

ЭНДОЛИЗИН БАКТЕРИОФАГА T5 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ЭНЗИБИОТИК

*Микулинская Г.В., кандидат биологических наук,
Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, г. Пущино, mikulinskaya@fbkh.serpukhov.su
Зимин А.А., кандидат биологических наук, zimin@ibpm.pushchino.ru
Степная О.А., доктор биологических наук,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН, г.
Пущино*

Ключевые слова: эндолизин, бактериофаг T5, L-аланоил-D-глутаматпептидаза, энзибиотики

Был изучен спектр антибактериального действия нового эндолизина бактериофага T5 - катионозависимой L-аланоил-D-глутаматпептидазы. Показано, что фермент специфически разрушает пептидогликан грамотрицательных бактерий, относящийся к типу A1γ. Показано, что фермент полностью лизирует живые клетки бактерий в присутствии полимиксина В. Это позволяет прогнозировать применение данного белка как энзибиотика направленного действия.

Введение. Эндолизины – группа белков, кодируемых бактериофагами и разрушающих пептидогликан клеточной стенки бактерии на конечной стадии литического цикла развития фага. По типу связей, гидролизующихся в пептидогликане, эндолизины делят на 5 классов: 1) мурамидазы; 2) литические трансгликозилазы; 3) N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы; 4) N-ацетилмурамил-L-аланинамидазы и 5) пептидазы [1,2]. В настоящее время в связи с появлением большого числа антибиотикоустойчивых патогенов литические ферменты бактериофагов рассматриваются в качестве альтернативы антибиотикам для лечения и профилактики инфекций бактериальной природы.

Эндолизины характеризуются определенным спектром антибактериального действия, не зависящим от чувствительности бактерии к антибиотикам. Спектр антибактериального действия эндолизина определяется типом фермента, составом компонентов клеточной стенки, а также конфигурацией субстрата. Избирательность действия эндолизина фага C1 на стрептококки позволяет его использовать в качестве профилактического средства для предотвращения колонизации этими бактериями мукозного эпителия верхних дыхательных путей [3]. Специфичность другого фагового эндолизина к *B.anthraxis* позволяет использовать его в диагностике [4]. Лизоцим бактериофага T4 был успешно использован для защиты картофеля от вредной бактерии *Erwinia carotowora* [5]. Относительно фаговых эндолизинов в литературе часто употребляется термин «энзибиотики».

Целью настоящей работы стал анализ спектра антибактериального действия нового эндолизина бактериофага T5 и исследование возможности его применения в качестве лизирующего агента.

Материалы и методы. С целью определения спектра антибактериального действия эндолизина клетки ночной культуры бактерий убивали автоклавированием, промывали и суспендировали в реакционном буфере (50 mM Tris-HCl, pH 8.2, содержащем 0.1% Тритон X-100) до концентрации $\sim 2 \cdot 10^8$ к.о.е./мл. Реакцию начинали добавлением фермента. Литическую активность измеряли по уменьшению оптической плотности при 450 нм в 1-см акрило-

вых кюветях при комнатной температуре. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует убывание оптической плотности на 1 ОЕ в минуту.

С целью проверки действия эндолизина на живые клетки бактерий ночную культуру *E. coli* суспендировали в реакционном буфере (50 mM Tris-HCl, pH 8.2, содержащем 0.1% Тритон X-100) до концентрации $\sim 2 \cdot 10^8$ к.о.е./мл. Один образец обрабатывали полимиксином В (конечная концентрация 40 мкг/мл), второй – чистым препаратом эндолизина (конечная концентрация 40 мкг/мл), третий – обоими агентами в тех же концентрациях. Контролем служили необработанные клетки. Все образцы инкубировали сутки при 37°C, после чего отбирали аликвоты, соответствующие 10^7 исходных клеток, и выращивали газоном на LB-агаре в течение ночи.

Результаты и их обсуждение. Эндолизин бактериофага T5 был успешно клонирован в клетках *E. coli* и очищен до электрофоретически гомогенного состояния [6]. Была исследована активность эндолизина бактериофага T5, изучены важнейшие биохимические и физические свойства фермента [7]. Фермент является Ca^{2+} -зависимой L-аланоил-D-глутаматпептидазой, однако относится к семейству цинк-содержащих пептидаз семейства M15 клана MD [6-7]. Это первый пример L-аланоил-D-глутаматпептидазы, обнаруженной у вирулентного фага, инфицирующего грамотрицательную бактерию.

Для определения спектра антибактериального действия фермента была проверена его способность гидролизовать пептидогликаны различного строения. Среди бактерий, выбранных для лизиса, были как грамположительные, так и грамотрицательные с различной структурой пептидогликана и клеточной стенки (Таблица 1). Все препараты грамотрицательных бактерий были подвержены быстрому лизису. Среди проверенных грамположительных видов только препараты клеток *B. subtilis* были подвержены слабому лизису (скорость на четыре порядка меньше максимальной), остальные грамположительные клетки не лизировались вообще. Таким образом, было показано, что фермент специфичен к пептидогликану грамотрицательных бактерий, который относится к одному типу - A1 γ - и не содержит ни тейхоевых, ни тейхуроновых кислот, характерных для клеточных стенок грамположительных бактерий.

Таблица 1. - Действие пептидазы бактериофага T5 на гетерологичные микроорганизмы

Организм	Тип пептидогликана	Относительная скорость лизиса, Ед/мг белка
<i>Escherichia coli K-12</i>	A1 γ	$(1.12 \pm 0.12) \cdot 10^4$
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	A1 γ	$(1.01 \pm 0.15) \cdot 10^4$
<i>Pseudomonas putida</i>	A1 γ	$(1.35 \pm 0.18) \cdot 10^4$
<i>Proteus vulgaris</i>	A1 γ	$(1.19 \pm 0.20) \cdot 10^4$
<i>Proteus mirabilis</i>	A1 γ	$(1.04 \pm 0.15) \cdot 10^4$
<i>Bacillus subtilis</i>	A1 γ	0.48 \pm 0.05
<i>Listeria monocytogenes</i>	A1 γ	0.016 \pm 0.001
<i>Staphylococcus aureus</i>	A3 α	0.0
<i>Corinebacterium xerosis</i>	A1 γ	0.0
<i>Micrococcus luteus</i>	A2	0.0

Как правило, для проникновения «изнутри» клетки сквозь внутреннюю мембрану клетки-хозяина к слою пептидогликана эндолизину необходим гидрофобный белок холин, второй компонент двухбелковой системы фаголизиса клетки. Однако, эндолизины способны разрушать пептидогликан клеточной стенки и в одиночку, будучи добавленными «извне» в

виде очищенного рекомбинантного белка. Прежде всего, это характерно для эндолизинов, специфичных к пептидогликану грамположительных бактерий. В некоторых случаях грамотрицательные микроорганизмы на определенных стадиях роста также подвержены лизису эндолизинами [5]. Однако в целом применение подобных белков против грамотрицательных микроорганизмов осложняется строением клеточной стенки последних, а именно наличием наружной плазматической мембраны.

Одним из способов пермеабиллизации наружной мембраны, обеспечивающей эндолизину доступ к субстрату – пептидогликану – и дальнейший лизис клетки, является применение антибиотиков, нарушающих мембрану [8]. В этом случае можно говорить о синергическом действии эндолизина с антибиотиком.

Мы использовали полимиксин В – пептидный антибиотик, который может связываться с фосфолипидами наружной мембраны и увеличивать ее проницаемость. На рисунке 1 видно, что полимиксин в концентрации 40 мкг/мл ингибирует рост клеток, не лизируя их (оптическая плотность не падает). Однако совместное использование эндолизина и полимиксина приводит к полному лизису клеток. При этом контрольные (ничем не обработанные) клетки и клетки, обработанные препаратом эндолизина, образуют сплошной газон.

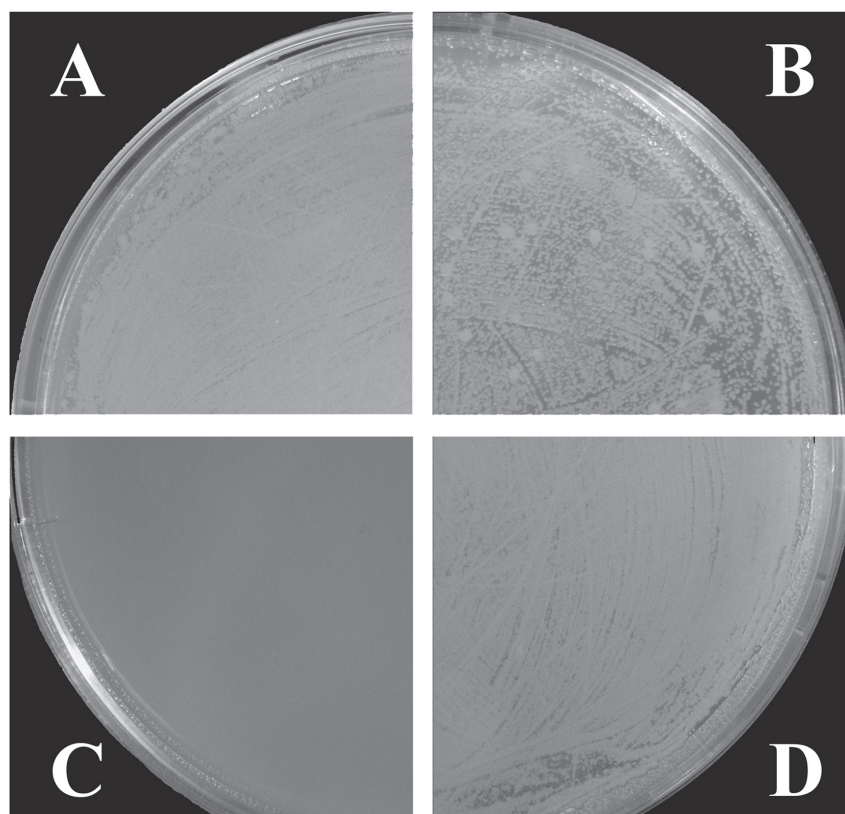


Рис. 1. Выживаемость клеток *E.coli* под действием эндолизина. На рисунке представлены фрагменты чашек, инкубированных с: А – очищенным эндолизином (концентрация 40 мкг/мл), В – полимиксином В (концентрация 40 мкг/мл), С – полимиксином В и эндолизином (концентрация каждого 40 мкг/мл), D – контрольные клетки.

Таким образом, можно говорить о бактериолитическом действии эндолизина на грамотрицательные клетки, опосредованном пермеабиллизацией наружной мембраны полимиксином В.

Заключение. Исследования, проведенные в целях изучения спектра бактериолитиче-

ского действия фермента, показали, что пептидаза бактериофага T5 специфична к клеточным стенкам грамотрицательных микроорганизмов, пептидогликан которых относится к одному типу - A1γ - и не содержит ни тейхоевых, ни тейхуроновых кислот, характерных для клеточных стенок грамположительных бактерий. Среди грамотрицательных микроорганизмов есть и патогенные для животных и человека, а также растений (*Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Aeromonas*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Escherichia*, *Proteus*, *Providencia*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium tumefaciens* и другие). Наличие вызываемых грамотрицательными бактериями заболеваний делает эндолизин T5 потенциальным бактериолитическим средством довольно узкого спектра действия, особенно перспективным в случаях, когда применение антибиотиков нежелательно или неэффективно.

В качестве пермеабилizующего мембрану грам-отрицательной бактерии агента нами были использован полимиксин В. Однако, это не единственный способ пермеабилзации мембраны. Можно выделить еще несколько подходов: физические или химические методы воздействия на клетку – обработка ЭДТА, триполифосфатом натрия, нагрев, изменение pH, обработка ультразвуком, - а также создание химерных конструкций на основе эндолизина, слитого с доменами определенного типа или антимикробными пептидами, обеспечивающими транслокацию через наружную мембрану. Это относительно новый подход, однако известны случаи, когда создание химерных белков помогало модулировать активность эндолизинов, изменять их специфичность и направленно бороться с патогенами [1].

Библиографический список

1. Borysowski, J. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents/ J. Borysowski, B. Weber-Dabrowska, A. Górski // *Exp. Biol. Med.* (Maywood) - 2006. – v. 231. – p. 366-377.
2. Loessner, M. J. Bacteriophage endolysins-current state of research and applications/ M. J. Loessner // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2005. – v. 8. – p. 480-487.
3. Nelson, D. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme // D. Nelson, L. Loomis, V. A. Fischetti// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 2001. – v. 98. – p. 4107-4112.
4. Schuch, R. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*/ R. Schuch, D. Nelson, V. A. Fischetti// *Nature*. – 2002. – v. 418. – p. 884-889.
5. During, K. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *E. carotovora*/ K. During, P. Porsch, M. Fladung, H. Lorz // *Plant J.* – 1993. – v. 3. – p. 587-598.
6. Mikoulskaia, G. V. Identification and characterization of the metal ion-dependent L-alanoyl-D-glutamate peptidase encoded by bacteriophage T5 / G. V. Mikoulskaia, I. V. Odinkova, A. A. Zimin et al. // *FEBS J.* – 2009. – v. 276. – p. 7329-7342.
7. Mikoulskaia, G. V. L-Alanoyl-D-Glutamate Peptidase (Bacteriophage T5) / G. V. Mikoulskaia, I. V. Odinkova, A. A. Zimin, O. A. Stepnaya // *Handbook of Proteolytic Enzymes: III edition* by Neil D. Rawlings and Guy S. Salvesen - Oxford: Academic Press, 2013. - p. 1407-1410.
8. Begunova, E. A. The effect of the extracellular bacteriolytic enzymes of *Lysobacter sp.* on gram-negative bacteria / E. A. Begunova, O. A. Stepnaia, I. M. Tsfasman, I. S. Kulaev // *Microbiology* - 2004. – v. 73. – p. 320-325.

Mikoulskaia G.V., Zimin A.A., Stepnaya O.A.

Keywords: *endolysin, bacteriophage T5, L-alanoyl-D-glutamate peptidase, enzybiotics*

The range of antibacterial action of new bacteriophage T5 endolysin – cation-dependent L-alanoyl-D-glutamate peptidase - was investigated. It was shown that the enzyme is specific to the cell walls of the Gram-negative microorganisms, containing peptidoglycan of A1 γ type. It was shown that the enzyme completely lyses live bacteria cells after polymyxin B treatment. It makes T5 peptidase a potential candidate for the use as an enzybiotic of directed action.

УДК 578.81, 578.52, 615.076.7

ПЦР-СИСТЕМА ТИПИРОВАНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

*Мирошников К.А., кандидат биологических наук, и.о. зав. лабораторией
ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова» РАН, kmi@ibch.ru*

*Сыкилинда Н.Н., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова» РАН, sykilinda@mail.ru*

*Куликов Е.Е., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского» РАН, eumenius@
gmail.com*

*Дурманова З.В., ведущий инженер ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ
тел. 7(499) 241-31-05, giskfag@rambler.ru*

*Цыганова М.Р., аспирант ФГБУН «Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН*

*Дарбеева О.С., кандидат медицинских наук, главный эксперт
ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ*

Ключевые слова: *бактериофаги, Pseudomonas aeruginosa, фаготерапия, генотипирование, полимеразная цепная реакция*

*В ходе данной работы разработана ПЦР-тестовая система определения таксономической принадлежности бактериофагов *P.aeruginosa* в контексте возможности использования фагов в терапевтических препаратах*

Введение: Для терапии синегнойных инфекций успешно применяются бактериофаги, в том числе и промышленно выпускаемые. Принципы селекции терапевтических бактериофагов в настоящее время в основном эмпирические, и не имеется строгой описательной базы, основанной на генетических данных. Некоторые из требований, предъявляемых к бактериофагам, используемым в составе терапевтических смесей, неразрывно связаны с изучением их генома. Знание полной последовательности генома фага позволяет проверить наличие генных