt M.A., Jann K. Phospholipid substitution of capsular (K) polysaccharide antigens from *Escherichia coli* causing extraintestinal infections // *FEMS Microbiol. Lett.* Blackwell Publishing Ltd, 1982. Vol. 14, № 1. P. 69–74.
96. Lugtenberg B. et al. Electrophoretic resolution of the “major outer membrane protein” of *Escherichia coli* K12 into four bands // *FEBS Lett.* 1975. Vol. 58, № 1. P. 254–258.
97. Braun V., Rehn K. Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-

- lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. // *Eur. J. Biochem.* 1969. Vol. 10, № 3. P. 426–438.
98. Hirota Y. et al. On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a mutant of *E. coli* lacking a murein-lipoprotein. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977. Vol. 74, № 4. P. 1417–1420.
 99. Nikaido H., Rosenberg E.Y., Foulds J. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 153, № 1. P. 232–240.
 100. Korteland J., De Graaff P., Lugtenberg B. PhoE protein pores in the outer membrane of *Escherichia coli* K-12 not only have a preference for Pi and Pi-containing solutes but are general anion-preferring channels // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1984. Vol. 778, № 2. P. 311–316.
 101. Postle K. TonB protein and energy transduction between membranes // *J. Bioenerg. Biomembr.* Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 1993. Vol. 25, № 6. P. 591–601.
 102. Bradbeer C. The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1993. Vol. 175, № 10. P. 3146–3150.
 103. Pugsley A.P. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. // *Microbiol. Rev.* 1993. Vol. 57, № 1. P. 50–108.
 104. Wandersman C., Delepelaire P. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990. Vol. 87, № 12. P. 4776–4780.
 105. Webster R.E. The tol gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.* 1991. Vol. 5, № 5. P. 1005–1011.
 106. Dodson K.W. et al. Outer-membrane PapC molecular usher discriminately recognizes periplasmic chaperone-pilus subunit complexes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993. Vol. 90, № 8. P. 3670–3674.
 107. Kamio Y., Nikaido H. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase C and cyanogen bromide activated dextran in the external medium // *Biochemistry.* American Chemical Society, 1976. Vol. 15, № 12. P. 2561–2570.
 108. Muhldardt P.F., Golecki J.R. Asymmetrical Distribution and Artfactual Reorientation of Lipopolysaccharide in the Outer Membrane Bilayer of *Salmonella typhimurium* // *Eur. J. Biochem.* 1975. Vol. 51, № 2. P. 343–352.
 109. Paul S. et al. Presence of exposed phospholipids in the outer membrane of *Vibrio cholerae* // *J. Gen. Microbiol.* 1992. Vol. 138, № 4. P. 755–761.
 110. Takeuchi Y., Nikaido H. Persistence of segregated phospholipid domains in phospholipid--lipopolysaccharide mixed bilayers: studies with spin-labeled phospholipids // *Biochemistry.* 1981. Vol. 20, № 3. P. 523–529.
 111. Labischinski H. et al. Comparative X-ray and Fourier-transform-infrared investigations of conformational properties of bacterial and synthetic lipid A of *Escherichia coli* and *Salmonella minnesota* as well as partial structures and analogues thereof // *Eur. J. Biochem.* 1989. Vol. 179, № 3. P. 659–665.
 112. Ueki T., Mitsui T., Nikaido H. X-ray diffraction studies of outer membranes of *Salmonella typhimurium* // *J. Biochem.* 1979. Vol. 85, № 1. P. 173–182.
 113. Vaara M., Plachy W.Z., Nikaido H. Partitioning of hydrophobic probes into lipopolysaccharide bilayers // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1990. Vol. 1024, № 1. P. 152–158.
 114. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003. Vol. 67, № 4. P. 593–656.
 115. Dinh T., Paulsen I.T., Saier M.H. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria // *J. Bacteriol.* 1994. Vol. 176, № 13. P. 3825–3831.

116. Leive L. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *E. coli* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1965. Vol. 21, № 4. P. 290–296.
117. Plésiat P., Nikaido H. Outer membranes of gram-negative bacteria are permeable to steroid probes // *Mol. Microbiol.* 1992. Vol. 6, № 10. P. 1323–1333.
118. Nikaido H. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1976. Vol. 433, № 1. P. 118–132.
119. Vaara M. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane // *Microbiol. Rev.* 1992. Vol. 56, № 3. P. 395–411.
120. Warren G.H., Gray J., Yurchenco J.A. Effect of polymyxin on the lysis of *Neisseria catarrhalis* by lysozyme // *J. Bacteriol.* 1957. Vol. 74, № 6. P. 788–793.
121. Bebrone C. et al. CENTA as a chromogenic substrate for studying beta-lactamases. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. Vol. 45, № 6. P. 1868–1871.
122. Gilleland H.E., Murray R.G. Ultrastructural study of polymyxin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Bacteriol.* 1976. Vol. 125, № 1. P. 267–281.
123. Rosenthal K.S., Storm D.R. Disruption of the *Escherichia coli* outer membrane permeability barrier by immobilized polymyxin B // *J. Antibiot. (Tokyo).* 1977. Vol. 30, № 12. P. 1087–1092.
124. Storm D., Rosenthal K., Swanson P. Polymyxin and related peptide antibiotics // *Annu. Rev. Biochem.* 1977. Vol. 46. P. 723–763.
125. Vaara M., Vaara T. Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics // *Antimicrobial Agents Chemother.* 1983. Vol. 24, № 1. P. 107–113.
126. Kimura Y., Matsunaga H., Vaara M. Polymyxin B octapeptide and polymyxin B heptapeptide are potent outer membrane permeability-increasing agents. // *J. Antibiot. (Tokyo).* 1992. Vol. 45, № 5. P. 742–749.
127. Viljanen P. et al. The outer membrane permeability-increasing action of deacylpolymyxins. // *J. Antibiot. (Tokyo).* 1991. Vol. 44, № 5. P. 517–523.
128. Ito-Kagawa M., Koyama Y. Studies on the selectivity of action of colistin, colistin nonapeptide and colistin heptapeptide on the cell envelope of *Escherichia coli* // *J. Antibiot. (Tokyo).* 1984. Vol. 37, № 8. P. 926–928.
129. Vaara M. The outer membrane permeability-increasing action of linear analogues of polymyxin B nonapeptide // *Drugs Exp. Clin. Res.* 1991. Vol. 17, № 9. P. 437–443.
130. Dixon R.A., Chopra I. Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986. Vol. 29, № 5. P. 781–788.
131. Vaara M. The effect of oligolysines Lys-3, Lys-4, and Lys-5 on the outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa*. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1990. Vol. 67, № 1-2. P. 15–20.
132. Vaara M., Vaara T. Polycations as Outer Membrane-Disorganizing Agents // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983. Vol. 24, № 1. P. 114–122.
133. Helander Ilkka M. et al. Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria // *Microbiology.* 1997. Vol. 143. P. 3193–3199.
134. Hancock R.E., Wong P.G. Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984. Vol. 26, № 1. P. 48–52.
135. Seltmann G., Wolter E.J. Effect of nourseothricin (streptothricin) on the outer membrane of sensitive and resistant *Escherichia coli* strains // *J. Basic Microbiol.* 1987. Vol. 27, № 3. P. 139–146.
136. Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action // *Trends Biotechnol.* 2011. Vol. 29, № 9. P. 464–472.

137. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms // *Nature*. 2002. Vol. 415. P. 389–395.
138. Wu M. et al. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* // *Biochemistry*. 1999. Vol. 38, № 22. P. 7235–7242.
139. Hallock K.J., Lee D.-K., Ramamoorthy A. MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain // *Biophys. J.* 2003. Vol. 84, № 5. P. 3052–3060.
140. Wildman K.A.H., Lee D.-K., Ramamoorthy A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37 // *Biochemistry*. 2003. Vol. 42, № 21. P. 6545–6558.
141. Yang L. et al. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores // *Biophys. J.* 2001. Vol. 81, № 3. P. 1475–1485.
142. Shai Y., Oren Z. From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell selective antimicrobial peptides // *Peptides*. 2001. Vol. 22. P. 1629–1641.
143. Shai Y., Bach D., Yanovsky A. Channel formation properties of synthetic pardaxin and analogues // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265, № 33. P. 20202–20209.
144. Rizzo V., Stankowski S., Schwarz G. Alamethicin incorporation in lipid bilayers: a thermodynamic study // *Biochemistry*. 1987. Vol. 26, № 10. P. 2751–2759.
145. Pouny Y. et al. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes // *Biochemistry*. 1992. Vol. 31, № 49. P. 12416–12423.
146. Gazit E. et al. Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study // *Biochemistry*. 1994. Vol. 33, № 35. P. 10681–10692.
147. da Silva A., Teschke O. Effects of the antimicrobial peptide PGLa on live *Escherichia coli* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2003. Vol. 1643, № 1-3. P. 95–103.
148. Giacometti A. et al. Combination studies between polycationic peptides and clinically used antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria // *Peptides*. 2000. Vol. 21, № 8. P. 1155–1160.
149. Hao Q. et al. Effective antimicrobial activity of Cbf-K16 and Cbf-A7 A13 against NDM-1-carrying *Escherichia coli* by DNA binding after penetrating the cytoplasmic membrane in vitro. // *J. Pept. Sci.* 2013. Vol. 19, № 3. P. 173–180.
150. Hartmann M. et al. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. Vol. 54, № 8. P. 3132–3142.
151. Giacometti A. et al. Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* // *Peptides*. 2003. Vol. 24, № 9. P. 1315–1318.
152. Hancock R. Peptide antibiotics // *Lancet*. 1997. Vol. 349, № 9049. P. 418–422.
153. Guilhelmelli F. et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. // *Front. Microbiol.* 2013. Vol. 4. P. 353.
154. Andrä J. et al. Rationale for the design of shortened derivatives of the NK-lysin-derived antimicrobial peptide NK-2 with improved activity against Gram-negative pathogens // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 20. P. 14719–14728.
155. Vaara M. Increased outer membrane resistance to ethylenediaminetetraacetate and cations in novel lipid A mutants // *J. Bacteriol.* 1981. Vol. 148, № 2. P. 426–434.
156. Chi E.Y. et al. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in

- nonnative protein aggregation // *Pharm. Res.* 2003. Vol. 20, № 9. P. 1325–1336.
157. Mozhaev V.V., Martinek K. Inactivation and reactivation of proteins (enzymes) // *Enzyme Microb. Technol.* 1982. Vol. 4, № 5. P. 299–309.
158. Березин И.В., Матинек К. Введение в прикладную энзимологию. Мир, 1982.
159. Mozhaev V. V. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization // *Trends Biotechnol.* 1993. Vol. 11, № 3. P. 88–95.
160. Sadana A. Enzyme deactivation // *Biotechnol. Adv.* 1988. Vol. 6, № 3. P. 349–446.
161. Березин И.В., Мартинек К. Стабилизация ферментов — ключевой фактор при внедрении биокатализа в практику // *Успехи химии.* 1980. Т. 49, № 5. С. 737–770.
162. Bommarius A.S., Paye M.F. Stabilizing biocatalysts // *Chem. Soc. Rev.* 2013. Vol. 42, № 15. P. 6534–6565.
163. Iyer P. V., Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment // *Process Biochem.* 2008. Vol. 43, № 10. P. 1019–1032.
164. Zeng J. et al. Effects of Metal Ions on Stability and Activity of Hyperthermophilic Pyrolysins and Further Stabilization of this Enzyme by Modification of a Ca²⁺-binding site // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014.
165. Harada M. et al. Divalent metal ion requirements of a thermostable multimetal beta-galactosidase from *Saccharopolyspora rectivirgula*. // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269, № 35. P. 22021–22026.
166. Rose G.D. et al. A backbone-based theory of protein folding // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. Vol. 103, № 45. P. 16623–16633.
167. Liu Y., Bolen D.W. The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34, № 39. P. 12884–12891.
168. Wang A., Bolen D.W. A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36, № 30. P. 9101–9108.
169. Paul S., Patey G.N. Structure and interaction in aqueous urea-trimethylamine-N-oxide solutions. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. Vol. 129, № 14. P. 4476–4482.
170. Timasheff S.N. Water as ligand: preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. // *Biochemistry.* 1992. Vol. 31, № 41. P. 9857–9864.
171. Bolen D.W. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. // *Methods.* 2004. Vol. 34, № 3. P. 312–322.
172. Canchi D.R. et al. Molecular mechanism for the preferential exclusion of TMAO from protein surfaces // *J. Phys. Chem. B.* 2012. Vol. 116, № 40. P. 12095–12104.
173. Chaniotakis N.A. Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. Vol. 378, № 1. P. 89–95.
174. Rand R.P. et al. Measured change in protein solvation with substrate binding and turnover // *Biochemistry.* 1993. Vol. 32, № 23. P. 5925–5929.
175. Kayitmazer A.B. et al. Protein–polyelectrolyte interactions // *Soft Matter.* 2013. Vol. 9, № 9. P. 2553–2583.
176. Веселова И.А., Кирейко А.В., Шеховцова Т.Н. Повышение каталитической активности и стабильности пероксидазы хрена за счет включения её в полиэлектролитный комплекс с хитозаном // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2009. Т. 45, № 2. С. 143–148.
177. Shipovskov S., Levashov A. Tyrosinase: polybrene noncovalent complexes in water-ethanol mixtures. // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. Vol. 84, № 2. P. 258–263.

178. Угарова Н.Н., Кутузова Г.Д. Итоги науки и техники. Биотехнология. Том 5. // Итоги науки и техники. Биотехнология / ed. Овчинников Ю.А. Москва: ВИНТИ, 1986. С 5- 45.
179. Xue Y. et al. Chemical modification of stem bromelain with anhydride groups to enhance its stability and catalytic activity // *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2010. Vol. 63, № 3-4. P. 188–193.
180. Hassani L. et al. Horseradish peroxidase thermostabilization: The combinatorial effects of the surface modification and the polyols // *Enzyme Microb. Technol.* 2006. Vol. 38, № 1-2. P. 118–125.
181. Wong S.S., Wong L.-J.C. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes // *Enzyme Microb. Technol.* 1992. Vol. 14, № 11. P. 866–874.
182. Cowan D.A., Fernandez-Lafuente R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. // *Enzyme Microb. Technol.* 2011. Vol. 49, № 4. P. 326–346.
183. Piller K., Daniel R.M., Petach H.H. Properties and stabilization of an extracellular alpha-glucosidase from the extremely thermophilic archaeobacteria *Thermococcus* strain AN1: enzyme activity at 130 degrees C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. Vol. 1292, № 1. P. 197–205.
184. Cheon Y.-H., Kim G.-J., Kim H.-S. Stabilization of d-hydantoinase by intersubunit cross-linking // *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2000. Vol. 11, № 1. P. 29–35.
185. Bolivar J.M. et al. Coating of soluble and immobilized enzymes with ionic polymers: full stabilization of the quaternary structure of multimeric enzymes // *Biomacromolecules.* 2009. Vol. 10, № 4. P. 742–747.
186. Wilson L. et al. Cross-linked aggregates of multimeric enzymes: a simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure // *Biomacromolecules.* 2004. Vol. 5, № 3. P. 814–817.
187. Березин И.В. et al. Иммуобилизованные ферменты. Москва: “Высшая школа,” 1987.
188. Hanefeld U., Gardossi L., Magner E. Understanding enzyme immobilisation. // *Chem. Soc. Rev.* 2009. Vol. 38, № 2. P. 453–468.
189. Hernandez K., Garcia-Galan C., Fernandez-Lafuente R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. // *Enzyme Microb. Technol.* 2011. Vol. 49, № 1. P. 72–78.
190. Garcia-Galan C. et al. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance // *Adv. Synth. Catal.* 2011. Vol. 353, № 16. P. 2885–2904.
191. Palomo J.M. et al. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases // *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2002. Vol. 19-20. P. 279–286.
192. Nguyen D.T. et al. Stabilization of Creatine Kinase Encapsulated in Silicate Sol-Gel Materials and Unusual Temperature Effects on Its Activity // *Chem. Mater.* 2002. Vol. 14, № 10. P. 4300–4306.
193. Yoshimoto M. et al. Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver catalase through encapsulation in liposomes // *Enzyme Microb. Technol.* 2007. Vol. 41, № 6-7. P. 849–858.
194. Basso A. et al. In Silico Analysis of Enzyme Surface and Glycosylation Effect as a Tool for Efficient Covalent Immobilisation of CalB and PGA on Sepabeads® // *Adv. Synth. Catal.* 2007. Vol. 349, № 6. P. 877–886.
195. Глик Б., Пастернак Д. Молекулярная биотехнология. Принципы и применения. Москва: Мир, 2002. С. 168-175
196. Bornscheuer U.T., Pohl M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001. Vol. 5, № 2. P. 137–143.
197. Colletier J.-P. et al. Sampling the conformational energy landscape of a hyperthermophilic protein by engineering key substitutions // *Mol. Biol. Evol.* 2012. Vol. 29, № 6. P. 1683–1694.

198. Opperman D.J., Reetz M.T. Towards practical Baeyer-Villiger-monooxygenases: design of cyclohexanone monooxygenase mutants with enhanced oxidative stability // *Chembiochem*. 2010. Vol. 11, № 18. P. 2589–2596.
199. Jäckel C., Kast P., Hilvert D. Protein design by directed evolution. // *Annu. Rev. Biophys.* 2008. Vol. 37. P. 153–173.
200. Koksharov M.I., Ugarova N.N. Thermostabilization of firefly luciferase by in vivo directed evolution // *Protein Eng. Des. Sel.* 2011. Vol. 24, № 11. P. 835–844.
201. O’Fágáin C. Engineering protein stability // *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 681. P. 103–136.
202. Cheng J., Randall A., Baldi P. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines // *Proteins*. 2006. Vol. 62, № 4. P. 1125–1132.
203. Bordner A.J., Abagyan R.A. Large-scale prediction of protein geometry and stability changes for arbitrary single point mutations. // *Proteins*. 2004. Vol. 57, № 2. P. 400–413.
204. Gao D. et al. Thermostable variants of cocaine esterase for long-time protection against cocaine toxicity // *Mol. Pharmacol.* 2009. Vol. 75, № 2. P. 318–323.
205. Левашов П.А. и др. Способ получения ферментов фага SPZ7: патент. RU2460537. РФ, 2009.
206. Sambrook J Maniatis T F.E.F. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
207. Briers Y. et al. A standardized approach for accurate quantification of murein hydrolase activity in high-throughput assays // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2007. Vol. 70, № 3. P. 531–533.
208. Kropinski A.M., Prangishvili D., Lavigne R. Position paper: the creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of Bacteria and Archaea // *Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 11, № 11. P. 2775–2777.
209. Pugachev V. et al. Strain of Salmonella typhimurium bacteriophage S-394, possessing lytic activity: pat. 2412243 USA. Russia, 2009.
210. Mikoulinskaia G. et al. Identification and characterization of the metal ion-dependent L-alanoyl-D-glutamate peptidase encoded by bacteriophage T5 // *FEBS J.* 2009. Vol. 276. P. 7329–7342.
211. Hong J. et al. Identification of host receptor and receptor-binding module of a newly sequenced T5-like phage EPS7 // *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. Vol. 289. P. 202–209.
212. Niu Y.D. et al. Genomic, proteomic and physiological characterization of a T5-like bacteriophage for control of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7. // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 4. P. e34585.
213. Ryu M.K.S. Characterization of a T5-Like Coliphage, SPC35, and Differential Development of Resistance to SPC35 in Salmonella enterica Serovar Typhimurium and Escherichia coli // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. Vol. 77, № 6. P. 2042–2050.
214. Loessner M.J., Wendlinger G., Scherer S. Heterogeneous endolysins in Listeria monocytogenes bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes // *Mol. Microbiol.* 1995. Vol. 16, № 6. P. 1231–1241.
215. Fukushima T. et al. Characterization of new L,D-endopeptidase gene product CwlK (previous YcdD) that hydrolyzes peptidoglycan in Bacillus subtilis // *Mol. Genet. Genomics*. 2007. Vol. 278, № 4. P. 371–383.
216. Young R.Y. Bacteriophage Lysis: Mechanism and Regulation // *Microbiol. Rev.* 1992. Vol. 56, № 3. P. 430–481.
217. Briers Y., Walmagh M., Lavigne R. Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against Pseudomonas aeruginosa // *J. Appl. Microbiol.* 2011. Vol. 110, № 3. P. 778–785.
218. Dumon-Seignovert L., Cariot G., Vuillard L. The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a

- comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). // *Protein Expr. Purif.* 2004. Vol. 37, № 1. P. 203–206.
219. Goto Y. et al. Asparatic acid 221 is critical in the calcium-induced modulation of the enzymatic activity of human aminopeptidase A // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 51. P. 37074–37081.
220. Mendez-Samperio P. Peptidomimetics as a new generation of antimicrobial agents: current progress // *Infect. Drug Resist.* 2014. P. 229.
221. Hu Y. et al. Dye adsorption by resins: Effect of ionic strength on hydrophobic and electrostatic interactions // *Chem. Eng. J.* 2013. Vol. 228. P. 392–397.
222. Метелица Д.И., Еремин А.Н. Кинетические аспекты необратимой термической инактивации ферментов // *Успехи химии.* 1987. Т. 56, № 11. С. 1921–1948.