

УДК 577.152.3:579.234

## ОСОБЕННОСТИ ИНАКТИВАЦИИ И СТАБИЛИЗАЦИЯ ПРИ ПОМОЩИ НАЛОЖЕНИЯ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫХ ХИМИЧЕСКИХ СШИВОК PlyC – ФЕРМЕНТА, ЛИЗИРУЮЩЕГО КЛЕТКИ СТРЕПТОКОККОВ ГРУПП А, С И Е

Л.Ю. Филатова, Н.Л. Клячко

(кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ; e-mail: lubfil@rambler.ru)

Проведено исследование кинетики термоинактивации PlyC-лизина – фермента, лизирующего клетки стрептококков групп А, С и Е. Показано, что в интервале температур 37–41,5°C, pH 6–8, концентрациях фермента 0,3–160 мкг/мл олигомерный PlyC инактивируется по диссоциативному механизму, при более высоких (42–50°C) или низких (35–22°C) температурах – по мономолекулярному механизму. Предложен эффективный способ стабилизации PlyC при помощи наложения внутримолекулярных химических сшивок.

**Ключевые слова:** ферменты бактериофагов, PlyC-лизин, стрептококковые инфекции, фермент, лизирующий клетки стрептококков, стабильность и стабилизация.

### Введение

В настоящее время существует много проблем, связанных с лечением заболеваний, вызываемых одними из наиболее опасных патогенов – стрептококками.

С середины 80-х годов прошлого века отмечен рост количества заболеваний, вызываемых стрептококками. После очередного “затишья” 1950–1980 гг. во многих странах мира вновь стали регистрировать случаи тяжелых инфекционных форм, часто заканчивающихся летально (синдром токсического шока, септицемия, некротический миозит, фасцит и т.д.). В Англии и Уэльсе в 1994–1997 гг. зарегистрировано 1913 случаев тяжелых инфекций, вызванных стрептококками группы А. При этом 508 заболевших (27%) погибли [1]. В США ежегодно регистрируют 10–15 тысяч случаев инвазивных стрептококковых инфекций. За последние годы также отмечен рост заболеваемости ревматизмом, зарегистрированы даже вспышки этого заболевания: в Индии заболеваемость ревматизмом составляет 11 больных на 1000 человек населения. В России ежегодно болезни стрептококковой этиологии поражают 2–3 млн человек, 10% случаев имеют летальный исход [2, 3].

Традиционные методы лечения стрептококковых и стафилококковых инфекций предполагают активное использование антибиотиков, однако широкое применение антибиотиков приводит к стремительному росту числа новых бактериальных штаммов, устойчивых к ним. Так, в настоящее время 29,7%

штаммов *Streptococcus pyogenes* устойчивы к эритромицину [3].

Бактериофаги – вирусы бактерий, продуцирующие в процессе жизненного цикла ферменты, которые способны разрушать бактериальные клетки и могут рассматриваться в качестве серьезной альтернативы антибиотикам. В литературе эти ферменты получили название “лизины” или “лизоцимы” [3, 4, 5–7]. Использование ферментов бактериофагов представляется более удобным и предпочтительным по сравнению с применением живых фагов [8–13].

Изучаемый в данной работе фермент PlyC способен эффективно лизировать клетки стрептококков групп А, С и Е [13–16]. Этот фермент имеет перспективы для применения в качестве средств гигиены полости рта (лечение ангин, тонзиллитов), средств для внутреннего введения на ранних и поздних стадиях развития инфекций, средств для лечения заболеваний кожных покровов (рожа, фурункулы, нагноения).

Основной проблемой, ограничивающей использование в медицине рассматриваемого фермента, является недостаток сведений о нем как о биокатализаторе, его низкая стабильность при хранении и отсутствие данных о его механизмах инактивации.

Цель настоящей работы – изучение механизма инактивации и стабилизация бактериолитического фермента PlyC для создания в будущем лекарственных препаратов нового поколения для лечения инфекций, вызываемых стрептококком групп А, С и Е.

## Материалы и методы

### Используемые химические реактивы

Рекомбинантный фермент, лизирующий клетки стрептококков (PlyC-лизин) в виде водного раствора (20 мМ калий-фосфатный буфер с pH 6,3) в концентрации 14 и 8 мг/мл любезно предоставлен компанией "New Horizons Diagnostics Columbia MD" (США).

Препарат обработанных рифампицином лиофилизированных клеток *Streptococcus pyogenes* (штамм D-28/11 N62/59, Пражская коллекция, клетки М 29) был любезно предоставлен канд. биол. наук Н.Ф. Дмитриевой и канд. мед. наук А.С. Ещиной, сотр. медико-профилактического факультета Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова. Все остальные реагенты марки "Ultra pure" изготовлены фирмой "Sigma" (США).

### Измерение активности фермента

Активность фермента определяли при помощи метода турбидиметрии по изменению мутности суспензий клеток *Streptococcus pyogenes* во времени.

В буфере, содержащем 20 мМ фосфата калия с pH 6,3, готовили суспензию клеток *S. pyogenes* таким образом, чтобы оптическая плотность полученного раствора была равной 0,3 ед. погл. (единица поглощения) при длине волны 600 нм. К 0,5 мл суспензии клеток добавляли 3–50 мкл раствора фермента PlyC концентрацией 3–160 мкг/мл.

Измерение изменения оптической плотности во времени проводили на спектрофотометре "Ultraspec 2100-pro" с термостатируемым кюветным отделением при температуре 37°C и длине волны 600 нм.

Из прямолинейных начальных участков кинетических кривых в координатах оптическая плотность ( $A_{600}$ )–время (с), определяли начальные скорости реакций, которые характеризовали каталитическую активность фермента. На рис. 1 показан метод определения скорости реакции на примере лизиса клеток *S. pyogenes* ферментом PlyC.

Следует отметить, что субстратом для фермента служит компонент клеточной стенки стрептококка – пептидогликан, концентрацию которого спектрофотометрически определить невозможно. В связи с этим концентрацию субстрата выражали в единицах поглощения, характеризующих мутность суспензий клеток, а скорость реакции определяли как изменение оптической плотности в единицу времени и выражали в ед. погл./с или ед. погл./(с·мкг).

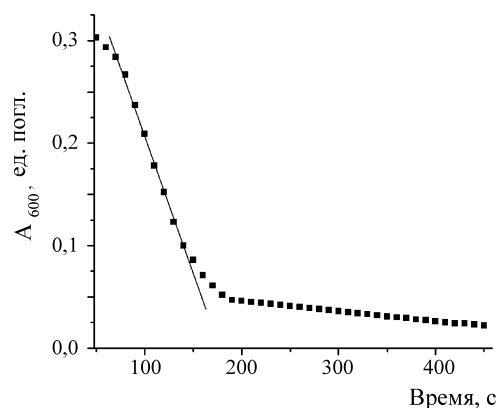


Рис. 1. Типичная кинетическая кривая зависимости мутности суспензии клеток *S. pyogenes* от времени с описанием метода определения скорости реакции по тангенсу угла наклона начального участка. Условия эксперимента: клетки суспендированы в 20 мМ калий-фосфатном буфере с pH 6,3; 37°C,  $A_{600} = 0,3$  ед. погл., концентрация фермента 0,08 мкг/мл

### Изучение температурной зависимости инактивации PlyC

Для исследования влияния температуры на стабильность PlyC растворы фермента концентрацией 3–160 мкг/мл с pH 6–8 инкубировали при 22–50°C выбранные промежутки времени, затем отбирали аликвоты по 3–50 мкл для измерения активности в стандартных условиях, как описано выше. Для поддержания pH использовали калий-фосфатный буфер.

### Наложение внутримолекулярных сшивок на молекулу PlyC

К 3 мл исходного раствора PlyC (8 мг/мл) приливали 3 мл раствора BS<sup>3</sup> (25–100-кратный избыток по молям по отношению к белку) в 20 мМ калий-фосфатном буфере с pH 7,5.

К 3 мл исходного раствора фермента (8 мг/мл) приливали 12 мл раствора глутарового альдегида концентрацией 0,0006–0,0033 М (50–200-кратный избыток по молям по отношению к белку) в 20 мМ калий-фосфатном буфере с pH 7,5 или 6,3. К реакционной смеси добавляли 1 мл раствора цианборгидрида натрия концентрацией 10 мг/мл в 20 мМ калий-фосфатном буфере с pH 7,5 или 6,3.

Все реакционные смеси выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре или сутки при +4°C. Процесс сшивания контролировали при помощи электрофореза по методу Лемли [18]. Сшитый PlyC очищали от низкомолекулярных примесей путем гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-25, разбавляли

20 мМ калий-фосфатным буфером с рН 6,3 до концентрации 3–160 мкг/мл и измеряли активность в стандартных условиях (см. выше).

Далее образцы растворов сшитого фермента (0,3–160 мкг/мл; рН 6,3) инкубировали при 22 и 37°C в течение выбранных промежутков времени, отбирали аликвоты фиксированного объема и измеряли активность в стандартных условиях (см. выше).

### Седиментационный анализ

Скоростное ультрацентрифугирование (седиментацию) растворов PlyC (160 мкг/мл; рН 6,3) проводили в аналитической ультрацентрифуге, снабженной абсорбционной сканирующей системой (49 000 об/мин, 22°C). Коэффициенты седиментации рассчитывали с поправкой на вязкость и плотность растворов. Седиментационный анализ проводили для растворов неинaktivированного и полностью инаktivированного при температуре 37°C фермента.

### Результаты и обсуждение

В 1957 г. двумя учеными (Кларк и Эванс) было обнаружено проявление литической активности фаговыми лизатами бактериофага С1 в отношении стрептококков групп А, С и Е. Выделенный из лизатов фермент назвали PlyC. В литературе он практически не описан, хотя и был открыт более 50 лет назад. На данный момент имеется несколько публикаций, посвященных процедурам выделения и очистки фагового и рекомбинантного PlyC [13, 16, 17].

Фермент PlyC имеет необычную олигомерную организацию. Методами нативного электрофореза, эксклюзионной хроматографии и гель-фильтрации было показано, что молекулярная масса фермента составляет величину порядка 114 кДа [13, 16, 17]. Методом электрофореза в денатурирующих условиях установлено наличие в молекуле PlyC большой и малой субъединиц – PlyCA (50 кДа) PlyCB (8 кДа). Вопрос о стехиометрическом соотношении PlyCA и PlyCB в молекуле PlyC авторы работы [13] решили путем сравнения экспериментально полученного и теоретически высчитанного значений коэффициентов экстинкции при 280 нм. Теоретическое и экспериментальное значения коэффициента экстинкции совпали для модели, в которой на 1 субъединицу PlyCA приходится 8 субъединиц PlyCB.

Так как фермент PlyC является олигомером (содержит одну большую субъединицу PlyCA и восемь малых субъединиц PlyCB), то возможно проявление диссоциативного механизма инаktivации. Поэтому в работе была изучена инаktivация фермента в различных условиях. Так, кривые инаktivации для фермента PlyC были получены в интервалах температур 20–50°C, рН 6–8, при концентрации фермента 3–160 мкг/мл. При анализе кривых термоинаktivации фермента PlyC были выявлены следующие закономерности:

1) наличие на кривых инаktivации точек “излома” в полулогарифмических координатах, т.е. кривые инаktivации при определенных условиях описываются суммой двух экспонент (рис. 2, а, б);

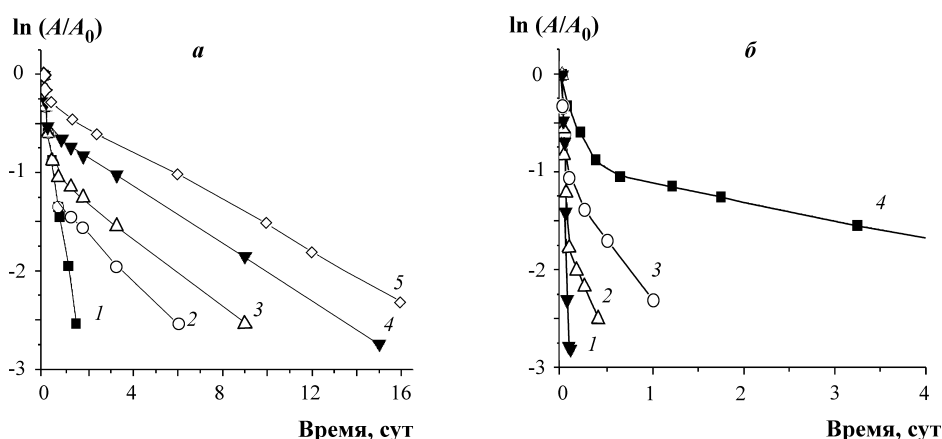


Рис. 2. Кинетические кривые термоинаktivации PlyC в полулогарифмических координатах: а – зависимость термоинаktivации PlyC при температуре 37°C от начальной концентрации фермента, мкг/мл: 0,3 (1), 3 (2), 8 (3), 16 (4), 160 (5); б – зависимость термоинаktivации PlyC при концентрации фермента 8 мкг/мл от температуры при T, °C: 45 (1), 41,5 (2), 39 (3), 37 (4). Условия эксперимента: 20 мМ калий-фосфатный буфер (рН 6,3)

2) регенерация активности при малом времени термообработки (до “излома”);

3) изменение положения точки излома в зависимости от концентрации фермента при фиксированной температуре (рис. 2, а; 37°C; 3–160 мкг/мл);

4) изменение положения точки излома в зависимости от температуры при фиксированной концентрации фермента (рис. 2, б; 8 мкг/мл; 37–45°C).

Все эти данные удовлетворяют основным положениям теории диссоциативной инактивации [19–21]. При диссоциативной инактивации олигомерных ферментов обратимая диссоциация олигомера предшествует кинетически необратимым изменениям продуктов. Положение “точки излома” и наклон кинетических кривых в координатах уравнения первого порядка позволяют определить три кинетических параметра. Это будут либо константы скорости  $k_1$ ,  $k_{-1}$  и  $k_2$ , либо две константы скорости  $k_1$ , и  $k_2$  и одна константа равновесия диссоциации  $K_{\text{дис}}$  ( $K_{\text{дис}} = k_1 / k_{-1}$ ) [19, 20]. Определение положения точки излома на кинетической кривой термоинактивации олигомерного фермента – основное условие, позволяющее провести кинетический расчет элементарных констант процесса.

В соответствии с уравнениями, рекомендуемыми теорией диссоциативной инактивации, был проведен расчет константы диссоциации олигомера ( $K_{\text{дис}}$ ), констант скорости диссоциации исходного олигомера ( $k_1$ ) и необратимой инактивации продукта диссоциации ( $k_2$ ). В табл. 1 приведены значения констант  $K_{\text{дис}}$ ,  $k_1$ , и  $k_2$ .

Таблица 1

**Кинетические параметры диссоциативной термоинактивации PlyC**

pH	T, °C	$K_{\text{дис}} \cdot 10^7$ , M	$k_1 \cdot 10^6$ , с <sup>-1</sup>	$k_2 \cdot 10^6$ , с <sup>-1</sup>
6,3	37	3,2	10	2,1
	39	4,4	100	9,3
	41,5	10	200	20
7	37	3,1	1	2,0
	39	4,5	98	9,2
	41,5	9	195	19
8	37	3	0,9	2,1
	39	4,6	99	9,2
	41,5	9	190	21

Таблица 2

**Данные седиментационного анализа для PlyC (pH 6,3; 160 мкг/мл)**

Остаточная активность, усл. ед.	Молекулярная масса	Коэффициент седиментации
1	110 кДа (100%)	6,9S
0	100 кДа (90%)	6,6S
	8 кДа (10%)	1,2S

Данные табл. 1 подтверждают тот факт, что при повышении температуры величина константы скорости диссоциации исходного олигомера  $k_1$  растет существенно быстрее, чем константа скорости инактивации продукта диссоциации  $k_2$ . Это означает, что при температуре выше 41,5°C диссоциация исходного олигомера протекает настолько быстро, что стадией, лимитирующей скорость, становится стадия инактивации продукта диссоциации, которая описывается уравнением первого порядка. При температурах ниже 37°C  $k_1 < k_2$  и скорость-лимитирующей стадией становится диссоциация исходного олигомера. В диапазоне температур 35–39°C константы скорости диссоциации исходного олигомера и инактивации продукта диссоциации сопоставимы, и это приводит к появлению двухэкспоненциальной зависимости остаточной активности от времени. Кроме того, установлено, что все эти величины в пределах погрешности эксперимента не зависят от кислотности при pH 6–8.

Диссоциация фермента была изучена методом скоростного ультрацентрифугирования (седиментации). В табл. 2 приведены данные седиментационного анализа для фермента до инактивации и полностью инактивированного при 37°C. Видно, что в случае полностью инактивированного фермента появляется дополнительный белок весом 8 кДа, что соответствует массе малой субъединицы PlyCB. Следовательно, процесс инактивации фермента PlyC можно описать схемой, представленной на рис. 3. Было показано, что по отдельности большая и малая субъединицы молекулы фермента PlyC активностью не обладают [13]. Поэтому величина  $k_2$  количественно характеризует процесс необратимой инактивации формы фермента, содержащей одну субъединицу PlyCA и семь субъединиц PlyCB.

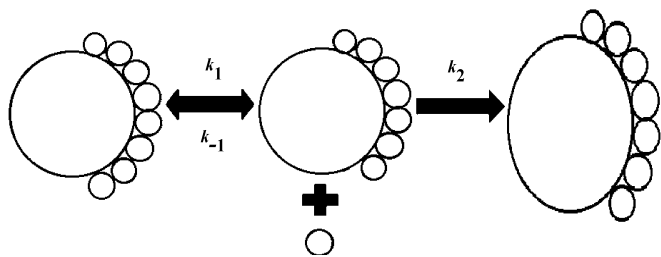


Рис. 3. Схематическое изображение процесса инактивации PlyC

Поскольку известно, что молекула PlyC состоит из девяти субъединиц и в процессе инактивации происходит диссоциация его молекулы, то наиболее эффективным методом стабилизации может оказаться способ наложения внутримолекулярных “химических скобок”.

В качестве сшивающих агентов использовали бис-сульфосукцинимидил суберат натрия ( $BS^3$ ) и глутаровый диальдегид (GA), которые взаимодействуют с аминокеттогруппами молекулы PlyC. Путем титрования PlyC тринитробензолсульфоокислотой было установлено, что молекула фермента содержит порядка 50 аминокеттогрупп.

Для того чтобы подобрать условия сшивки, варьировали значение pH (6–10), молярное соотношение сшивающий агент/фермент (25–200), температуру (4–22°C) и время выдерживания реакционной смеси (от 10 минут до суток). Результат взаимодействия сшивающего агента и фермента контролировали методом электрофореза по Лэмбли.

Остановимся более подробно на результатах, полученных при наложении “скобок” на молекулу PlyC при помощи  $BS^3$ . Опираясь на данные, полученные при определении массы белков для серии приготовленных растворов, мы установили, что сшивание фермента  $BS^3$  происходит только при pH 7,5 и 50- или 100-кратных избытках сшивающего агента (рис. 4).

На рис. 4 показан пример электрофореграммы, полученной при контроле процесса наложения внутримолекулярных сшивок на молекулу PlyC при помощи  $BS^3$ . На первой дорожке (слева-направо) отчетливо видно наличие двух полос. Одна полоса находится в области ниже 13 кДа, что соответствует массе малой субъединицы PlyCB (8 кДа), другая – чуть выше 46 кДа, что соответствует массе большой субъединицы PlyCA (50 кДа). На третьей и четвертой дорожках отсутствуют полосы, соответствующие массам 50 и 8 кДа и видны полосы, лежащие в области ниже 160 кДа и выше 66 кДа. Из полученных данных можно заключить, что при взаимодей-

ствии PlyC со 100- или 50-кратными молярными избытками  $BS^3$  при pH 7,5 происходит наложение внутримолекулярных сшивок на молекулу фермента.

Аналогичным образом было показано наличие наложения внутримолекулярных сшивок при исследовании взаимодействия PlyC с 200-кратным избытком по молям глутарового альдегида при pH 7,5 и 6,3.

Препараты сшитого фермента сравнивали по параметру остаточной активности с несшитым ферментом. Влияние бифункциональных агентов на активность фермента изучали путем сравнения значений остаточной активности сшитого и несшитого PlyC в стандартных условиях (37°C; pH 6,3). Было установлено, что при использовании глутарового альдегида и  $BS^3$  наложение внутримолекулярных сшивок происходит с сохранением активности фермента.

Изучение влияния наложения внутримолекулярных сшивок на стабильность PlyC проводили при температурах 22°C (температура хранения медицинских препаратов) и 37°C (ускоренная инактивация) при pH 6,3. В результате проделанной работы были выявлены следующие закономерности (рис. 5, а, б).

Во-первых, при инактивации сшитого фермента при температуре 37°C стабильность не зависит от его

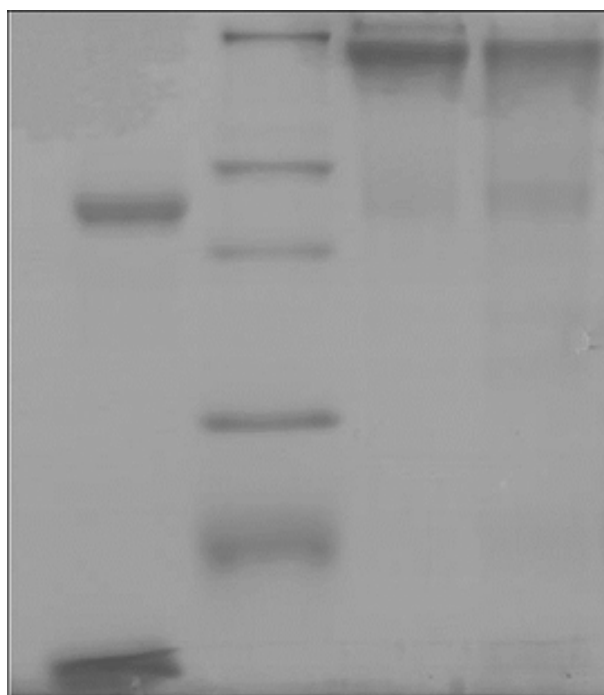


Рис. 4. Изображение геля 10% SDS-PAGE. Слева-направо: первая дорожка – фермент, вторая – маркеры (160, 66, 46, 23 и 13 кДа), третья и четвертая – фермент, сшитый 50- и 100-кратным избытком  $BS^3$  соответственно при pH 7,5, концентрации PlyC 4 мг/мл

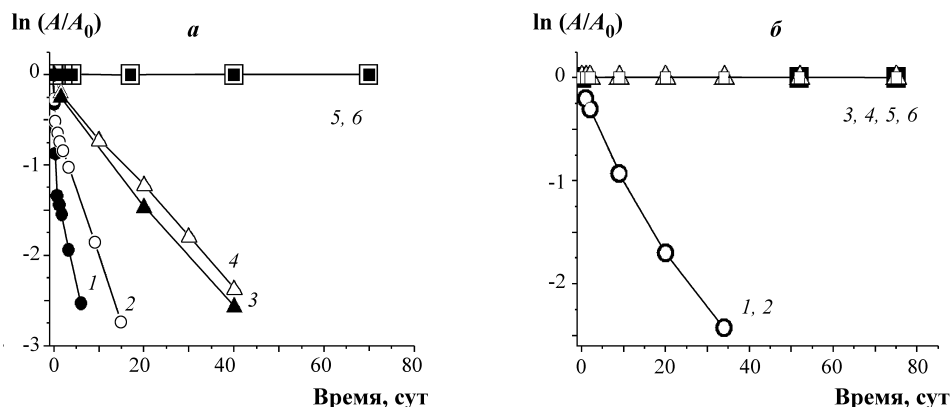


Рис. 5. Стабильность при 37°C (а) и 22°C (б) pH 6,3 сшитого и несшитого фермента: PlyC 3 мкг/мл (1); PlyC 16 мкг/мл (2); PlyC, сшитый 200-кратным избытком глутарового альдегида, 3 мкг/мл (3); PlyC, сшитый 200-кратным избытком глутарового альдегида, 16 мкг/мл (4); PlyC, сшитый 50-кратным избытком  $BS^3$ , 3 мкг/мл (5); PlyC, сшитый 100-кратным избытком  $BS^3$ , 16 мкг/мл (6)

концентрации (в интервале 3–160 мкг/мл), в отличие от несшитого PlyC. Это означает, что инактивация протекает по первому порядку и что ее причиной являются конформационные изменения молекулы фермента, а не его диссоциация на субъединицы.

Во-вторых, стабилизационный эффект зависит от вида сшивающего агента: при 37°C PlyC, сшитый  $BS^3$ , обладает более высокой стабильностью, чем сшитый глутаровым альдегидом.

В-третьих, при температурах 22 и 37°C сшитый фермент существенно более стабилен, чем несшитый. При 22°C сшитый глутаровым альдегидом и  $BS^3$  фермент сохраняет 100% активности через 2,5 мес. инкубации, в то время как несшитый фермент полностью инактивируется в течение месяца. Из вышесказанного можно заключить, что стабильность

сшитого при помощи  $BS^3$  и глутарового альдегида препарата фермента PlyC удовлетворяет требованиям, предъявляемым к медицинскому препарату.

### Выводы

Впервые идентифицирован механизм инактивации фермента PlyC. Показано, что в условиях испытаний ферментных препаратов (22 и 37°C) PlyC инактивируется вследствие диссоциации олигомерной молекулы с последующей инактивацией диссоциированной формы (37°C) и по мономолекулярному механизму (22°C). Подобран эффективный метод стабилизации PlyC наложением внутримолекулярных химических сшивков, благодаря чему фермент сохраняет 100% активности при инкубации в течение 2,5 мес при 22°C, что удовлетворяет требованиям к медицинскому препарату.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reacher M.H., Shah A., Livermore D.M. // *British Medical Journal*. 2000. **320**. P. 213.
2. Покровский В.И. *Инфекционные болезни и эпидемиология*. М., 2009. С. 200.
3. Мирошников К.А., Чертков О.В., Назаров П.А., Месяжников В.В. // *Усп. биол. хим.* 2006. **46**. С. 65.
4. Фадеева Т.В., Верещагина С.А., Коган А.С., Григорьев Е.Г. // *Инфекции в хирургии*. 2007. **5**. С. 5.
5. Matsuzaki S., Rashei M., Uchiyama J., Sakurai S., Ujihara T., Kuroda M., Ikeuchi M., Tani T., Fujieda M., Wakiguchi H., Imai S. // *J. Infect. Chemother.* 2005. **11**. P. 211.
6. Carlton R.M. // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 1999. **47**. P. 267.
7. Alisky J., Iczkowski K., Rapoport A., Troitsky N. // *J. Infections*. 1998. **36**. P. 5.
8. Fishetti V.A. // *Trends in Microbiol.* 2005. **13**. P. 491.
9. Fishetti V.A. // *Current Opinion in Microbiology*. 2008. **11**. P. 393.
10. Loessner M.J. // *Current Opinion in Microbiology*. 2005. **8**. P. 480.
11. Lopez R., Garcia E., Garcia P. // *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. 2004. **1**. P. 469.
12. Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Gorski A. // *Experimental Biology and Medline*. 2006. **231**. P. 366.
13. Nelson D., Schuch R., Chahales P., Shiwei Zhu, Fishetti V. // *Microbiology*. 2006. **103**. P. 10765.
14. Клячко Н.Л., Дмитриева Н.Ф., Ещина А.С., Игнатенко О.В., Филатова Л.Ю., Райнина Е.И., Казаров А.К., Левашов А.В. // *Биоорганическая химия*. 2008. **34**. С. 416.
15. Hoopes J.T., Stark C.J., Kim H.A., Sussman D.J., Donovan D.M., Nelson D.C. // *Applied and Environmental Microbiology*. 2009. **75**. P. 1388.

16. Fishetti V.A., Gotschlich E.C., Bernheimer A.W. // J. Exp. Med. 1971. **133**. P. 1105.  
17. Raina J.L. // J. Bacteriol. 1981. **145**. P. 661.  
18. Laemmli U.K. // Nature. 1970. **227**. P. 680.  
19. Полторац О.М., Чухрай Е.С., Торшин И.Ю. // Биохимия. 1998. **63**. С. 303.  
20. Полторац О.М., Чухрай Е.С. // Журн. физ. химии. 2002. **76**. С. 1841.  
21. Чухрай Е.С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1981. **22**. С. 331.

Поступила в редакцию 20.01.10

**PlyC LYSIN - THE ENZYME ACTIVE TOWARDS GROUP A, C AND E STREPTOCOCCI: PECULIARITIES OF INACTIVATION AND STABILIZATION BY INTRAMOLECULAR CHEMICAL CROSS LINKING**

**L.Yu. Filatova, N.L. Klyachko**

*(Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University)*

**Investigation of thermal inactivation of PlyC – the enzyme, lysing group A, C and E streptococci, was carried out. As found, at 37–41.5°C, pH 6–8, and enzyme concentration of 0.3–160 µg/ml inactivation of PlyC lysin found to be oligomeric enzyme is caused by dissociation of its molecule. At higher (42–50°C) and lower (35–22°C) temperatures PlyC inactivation is connected with monomolecular mechanism. The effective method of PlyC stabilization by means of intramolecular chemical cross linking was proposed.**

**Key words:** *bacteriophage enzymes; PlyC lysin; streptococcal infections; enzyme, lysing streptococcal cells, stability and stabilization.*

**Сведения об авторах:** *Филатова Любовь Юрьевна – сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (lubfil@rambler.ru); Клячко Наталья Львовна – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (klyachko@enzyme.chem.msu.ru).*