

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.152.3:579.234

**СТАБИЛИЗАЦИЯ ПОЛИКАТИОНОМ LysK – ФЕРМЕНТА,
ЛИЗИРУЮЩЕГО КЛЕТКИ *Staphylococcus Aureus***

Л.Ю. Филатова, С.С. Беккер,* Д.М. Донован,* А.К. Гладилин, Н.Л. Клячко

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

Изучено влияние поликатиона (полибрена) на активность и стабильность LysK – фермента, лизирующего клетки *Staphylococcus aureus*. Обнаружено увеличение стабильности в 10 – 80 раз при 37°C. Установлено, что стабилизационный эффект определяется числом точечных взаимодействий противоположно заряженных групп фермента и поликатиона.

Ключевые слова: бактериолитический фермент, LysK, стафилококковые инфекции, стабилизация ферментов, полиэлектролиты, полибрен.

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) является возбудителем ангины, пневмонии, мастита, флегмона, эндокардита и других опасных заболеваний. В настоящее время более 90% штаммов золотистого стафилококка устойчивы к одному и более антибиотикам [1].

Бактериофаги, вирусы бактерий, и их литические ферменты можно рассматривать как потенциальную альтернативу антибиотикам [2, 3]. Фермент LysK продуцируется бактериофагом К при заражении им клеток *Staphylococcus aureus* [4]. LysK разрушает (лизует) ковалентные связи пептидогликанового остова клеточных стенок стафилококков, резистентных к метициллину, ванкомицину и тейкопланину, вызывая их гибель [4, 5]. Основным ограничением для использования LysK в медицине является его низкая стабильность при физиологической температуре (37°).

Данная работа посвящена исследованию взаимодействия LysK с поликатионом (полибреном), а также выявлению особенностей и закономерностей стабилизирующего действия данного соединения на фермент при 37°.

Материалы и методы**Материалы**

Рекомбинантный фермент, лизирующий клетки *Staphylococcus aureus* (LysK), был выделен и очищен по методике [4]. Препарат фермента хранили в виде водного раствора (20 мМ трис, pH 7,5) в концентрации 3,5 мг/мл. Препарат автоклавированных клеток *Staphylococcus aureus* (штамм С 47) предос-

тавлен компанией “Вектор” (г. Новосибирск). Все остальные реагенты произведены фирмой “Sigma” (чистота ~99%).

Методики

Активность фермента определяли по следующей методике. В буфере (pH 7,5), содержащем 20 мМ фосфата калия, готовили суспензию клеток *Staphylococcus aureus* таким образом, чтобы оптическая плотность была равной 0,6 при длине волны 600 нм. К 0,5 мл суспензии клеток добавляли 5 мкл раствора фермента концентрацией 0,5 мг/мл и проводили измерение уменьшения оптической плотности во времени на спектрофотометре “Ultrospec 2100-pro” с термостатируемым кюветным отделением при температуре 37°C и длине волны 600 нм. Активность фермента определяли по тангенсу угла наклона начального участка на кривой зависимости оптической плотности суспензии клеток от времени.

Комплексы LysK с поликатионом готовили семикратным разбавлением исходного препарата фермента (до концентрации 0,5 мг/мл) раствором полибрена заданной концентрации в 20 мМ трисовом буфере (pH 9). Полученный раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 10 мин, а затем измеряли активность LysK. Содержание полибрена в конечных растворах составляло 0,001–0,5%.

Для исследования стабильности растворы фермента (с добавлением и без добавления полиэлектролита) концентрацией 0,5 мг/мл инкубировали в выбранные промежутки времени при 37°, затем отбирали аликвоты по 5 мкл для измерения активности.

*Animal Biosciences and Biotechnology Laboratory, Animal and Natural Resources Institute, Beltsville Agricultural Research Center, USA.

Ацилирование аминогрупп молекул LysK янтарным ангидридом проводили по методике [6]. Степень модификации определяли по методике [7] титрованием аминогрупп молекул LysK раствором 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты.

Результаты и их обсуждение

В литературе подробно описаны комплексы ферментов с полиэлектролитами в водных растворах. Установлено, что такие комплексы образуются спонтанно при смешении компонентов и существуют за счет электростатических взаимодействий между противоположно заряженными группами белка и полииона [8, 9].

Установлено, что значение изоэлектрической точки молекулы LysK составляет 8,6. При величине pH < 8,6 молекулы фермента заряжены положительно, а при более высоком значении – отрицательно. Поэтому взаимодействие LysK с полибренном исследовали при pH 9, т.е. в условиях, когда фермент и полиион противоположно заряжены.

При включении фермента в комплексы с полибренном сохраняется активность LysK и увеличивается стабильность (рис. 1). На рис. 1 приведены кривые инактивации фермента и фермент-полиэлектролитных комплексов. Показано, что величина стабилизационного эффекта определяется содержанием полиэлектролита в системе, т.е. количеством положительных зарядов на молекулу LysK. Через 2 ч инкубации при 37°C фермент без добавок полибрена сохранял 3% активности, в то время как при концентрациях поликатиона 0,001; 0,1 и 0,5% остаточная активность LysK достигала уровня 30, 60 и 90% соответственно.

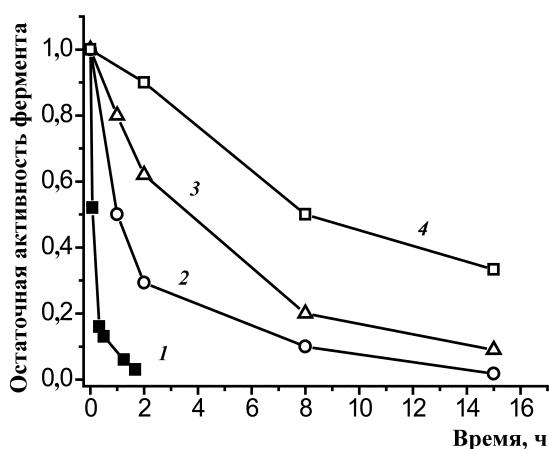


Рис. 1. Стабилизация LysK полибренном. Условия эксперимента: pH 9, T = 37°C, концентрация фермента 0,5 мг/мл в растворе, содержащем 0 (1); 0,001 (2); 0,1 (3); 0,5 (4) % полиэлектролита

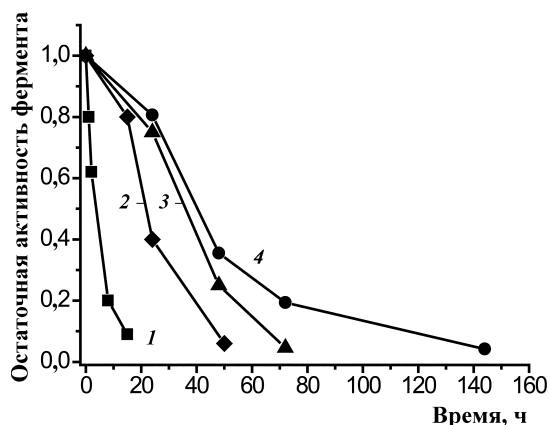


Рис. 2. Стабилизация полибренном LysK, модифицированного янтарным ангидридом. Условия эксперимента: pH 9, T = 37°C, содержание полибрена в растворе 0,1%, концентрация фермента 0,5 мг/мл. Степени модификации молекулы LysK: 0 (1), 30 (2), 50 (3) и 70 (4)%

Остаточная активность фермента в комплексах с полибренном достигала практически нулевого уровня за отрезок времени, на порядок превышающий время инактивации LysK без добавок полиэлектролита. Стабилизирующее действие полибрена можно объяснить тем, что многоточечный характер взаимодействия между молекулами фермента и полибрена способствует закреплению каталитически активной конформации LysK.

Для подтверждения данной гипотезы были получены комплексы с полибренном LysK, модифицированного янтарным ангидридом. При модификации аминогрупп молекулы фермента янтарным ангидридом увеличивается число отрицательно заряженных групп на ее поверхности и, следовательно, число электростатических контактов с молекулами полииона. При титровании LysK тринитробензолсульфокислотой было обнаружено, что молекула фермента содержит 20 аминогрупп. На рис. 2 приведены кривые инактивации комплексов LysK с полибренном. Степень модификации LysK составляла 0, 30, 50 и 70%, содержание полиэлектролита (0,1%) было фиксированным. Из рисунка видно, что чем выше степень модификации, тем больше стабилизационный эффект. Этот факт указывает на важную роль в стабилизации каталитически активной конформации молекулы фермента точечных электростатических взаимодействий противоположно заряженных групп LysK и поликатиона. При степени модификации 30–70% стабильность фермента в комплексе с поликатионом возрастает в 3–10 раз по сравнению с немодифицированным LysK в комплексе с полибренном и в 20 – 80 раз

по сравнению с ферментом без добавок полиэлектролита и модификации аминокетильных групп.

Таким образом, основной причиной стабилизации LysK при образовании комплекса с поликатионом яв-

ляется закрепление каталитически активной конформации молекулы фермента благодаря многоточечному взаимодействию противоположно заряженных групп белковой глобулы и полибрейна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Фадеева Т.В., Верецагина С.А., Козан А.С., Григорьев Е.Г.* // Инфекции в хирургии. 2007. **5**. №1. С. 578.
2. *Fishetti V.A.* // Trends in Microbiology. 2005. **13**. P. 491.
3. *Fishetti V.A.* // Current Opinion in Microbiology. 2008. **11**. P. 393.
4. *Flaherty S.O. et al.* // J. Bacteriology. 2005. **187**. P. 7161.
5. *Flaherty S.O. et al.* // J. Bacteriology. 2004. **186**. P. 2862.
6. *Riordan J.F., Valee B.L.* // Meth. Enzymol. 1967. **11**. P. 565.
7. *Fields R.* // Biochemistry. 1971. **124**. P. 581.
8. *Chaniotakis N.A.* // Anal. Bioanal. Chem. 2004. **378**. P. 89.
9. *Iyer P.V., Ananthanarayan L.A.* // Process Biochemistry. 2005. **43**. P. 1019.

Поступила в редакцию 15.06.09

STABILIZATION BY POLYCATION OF LYSK THE ENZYME LYSING STAPHYLOCOCCUS AUREUS CELLS

L. Yu Filatova, S.C. Becker, D.M. Donovan, A.K. Gladilin, N.L. Klyachko

(Division of Chemical Enzymology)

Influence of polycation (polybreine) on activity and stability of LysK – the enzyme lysing *Staphylococcus aureus* cells was investigated. As found, polybreine caused 10–80 times increase of LysK stability at 37°C. Stabilizing effect depended on a number of point interactions of oppositely charged groups of the enzyme and polycation.

Key words: *Bacteriophage lytic enzyme, LysK, Staphylococcus infections, Enzyme stabilization, Polyelectrolytes, Polybreine.*

Сведения об авторах: *Филатова Любовь Юрьевна* – сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (lubfil@rambler.ru); *Stephen C. Becker* – Animal Biosciences and Biotechnology Laboratory, Animal and Natural Resources Institute, Beltsville Agricultural Research Center, USA; Dr. Phone: 301-504-9150; fax: 301-504-8571; *David M. Donovan* – Animal Biosciences and Biotechnology Laboratory, Animal and Natural Resources Institute, Beltsville Agricultural Research Center, USA, Dr. Phone: 301-504-9150; fax: 301-504-8571 (david.donovan@ars.usda.gov); *Гладилин Александр Кириллович* – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (gladilin@direct.ru); *Клячко Наталья Львовна* – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (Klyachko@enzyme.chem.msu.ru).