

УДК 577.151.042

ЭНДОЛИЗИН БАКТЕРИОФАГА SPZ7: ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТОРОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА В ЛИЗИСЕ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Н.Л. Клячко¹, С.А. Легоцкий¹, П.А. Левашов¹, В.М. Попова², Н.Г. Белогурова¹, А.В. Тимашева¹, И.А. Дятлов², А.В. Левашов¹

¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ; e-mail: klyachko@enzyme.chem.msu.ru; ²Государственный научный центр прикладной микро-биологии и биотехнологии, Моск. обл., пос. Оболенск, Россия)

Изучены возможности функционирования эндолизина бактериофага SPZ7 в лизисе грамотрицательных бактерий “снаружи”. Показано существенное повышение (1,5–3 раза) активности эндолизина бактериофага SPZ7 в лизисе клеток *S. enteritidis* N60 и *E. coli* TG1 в присутствии высокомолекулярных поверхностно-активных веществ, плуронионов с крупным гидрофобным блоком, лизоцима куриного яйца, а также низких концентраций пептидного антибиотика колистина. Разработанный подход может оказаться перспективным в повышении эффективности действия лекарственных антибактериальных препаратов на основе ферментов бактериофагов в борьбе с грамотрицательными микроорганизмами.

Ключевые слова: эндолизин бактериофага, антибактериальные средства, каталитическая активность, грамотрицательные бактерии, сальмонелла, *E. coli*, эффекторы.

Введение

Эндолизины (лизины или лизоцимы) бактериофагов, являющихся вирусами бактерий, способны осуществлять разрыв связей в пептидогликановом слое клеточной стенки микроорганизмов, приводя к лизису (деградации) последних [1–2]. В настоящее время, в связи с появлением все большего числа резистентных к антибиотикам бактерий, ферменты бактериофагов рассматриваются в качестве альтернативы антибиотикам в профилактике и лечении различных бактериальных инфекций [1–8]. Несмотря на то что эндолизины приспособлены природой для лизиса клетки “изнутри”, в литературе существует много примеров эффективной работы таких ферментов “снаружи” в случае грамположительных бактерий (см., например, [2, 9–12]). В случае грамотрицательных микроорганизмов сложное строение клеточной стенки бактерий, наличие внешней мембраны, возможно, препятствует доступу эндолизинов “снаружи” к разрываемым связям, поэтому практически нет примеров эффективного лизиса клеток “извне”. Для многих ферментов таких фагов важным компонентом для эффективного лизиса являются белки-холины [13]. При исследовании свойств ферментов бактериофагов, специфичных к грамотрицательным бактериям, *in vitro* используются, как правило, клетки, обработанные хлороформом, способствующим образованию пор (“дырок”) в кле-

точных мембранах (см., например, [14]). Однако при разработке фармакологических препаратов с использованием ферментов бактериофагов важным представляется изучение эффективности ферментов в отношении необработанных хлороформом клеток патогенов. В литературе описаны различные антимикробные агенты, обладающие свойством изменения проницаемости клеточной стенки бактерий, среди которых следует отметить хелатирующие агенты [15–16], поверхностно-активные вещества [17–19], пептиды и пептидные антибиотики [20–22] и т.д. Однако имеется лишь несколько работ, показывающих синергизм действия на клетки, например, двух ферментов различной специфичности или фермента и антибиотика [1–2]. В настоящей работе мы изучали действие эндолизина фага SPZ7, специфичного к *Salmonella enteritidis*, на необработанные хлороформом клетки. Основная цель данного исследования состояла в изучении влияния эффекторов разной природы на каталитическую активность эндолизина бактериофага SPZ7.

Экспериментальная часть

Материалы

В работе использован эндолизин бактериофага SPZ7, полученный после инфицирования бактериофагом клеток *Salmonella enteritidis* штамм 60. Фермент

с молекулярной массой 19 кДа был выделен и очищен методами жидкостной хроматографии низкого давления (концентрация фермента 0,2–0,5 мг/мл) [23–24]; pH-оптимум активности фермента составлял 8,5 [24]. В качестве субстратов для тестирования каталитической активности эндолизина фага SPZ7 мы использовали клетки *S. enteritidis* штамм 60 и *E. coli* штамм TG1. В работе также использованы трис-HCl (“ICN Biomedicals”, США), колистин (“Sigma Aldrich”, США), бычий сывороточный альбумин, куриный яичный лизоцим, плуроники F127, P85, L101 (“Serva”, Германия).

Методы

Измерение активности фермента

В рутинных экспериментах активность фермента определяли методом турбидиметрии по изменению мутности суспензий клеток *S. enteritidis* штамм 60 и *E. coli* штамм TG1 во времени. Измерение изменения оптической плотности во времени в непрерывном режиме проводили на спектрофотометре “Shimadzu UV-1601PC” с термостатируемым кюветным отделением при температуре 37°C и длине волны 650 нм. В типичном эксперименте в кювету объемом 0,5 мл вносили 480 мкл буфера для измерения активности (20 мМ трис-HCl, pH 8,5), 7 мкл суспензии клеток *S. enteritidis* или *E. coli* (в таком количестве, чтобы оптическая плотность при 650 нм составляла 0,65), помещали в термостатируемое кюветное отделение спектрофотометра (37°C), выжидали несколько минут, чтобы содержимое кюветы прогрелось, и регистрировали фоновое значение лизиса клеток. Затем в кювету вносили 3–5 мкл 0,2–0,5 мг/мл раствора фермента (конечная концентрация эндолизина составляла 1,2–5,0 мкг/мл) и регистрировали ферментативную активность. За активность фермента принимался тангенс угла наклона начального участка кривой, отражающей зависимость оптической плотности от времени.

Активность ферментов в лизисе клеток *S. enteritidis* показывали также **микробиологические тесты**.

1. Появление зоны лизиса (зона просветления) в месте контакта эндолизина SPZ7 с газоном культуры клеток. В типичном эксперименте на чашку Петри с газоном ночной культуры *S. enteritidis* (10^9 КОЕ/мл) наносили 20 мкл раствора эндолизина, оставляли инкубироваться в течение 6 ч при 37°C, наблюдали появление зоны просветления в месте контакта фермента с газоном клеток. В контрольном эксперименте добавляли 20 мкл буферного раствора, оставляли

инкубироваться в течение 6 ч при 37°C, наблюдали отсутствие зоны просветления.

2. Изучение динамики лизиса клеток под действием эндолизина SPZ7 путем подсчета количества выросших колоний. В типичном эксперименте из суспензии клеток *S. enteritidis* (10^9 КОЕ/мл) в присутствии и в отсутствие фермента через определенные промежутки времени отбирали пробы (по 0,1 мл), переносили на чашку Петри с питательной средой; чашки инкубировали при 37°C, количество выросших колоний подсчитывали через 24 ч.

Изучение влияния эфффекторов на активность эндолизина SPZ7

Исходные растворы эфффекторов (1–5% по массе) готовили в 1 мл буфера для измерения активности эндолизина методом последовательного разведения до разных концентраций от 0,1 до 10^{-4} %. В типичном эксперименте в кювету объемом 0,5 мл добавляли 430 мкл буфера для измерения активности, 7 мкл суспензии клеток *E. coli*, 50 мкл раствора эфффектора. Кювету помещали в термостатируемое кюветное отделение спектрофотометра (37°C) и выжидали несколько минут для того, чтобы содержимое кюветы прогрелось, затем регистрировали фоновое значение лизиса. После этого в кювету добавляли 3 мкл раствора бактериолитического фермента и регистрировали ферментативную активность по изменению поглощения при длине волны 650 нм.

Результаты и их обсуждение

Отметим, что бактериофаг SPZ7 и эндолизин фага проявляют высокую литическую активность в отношении как *S. enteritidis* N60 (клетка-“хозяин”), так и резистентных к рифампицину клеток *S. enteritidis* Rif N92, некоторых штаммов *S. typhimurium* (N204, N423/80 и др.), *S. choleraesuis* sp. и т.д. Как видно из рис. 1, на газоне с культурой *S. enteritidis* N60 в присутствии фермента появляется зона просветления (лизиса) (рис. 1, а), ее отсутствие зафиксировано при добавлении буферного раствора в отсутствие фермента (рис. 1, б). Изучение динамики лизиса клеток в присутствии эндолизина (рис. 1, в) во времени показало существенное уменьшение концентрации клеток в суспензии *S. enteritidis* N60 (кривая 1) по сравнению с контролем в отсутствие фермента (кривая 2). Однако, как видно, процесс довольно длителен во времени и не приводит к полному лизису клеток патогена.

В связи с вышесказанным мы провели исследование действия эфффекторов разной природы на ка-

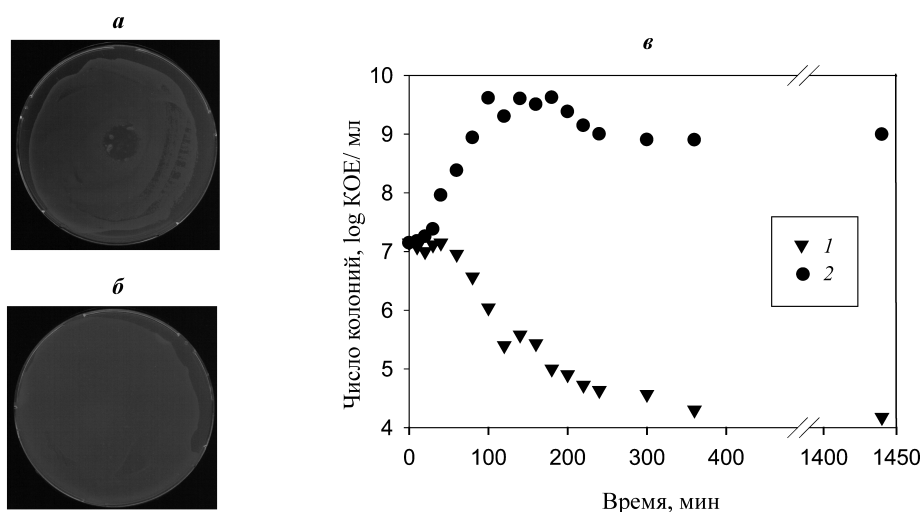


Рис. 1. Микробиологические тесты литической активности эндолизина бактериофага SPZ7: *в* – динамика лизиса клеток *S. enteritidis* N60 во времени, выраженная как число колоний (log КОЕ/мл) в пробах, отобранных из суспензии клеток в присутствии (1) и в отсутствие (2) фермента; *а* и *б* – газон клеток *S. enteritidis* N60 после добавления 20 мкл буферного раствора в присутствии (*а*) и в отсутствие (*б*) фермента и инкубирования в течение 6 ч при 37°C

талитическую активность эндолизина фага SPZ7. Как отмечалось выше, поверхностно-активные вещества (ПАВ) могут влиять на проницаемость биологических мембран. Способность высокомолекулярных ПАВ, плуроников с большим гидрофобным блоком, к разупорядочиванию бислойных мембран отмечалась в работах [18–19]. Для изучения влияния на активность эндолизина мы использовали как гидрофильные (F127, F108), так и гидрофобные (L61, P85, L101) соединения. Для всех использованных соединений наблюдались явно выраженные зависимости активности фермента от концентрации эффектора, больший эффект в оптимуме проявлялся в присутствии более гидрофобных молекул. В качестве примера на рис. 2 представлены данные для L101 (рис. 2, *а*) и P85 (рис. 2, *б*). Как видно, при увеличении концентрации плуроника L101 наблюдается существенное повышение активности фермента (предельная величина определяется ограниченной растворимостью данного соединения в водном буферном растворе); зависимость активности эндолизина от концентрации P85 имеет вид кривой с оптимумом. Активность эндолизина в буферном растворе в отсутствие дополнительных соединений, принятая за 100%, обозначена на рис. 2 белым столбиком. Аналогичные зависимости были получены для эффекторов других классов: колистина (смесь циклических полипептидов), лизоцима (фермент – муро-

мидаза) и др. Литическая активность эндолизина была проверена как на клетках *S. enteritidis* N60, так и *E. coli* TG1. Следует отметить, что используемый в работе колистин относится к пептидным антибиотикам, обладающим бактерицидным действием, но в данной работе были взяты весьма низкие его концентрации (несколько мкг/мл), не вызывающие существенного увеличения фонового лизиса бактериальных клеток или подавления их роста. Аналогично лизоцим куриного яйца в отсутствие эндолизина фага SPZ7 и сам вызывал усиление лизиса клеток *S. enteritidis* N60 и *E. coli* TG1, однако вместе два фермента действовали существенно более эффективно, чем по отдельности. На рис. 3 представлены сравнительные данные по влиянию оптимальных концентраций разных эффекторов на каталитическую активность эндолизина фага SPZ7 в лизисе клеток *E. coli* TG1 (аналогичные данные получены и для *S. enteritidis* N60). Как видно, активность эндолизина в присутствии эффекторов возрастает в 1,5–3 раза.

Заключение

Таким образом, в работе изучены возможности функционирования эндолизина бактериофага SPZ7 в лизисе грамотрицательных бактерий “снаружи”. Выявлено существенное повышение активности эндолизина бактериофага SPZ7 в лизисе клеток *S. enteritidis* N60 и *E. coli* TG1 в присутствии высоко-

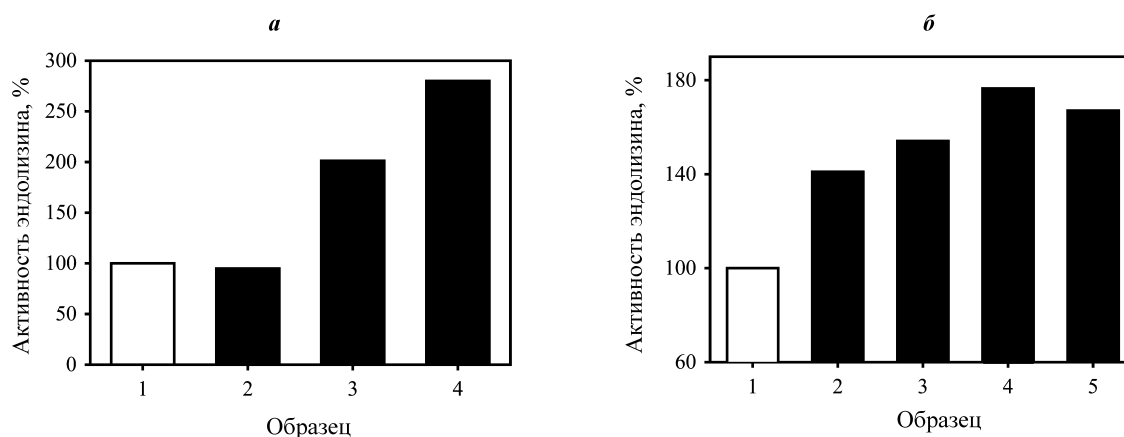


Рис. 2. Влияние плуроников L101 (а) и P85 (б) на каталитическую активность эндוליзина бактериофага SPZ7 в лизисе клеток *E. coli* штамм TG1 при разной концентрации (%) эффекторов: 2а – 10^{-3} , 3а – 10^{-2} , 4а – 10^{-1} ; 2б – 10^{-4} , 3б – 10^{-3} , 4б – 10^{-2} , 5б – 10^{-1} ; 1а, 1б – контроль, активность фермента в отсутствие эффекторов. Условия эксперимента: 20 мМ трис-НСl буфер (рН 8,5), 37°C, исходная концентрация клеток соответствовала 0,65 единиц поглощения при 650 нм, концентрация фермента в кювете 1,2 мкг/мл

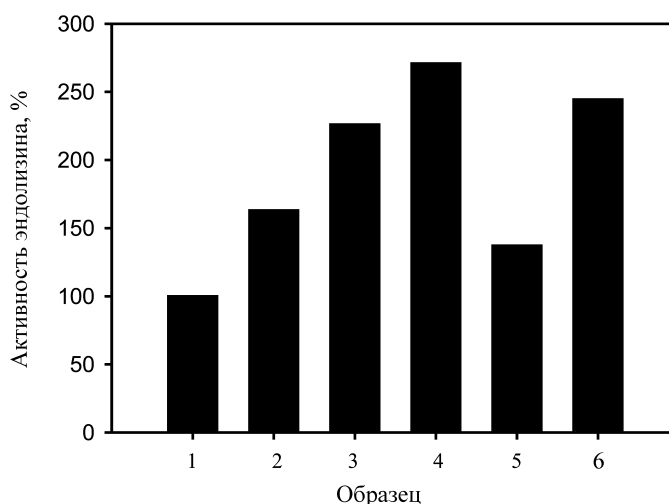


Рис. 3. Влияние эффекторов на каталитическую активность эндOLIзина бактериофага SPZ7 в лизисе клеток *E. coli* штамм TG1. Слева направо: 1 – контроль, 2 – 0,01% P85, 3 – 120 нг/мл лизоцим, 4 – 0,1% L101, 5 – 0,01% F127, 6 – 25 мкг/мл колистин. Активность представлена в % по отношению к контролю. Контроль – активность фермента в буферном растворе в отсутствие эффекторов. Условия эксперимента: 20 мМ трис-НСl буфер (рН 8,5), 37°C, исходная концентрация клеток соответствовала 0,65 единиц поглощения при 650 нм, концентрация фермента в кювете 1,2 мкг/мл

молекулярных ПАВ, плуроников с крупным гидрофобным блоком, лизоцима куриного яйца, а также низких концентраций пептидного антибиотика колистина. Разработанный подход может являться перспек-

тивным в повышении эффективности действия лекарственных антибактериальных препаратов на основе ферментов бактериофагов в борьбе с грамотрицательными микроорганизмами.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы IPP (Project agreement 82032-AK2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hermoso J.A., Garcia J.L., Garcia P. // Current Opinion in Microbiol. 2007. **10**. P. 461.
2. Fischetti V.A. // Current Opinion in Microbiol. 2008. **11**. P. 393.
3. Coffey B., Mills S., Coffey A., McAuliffe O., Ross R.P. // Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2010. **1**. P. 449.
4. Мирошников К.А., Чертков О.В., Назаров П.А., Месянжинов В.В. // Усп. биол. хим. 2006. **46**. С. 65.

5. Fischetti V.A. // Trends in Microbiol. 2005. **13**. P. 491.
6. Loessner M.J. // Curr. Opin. Microbiol. 2005. **8**. P. 480.
7. Lopez R., Garcia E., Garcia P. // Drug Discovery Today: Ther. Strategies. 2004. **1**. P. 469.
8. Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Gorski A. // Exp. Biol. and Med. 2006. **231**. P. 366.
9. Nelson D., Loomis L., Fischetti V.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. **98**. P. 4107.
10. Becker S.C., Foster-Frey J., Stodola A.J., Anacker D., Donovan D.M. // Gene. 2009. **443**. P. 32.
11. Клячко Н.Л., Дмитриева Н.Ф., Ещина А.С., Игнатенко О.В., Филатова Л.Ю., Райнина Е.И., Казаров А.К., Левашов А.В. // Биоорг. химия 2008. **34**. С. 416.
12. Филатова Л.Ю., Беккер С.К., Донован Д.М., Гладиллин А.К., Клячко Н.Л. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2009. **50**. С. 472.
13. Wang I.-N., Smith D.L., Young R. // Annu. Rev. Microbiol. 2000. **54**. P. 799.
14. Rydman P.S., Bamford D.H. // J. Bacteriol. 2002. **184**. P. 104.
15. Franklin T.J., Snow G.A. Biochemistry and molecular biology of antimicrobial drug action. 5th edition. Kluwer, Dordrecht. 1998.
16. Unala R., Yousef A.E., Dunnec C.P. // Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2002. **3**. P. 247.
17. Cornett J.B., Shockman G.D. // J. Bacteriology. 1978. **135**. P. 153.
18. Melik-Nubarov N., Krylova O. // Adv. Planar Lipid Bilayers & Liposomes. 2005. **2**. P. 5.
19. Erukova V.Yu., Krylova O.O., Antonenko Y.N., Melik-Nubarov N.S. // Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes. 2000. **1468**. P. 73.
20. Breukink E., Wiedemann I., van Kraaij C., Kuipers O.P., Sahl H.-G., de Kruijff B. // Science. 1999. **286**. P. 2361.
21. Hyde A.J., Parisot J., McNichol A., Bonev B.B. // PNAS. 2006. **103**. P. 19896.
22. Ginsburg I. // Medical hypotheses. 2004. **62**. P. 367.
23. Попова В.М., Киселева Н.В., Клячко Н.Л., Жиленков Е.Л., Копылов П.Х., Дятлов И.А., Левашов П.А., Левашов А.В. // Матер. VII Межгос. научно-практ. конф. «Чрезвычайные ситуации международного значения в общественном здравоохранении в решениях Санкт-Петербургского саммита “Группы Восьми” и санитарная охрана территорий государств участников СНГ». Оболенск, 2006
24. Levashov P.A., Popova V.M., Popov D.V., Zhilenkov E.L., Dyatlov I.A., Klyachko N.L., Levashov A.V. // Proc. Int. Conference Biocatalysis-2007. 2007. P. 111.

Поступила в редакцию 20.01.10

ENDOLYSIN OF BACTERIOPHAGE SPZ7: THE EFFECT OF “HELPERS” ON THE ENZYME LYTIC ACTIVITY TOWARDS GRAM-NEGATIVE MICROORGANISMS

N.L. Klyachko, S.A. Legotsky, P.A. Levashov, V.M. Popova, A. Timasheva, N.G. Belogurova, I.A. Dyatlov, A.V. Levashov

(M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of Chemical Enzymology, Moscow, Russia; State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Moscow Region, Obolensk, Russia)

Bacteriophage SPZ7 endolysin functioning in the lysis of gram-negative bacteria from “outside” was studied. Significant (1.5–3 times) increase of endolysin activity towards *S. enteritidis* N60 and *E. coli* TG1 was shown in the presence of high molecular surfactants, pluronics, with large hydrophobic block; hen egg lysozyme, and peptide antibiotics, colistin in low concentrations. An approach developed can be an important for increasing an efficiency of pharmaceutical antibacterial preparations based on bacteriophage enzymes working against gram-negative microorganisms.

Key words: *bacteriophage endolysin, antibacterials, lytic activity, gram-negative bacteria, Salmonella, E. coli, effectors, “helpers”.*

Сведения об авторах: Клячко Наталья Львовна – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (klyachko@enzyme.chem.msu.ru); Легоцкий Сергей Александрович – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ; Левашов Павел Андреевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук; Попова Валентина Михайловна – ст. науч. сотр., руководитель группы бактериофагии Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии, канд. мед. наук; Тимашева Анна Владимировна – магистрант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ; Белогурова Наталья Георгиевна – доцент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук; Дятлов Иван Алексеевич – директор Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии, профессор, докт. мед. наук; Левашов Андрей Вадимович – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук.