

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

На правах рукописи

ЧЕРТКОВ ОЛЕГ ВАЛЕРЬЕВИЧ

ЦИТОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИОФАГА фKZ

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

03.01.03 – молекулярная биология

03.02.02 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2017 год

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биоинженерии федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН».

Научный руководитель: Мирошников Константин Анатольевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН».

Официальные оппоненты:

1. **Летаров Андрей Викторович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией вирусов микроорганизмов федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН»
2. **Тишков Владимир Иванович**, доктор химических наук, профессор кафедры энзимологии федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
3. **Макаров Валентин Владимирович**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Научно исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ»

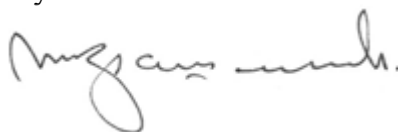
Защита диссертации состоится 14 декабря 2017 г. в ____ часов на заседании Совета МГУ.03.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальностям 03.01.03 – молекулярная биология (биологические науки); 03.02.02 – вирусология (биологические науки) Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр.12, Биологический факультет, ауд.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М. В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, отдел диссертаций), на сайте <http://www.bio.msu.ru> и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru>.

Автореферат разослан 10 ноября 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

профессор



И. А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Одна из проблем современной медицины - приобретенная резистентность бактерий к синтетическим антибиотикам классических и новых поколений. В связи с этим все более актуальным становится поиск альтернативных путей борьбы с бактериальными инфекциями.

Некоторые бактерии семейства *Pseudomonas* устойчивы к антибиотикам, лечение патологий вызванных данными бактериями, является большой проблемой в медицинской практике. *Pseudomonas aeruginosa* является возбудителем различных инфекций дыхательной системы, желудочно-кишечного, урогенитального тракта, мягких тканей, а также системных инфекций, в основном у иммунокомпрометированных пациентов. Инфекции, вызванные этим микроорганизмом, характеризуются тяжелым течением и ассоциируются с высокой летальностью. *P. aeruginosa* устойчива ко многим антибиотикам включая пенициллины, цефалоспорины, тетрациклин, хлорамфеникол и ванкомицин. Альтернативой антибиотикам может стать использование бактериофагов, т.к. возникновение у бактерий устойчивости к синтетическим антибиотикам не сказывается на их чувствительности к бактериофагам.

Однако, несмотря на ряд несомненных преимуществ использования фаговой терапии, имеется заметное число ограничений ее применения в клинической практике: фаговые препараты обладают довольно высокой степенью иммуногенности, низкая жизнеспособность, сложный процесс выделения и очистки фаговых частиц. Избежать этих недостатков поможет использование цитолитических ферментов бактериофагов в качестве антибактериальных препаратов. В настоящее время актуальными задачами является поиск новых цитолитических ферментов бактериофагов, изучение их свойств и механизмов действия и создание химерных белков, или поиск вспомогательных соединений, способствующих проникновению через мембрану в случае грамположительных бактерий.

Бактериофаг фKZ эффективно инфицирует *P. aeruginosa* и может быть использован как для фаговой терапии, так и в качестве источника высокоактивных цитолитических ферментов.

Таким образом, использование цитолитических ферментов наряду с фаговой терапией является перспективным направлением в борьбе с бактериями обладающими резистентностью к антибиотикам.

Цели работы

Основной целью данной работы является исследование и оценка литических свойств нативных и мутантных форм цитолитических ферментов бактериофага фKZ, активного против бактерии *Pseudomonas aeruginosa*.

Задачи исследования

В соответствии с целью в диссертационной работе были поставлены следующие задачи:

1. Анализ границ функциональных доменов гена 181 бактериофага фKZ, кодирующий пептидогликанлизирующий фермент (ПЛФ).
2. Функциональный анализ экспрессированных вариантов ПГ181 содержащих делеции. Определение ферментативной цитолитической активности, стабильности, кинетических параметров, полученных вариантов ферментов.
3. Изучение механизмов действия эндолитического фермента ПГ144 методом внедрения точечных полиморфизмов.
4. Оценка применимости исследований данных цитолитических ферментов для практических целей

Основные положения выносимые на защиту

1. Впервые получены делеционные варианты белка ПГ181, обладающие литической активностью против *P. aeruginosa*.
2. Разработана методика, позволяющая получать растворимые формы пептидогликанлизирующих ферментов.
3. Впервые установлено наличие дублирующего активного центра у ПГ144
4. Полученные в результате работы ПЛФ могут быть использованы как перспективные энзимотики для антимикробной терапии *P. aeruginosa*.

Научная новизна и практическая значимость работы

Методом получения множественных делеционных мутантов впервые были оценены границы функциональных доменов ПЛФ ПГ181, активного против *P. aeruginosa*. На основании этих данных были получены 2 варианта этого белка активных в отношении *P. aeruginosa*. Для полученных вариантов фермента определены оптимальные условия.

Используя метод точечного мутагенеза, впервые показано наличие дублирующего активного центра у эндолизина ПГ144. Также были найдены критические аминокислотные остатки активного центра этого фермента.

Проведенная работа значительно расширила представления о цитолитических ферментах бактериофага фKZ, открывая круг возможных применений литических ферментов в качестве противомикробных агентов.

Направленный мутагенез, основанный на полученных данных, позволил значительно повысить температурную устойчивость без ущерба для процессивности и специфичности ферментов. Новые данные по уточнению строения активного центра эндолизина ПГ144, а также данные о наличии двух активных центров у данного фермента, могут быть применимы при инжиниринге новых энзимотики.

Апробация работы

Материалы диссертации были доложены на международных конференциях: Бактериофаги (Москва, 2016), Phages in interaction (Левен, Бельгия, 2008), Phage biology, ecology and therapy meeting (Тбилиси, Грузия, 2008), Перспективы фаговой терапии (Варшава, Польша, 2008), IV съезд Российского общества биохимиков (Новосибирск, 2008), III российский симпозиум "Белки и пептиды" (Пушино, 2007), XIX и XX зимних молодежных научных школах "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2007-2008), а также "Бактериофаги – теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности" (Москва, 2016).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 печатных работы, 3 из которых в журналах, индексирующихся Scopus и Web of Science.

Структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 95 страницах и содержит 26 рисунков, 8 таблиц и 183 ссылки на литературные источники.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Введение

Бактериофаг фKZ кодирует в своем геноме два белка с ПФЛ-активностью: пг181 и пг144. Пг181 это большой (2237 а.о.), мультидоменный белок, различные домены которого имеют как структурные, так и ферментативные функции. Пг181, по-видимому, образует центральную часть базальной пластинки и играет ключевую роль при инфицировании фагом клетки хозяина, поскольку включает в себя как протыкающую мембрану иглу, так и лизирующий клеточную стенку ПФЛ домен, обеспечивая проникновение фагового генома внутрь клетки. Поэтому изучение функций и структуры пг181 позволит лучше понять механизм инфицирования бактериофага фKZ. Также выделение и изучение ПФЛ домена, возможно, будет полезно для получения новых «энзимбиотиков». Пг144 является эндолизином, т.е. растворимым ферментом, который фаг использует для лизиса «изнутри». Однако, также показано его наличие в зрелой вирусной частице фага и это уникальный случай, пока не найденный у других бактериофагов. Но на этом уникальность пг144 не заканчивается - в данной работе было обнаружено и подтверждено различными методами наличие двух активных центров у данного фермента. Это исследование позволит лучше понять ферментативные механизмы действия ПФЛ и создавать на их основе новые, более эффективные средства борьбы с патогенными бактериями.

2. Делеционный мутагенез ПГ181 бактериофага фKZ

Бактериофаг фKZ семейства *Myoviridae* инфицирует грамотрицательные бактерии *P. aeruginosa*, умеренный патоген, известный повышенной устойчивостью к антибиотикам. Последовательность генома фKZ размером 280334 пар оснований и кодирующая 306 открытых рамок считывания, до недавнего времени была самой большой из известных геномов бактериофагов. Гигантские фаги рода фKZ стали объектом изучения различных генетических (Hertveldt et al, 2005), эволюционных и структурных (Fokine et al., 2007) исследований. Геном фKZ кодирует два цитолитических фермента – пг144 (260 а.о.) и пг181 (2237 а.о.) с расчетной массой 28,8 кДа и 245,8 кДа, соответственно. Анализ рамок считывания генома показал высокую степень консервативности аминокислотных остатков в С-концевой части полипептидов пг144 и пг181, характерную для класса 1 литических трансгликозилаз. Пг181 - структурный белок, закодированный в геноме фKZ, в котором был предсказан домен ПЛФ-активностью. Этот белок размером 2237 а.о. был идентифицирован в зрелой вирусной частице фага. Его аналоги были обнаружены в составе фKZ-подобных фагов EL (пг183) и 201ф2-1 (пг276), что говорит о важности его

роли в жизненном цикле бактериофага. При идентификации пептидов масс-спектрометрией, анализе подвижности пг181 в SDS-PAGE было показано, что в зрелой форме белка происходит отщепление *N*-конца, длиной 144 а.о. Эти данные также подтверждаются секвенированием белка по Эдману в *N*-концевой части (Briers et al., 2008). При анализе по нуклеотидной и аминокислотной последовательности пг181 в базах данных были идентифицированы только гомологи фKZ-подобных фагов. Далее при помощи алгоритма (Hildebrand et al., 2009) был проведен анализ элементов вторичной структуры который позволил предположить, что *N*-концевая часть белка пг181 является белком «рулетки», который несет функцию определения длины хвоста бактериофага. Это предположение объясняет высокую гидрофобность и низкую растворимость и протеолитическую устойчивость полноразмерного рекомбинантного белка пг181.

C-концевая часть пг181 (1866-2051 а.о.) имеет высокую степень сходства (66%) с каталитическим доменом пг144, эндолизина фага фKZ, который включается в лизис клетки в конце репликационного цикла для высвобождения вирионов из клетки. Пг 144 содержит дополнительный *N*-концевой пептидогликан-связывающий домен, который отсутствует у пг181. Каталитический остаток Glu¹¹⁵ в пг144 консервативен, как и в пг181 – Glu¹⁹⁰⁶. Однако «дублирующий» активный центр в пг181, скорее всего, отсутствует или имеет меньшее значение, т.к. место остатка фKZпг144 Glu¹⁷⁸ в последовательности белка фKZпг181 занимает остаток Asp¹⁹⁶⁰.

Для изучения функциональных доменов пг181 были сконструированы различные делеционные мутанты *C*-конца пг181 в соответствии с алгоритмом информационных координат аминокислотных остатков (IDIC-алгоритм) (Nekrasov, 2004) (рис. 1). Все deletированные белки синтезировали в *E. coli* с дальнейшей оценкой растворимости и активности.

Был проведен анализ информационной структуры молекулы пг181. Анализ выявил распределение сайтов повышенной плотности структурной координации (IDIC – increased density of information coordination). На протяжении всей длины любой белковой молекулы концентрация IDIC-сайтов не постоянна. Существуют участки повышенной и пониженной концентрации этих сайтов, названные соответственно ADD+ и ADD– (ADD – anomalously distributed density). Как правило, и ADD+, и ADD– участки располагаются в функционально значимых участках белковых молекул – лигандсвязывающих сайтах, эпитопах пептидных антигенов, активных центрах ферментов.

Белок пг181M3 проявлял активность в разрушении клеточной стенки по отношению к клеткам *E. coli* и таким образом оказывал токсическое действие. Растворимыми и низко токсичными по отношению к клеткам *E. coli* оказались мутанты

наименьшего размера пг181М5 - пг181М9. Растворимость белка пг181М7 значительно увеличивалась при добавлении к N-концу 17 а.о. (пг181М6). При помощи КД-спектроскопии было установлено, что растворимые делеционные мутанты выявляют преимущественно α -спиральную вторичную структуру. Для качественного подтверждения пептидогликан-гидролизующей активности каплю раствора белка наносили на газон клеток, предварительно обработанных парами хлороформа, который разрушает внешнюю мембрану, облегчая доступ к пептидогликановому слою. В качестве положительного контроля использовали лизоцим из белка куриного яйца. Образующиеся зоны лизиса вокруг нанесенной капли свидетельствует о наличии ферментативной активности и, соответственно, корректном определении белка пг181 как структурного ПЛФ фага фKZ.

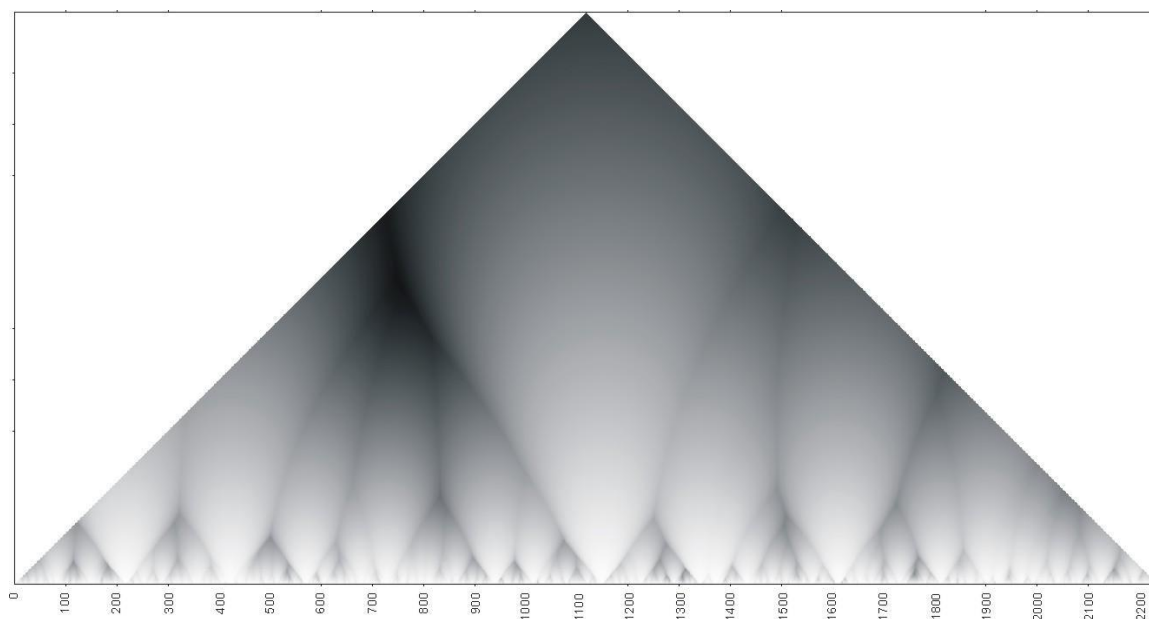


Рисунок 1. IDIC-диаграмма информационной структуры пг181.

Постепенное укорачивание с N-конца делеционных мутантов пг181 (табл. 1.) делали на основании «информационных древ» (Increased Degree of Informational Coordination between residues) последовательности белка. Ранее анализ информационной структуры белка в ряде случаев позволял проводить рациональный дизайн делеционных мутантов (Nekrasov, 2004).

Все делеционные мутанты пг181 проявляют активность, кроме пг181М9, который не образует зоны лизиса. Таким образом, можно сделать вывод, что минимальным каталитическим доменом служит последовательность а.о. 1880 - 2042 (что соответствует по размерам мутанту пг181М8, который использовали для дальнейшей характеристики ферментативной активности). По-видимому, пг181М9 входит в состав иглоподобной структуры, которая видна на крио-ЭМ реконструкции базальной пластинки фKZ и находится в центре под базальной пластинкой (Fokine et al., 2007).

Таблица 1. Основные свойства делеционных мутантов фKZ пг181.

Мутант фKZ пг181	Старт, а.о.	Конец, а.о.	Вектор	Участки клонирования	Синтез	Растворимость	Акт-ть
пг181M1	1594	2237	pET-26	<i>Nde</i> I- <i>Xho</i> I	+	-	N/A
пг181M2	1613	2237	pET-26	<i>Nde</i> I- <i>Xho</i> I	+	-	N/A
пг181M3	1661	2237	pQE-30	<i>Bam</i> H I- <i>Hind</i> III	токс.	N/A	Возм.
пг181M4	1738	2237	pET-26	<i>Nde</i> I- <i>Xho</i> I	+	-	-
пг181M5	1744	2237	pET-23	<i>Nde</i> I- <i>Hind</i> III	+	+	+
пг181M6	1863	2237	pET-26	<i>Nde</i> I- <i>Xho</i> I	+	+	++
пг181M7	1880	2237	pQE-30	<i>Bam</i> H I- <i>Hind</i> III	+	низкая	++
пг181M8	1880	2042	pQE-30	<i>Bam</i> H I- <i>Hind</i> III	+	+	++
пг181M9	2043	2237	pQE-30	<i>Bam</i> H I- <i>Hind</i> III	+	+	-

Как видно из таблицы 1, наиболее перспективными для дальнейших исследований оказались 181M6 и 181M8. Делеция осуществлялась при помощи метода ПЦР, полученные гены с сайтами рестрикции *Nde* I-*Xho* I (181M8), и *Bam*H I-*Hind* III (181M6), встраивались при помощи лигирования в вектора pET-26b, и pQE-30 соответственно. Для биосинтеза белка штамм *E. coli* AD494(DE3) трансформировали плазмидой pQE30, несущий ген делеционного мутанта 181M6, а штамм *E. coli* BL21(DE3) - плазмидой pET-26b с геном 181M8, после чего была проведена экспрессия генов и проверка на растворимость полученных продуктов. Растворимые рекомбинантные белки были очищены при помощи полигистидинного участка с использованием Ni-афинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-агарозой. Очистка обоих белковых продуктов проводилась в одну стадию с использованием ступенчатого градиента имидазола по схеме: 0 мМ имидазола при нанесении лизата клеток на колонку, 60 мМ для элюции неспецифично связанных с Ni-NTA-агарозой белков клетки и 200 мМ для элюции целевого белкового продукта, содержащего полигистидиновый участок. Чистота полученных белковых препаратов определялась при помощи ПААГ электрофореза и составила не менее 95%.

Для качественного определения пептидогликан-лизирующей активности раствор очищенных белковых препаратов (пг181M6-пг181M8) капаля на газон клеток *P. aeruginosa*, предварительно обработанных парами хлороформа для дестабилизации наружной мембраны. Лизоцим из яйца курицы наносили в качестве положительного контроля. Тесты показали, что оба мутанта образуют зоны лизиса на газоне клеток, что свидетельствует о пептидогликан-лизирующей активности.

Пептидогликан-лизирующие активности пг181M6 и пг181M8 были полностью охарактеризованы. Был проведен поиск оптимальных значений буфера для полученных пептидогликан-лизирующих ферментов. Было установлено, что значения pH и pI буфера значительно влияют на ферментативную активность белковых продуктов. Тесты

проводились в диапазоне значений от 20 до 320 мМ ионной силы и от 5,0 до 8,0 значений pH (табл. 2-3). Максимум активности обоих ферментов достигается при pH 6,2 и ионной силе в 140 мМ, что сходно с оптимальными значениями гомологичного пг144, описанного ранее: pH 6,2, ионная сила 120 мМ NaCl (Briers, 2007). Однако, в основном пг181М6 и пг181М8 активны при более низких значениях pH чем пг144, например 51% и 54% остаточной активности для пг181М6 и пг181М8 при pH 5,0 и 140мМ и 24% в случае пг144; 42% и 37% активности для пг181М6 и пг181М8 при pH 8,0 и 140мМ и 78% в случае пг144. Хотя значения оптимальной ионной силы для пг181М6 и пг181М8 и пг144 очень близки: 140 мМ и 120 мМ соответственно, пг181М6 и пг181М8 сохраняют активность при больших значениях ионной силы – вплоть до 320 мМ.

Таблица 2. Влияние значений pH и ионной силы на ферментативную активность пг181М6.

pI(мМ)/pH	5,0	5,6	6,2	6,8	7,4	8,0
20	18	30	34	55	32	33
80	21	72	61	62	39	22
140	54	45	100	71	46	37
200	23	13	88	91	31	18
260	15	8	25	35	23	15
320	12	5	14	13	16	11

Таблица 3. Влияние значений pH и ионной силы на ферментативную активность пг181М8.

pI(мМ)/pH	5,0	5,6	6,2	6,8	7,4	8,0
20	27	26	39	46	30	36
80	27	83	68	66	42	15
140	51	31	100	65	36	42
200	20	12	81	84	16	16
260	17	6	22	40	24	18
320	12	3	14	16	14	14

Ферментативные активности пг181М6 и пг181М8 были измерены, при оптимальных условиях, определенных из таблиц 2 и 3 и было проведено сравнение полученных активностей. Активность рекомбинантных ферментов была определена из линейного участка зависимости скорости реакции от количества фермента (рис. 2). Активность по отношению к клеточным стенкам, обработанных хлороформом клеток *P. aeruginosa*, составила 48090 U/мг для пг181М6 и 145040 U/мг для пг181М8. Таким образом, присутствие С-концевого фрагмента увеличивает ферментативную активность в 3 раза. Активность пг181М8 примерно в 17 раз выше активности коммерчески доступного лизоцима из яйца курицы и в 30 раз выше активности ранее описанного структурного

цитолитического фермента из бактериофага фKMV *P. aeruginosa*, но примерно в 1,5 раза ниже чем активность пг144. Сравнение с описанными ранее литическими ферментами близкородственного фKZ бактериофага фEL дает следующую картину: активность пг181M8 выше активности EL183 (аналог пг181M6 фага фKZ) примерно в 7 раз, но примерно в 2,5 раза ниже активности EL188 (аналог пг144 фага фKZ) (табл. 4) (Briers, 2007). Как указано выше, дополнительный N-концевой пептидогликан-связывающий домен приближает каталитический домен к субстрату, что объясняет более высокую ферментативную активность.

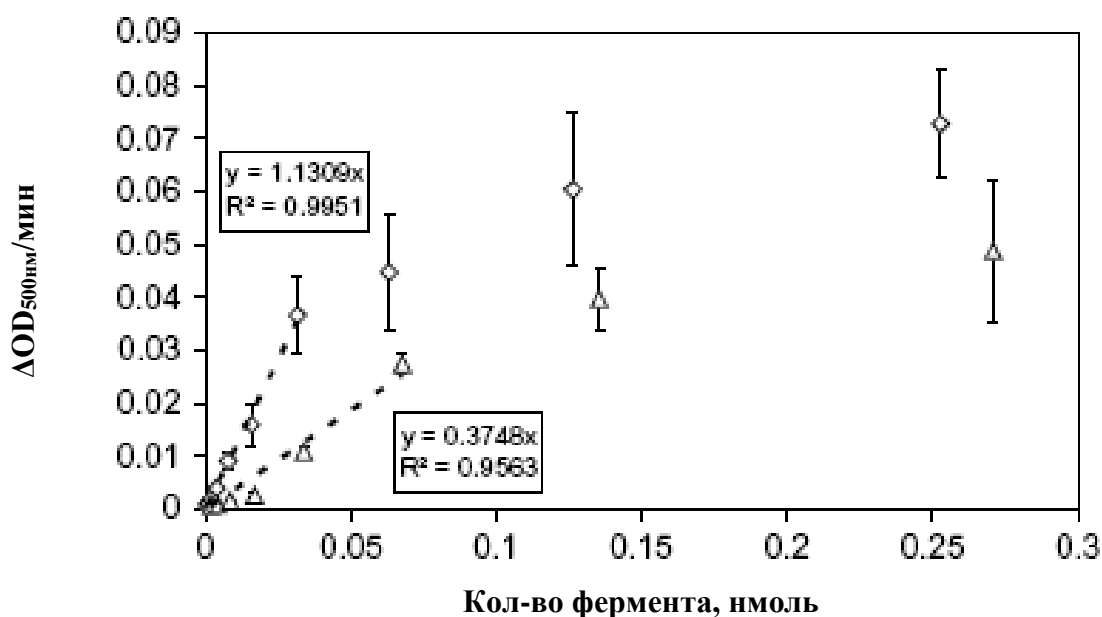


Рисунок 2. Зависимость оптической плотности от количества ферментов для пг181M6 и пг181M8 в оптимальном буфере. На рисунке отображено изменение оптической плотности $\Delta OD_{500nm}/мин$ (Y-ось) для пг181M6(ромб) и пг181M8(треугольник) (по оси x).

Таблица 4. Сравнение активностей цитолитических ферментов из различных бактериофагов.

Название фермента	Активность (U/мг)
PMG Lys (фаг фPMG1)	2310000
Пг188 (фаг фEL)	390000
Пг144 (фаг фKZ)	210000
Пг181M8 (фаг фKZ)	145000
Пг181M6 (фаг фKZ)	48090
Пг183 (фаг фEL)	19680
HEWL	8368
Пг36C (фаг фKMV)	4920

Для оценки чувствительности к термической инактивации аликвоты пг181М6 нагревали по 10 и 60 мин в диапазоне температур от 25 до 90 °С с шагом в 10 °С. Далее образцы охлаждались и остаточная активность измерялась при 25 °С. Остаточная активность после инкубирования при 90 °С в течение 10 мин составила 12%, а после инкубирования при 70 °С в течение 1 ч, фермент был полностью инактивирован, что говорит о большей термостабильности пг181М6 по сравнению с пг144, который полностью инактивировался после инкубации при 60 °С в течение 10 мин [47]. Эти результаты показывают, что большей стабильностью обладает структурный каталитический домен, которому возможно необходимо оставаться стабильным при больших величинах механических сил, действующих в процессе инфицирования. Высокая термостабильность также была обнаружена ранее у структурного лизина бактериофага фКМV *P. aeruginosa*, у которого оставалось 21% остаточной активности после инкубирования при 100 °С в течение 2 ч (Lavigne, 2004).

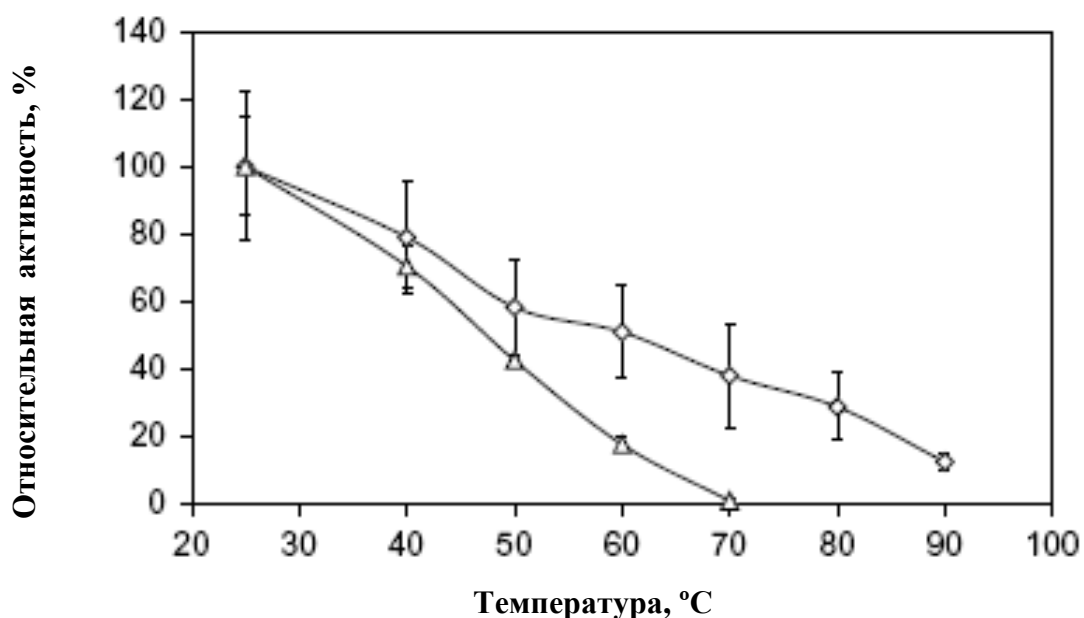


Рисунок 3. Кинетическая стабильность пг181М8. Образцы пг181М8 (50нг/30мкл) нагревались при различных температурах в диапазоне от 25 до 90 °С, в течение 10 (ромб) и 60 (треугольник) мин.

Для определения субстрат-специфичности пг181М6 были протестированы 7 различных видов грамотрицательных бактерий: *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Burkholderia solanacearum*, *Yersinia enterocolitica*. Все виды бактерий подвергаются лизису, что говорит о более широком спектре субстратов у структурного лизина чем у самого бактериофага фКZ, спектр бактерий хозяев которого намного уже и ограничивается несколькими штаммами *P. aeruginosa*. Пг144 также хорошо лизирует все представленные виды клеточные стенки

грамотрицательных бактерий обработанных хлороформом. Соотношение ферментативной активности пг144 и пг181М6 на различных типах бактерий показывает, что пг144 более активен на всех протестированных субстратах. Наибольшая специфичность пг144 наблюдалась по отношению к *P. aeruginosa* (коэфф. 7,7), в то время как активность пг144 и пг181М6 по отношению к *Y. enterocolitica* находится практически на одном уровне (коэфф. 1,1) (рис. 4). Это позволяет предположить, что приобретение пептидогликан-связывающего домена пг144 и/или различия в каталитическом домене оказывают влияние на специфичность по отношению к субстрату.

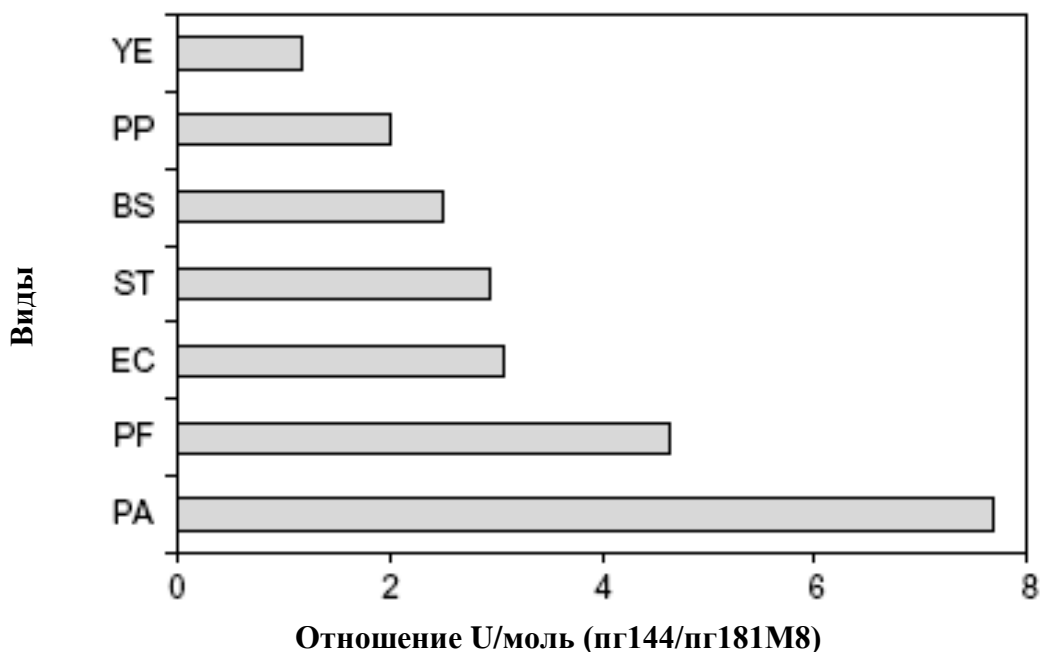


Рисунок 4. Сравнение активностей пг144 к пг181М8. Представлено отношение активности эндолизина (пг144) и домена структурного лизина (пг181М8) фага фKZ по отношению к различным видам бактерий (YE, *Yersinia enterocolitica*; PP, *Pseudomonas putida*; BS, *Burkholderia solanacearum*; ST, *Salmonella typhimurium*; EC, *Escherichia coli*; PF, *Pseudomonas fluorescens*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*)

В течение репликационного цикла, бактериофаг пересекает клеточную стенку бактерии дважды. Для обеспечения проникновения через клеточную стенку большинство бактериофагов имеют в составе ДНК две области, кодирующие пептидогликан-лизирующие ферменты. При анализе последовательности генома бактериофага фKZ было обнаружено 2 пептидогликан-лизирующих фермента: пг144 (260 а.а.) и пг181 (2273 а.а.), обладающих высокой степенью гомологии (66%) каталитических доменов. Все ранее доступные данные указывают на то, что пг144 является эндолизином бактериофага фKZ.

Основываясь на масс-спектрометрической идентификации пг181 в зрелой вирусной частице бактериофага фKZ и биохимической характеристике пептидогликан-

лизирующего домена, расположенного недалеко от С-конца пг181, можно предположить, что пг181 участвует в процессе инфицирования бактериофагом фKZ клетки хозяина. Эта гипотеза подтверждается тем, что пг181 составляет часть базальной пластинки хвоста бактериофага фKZ, что визуализируется при помощи криоэлектронной микроскопии (Fokine, 2007) и, по-видимому, облегчает проникновение хвостовой трубки бактериофага через клеточную стенку и мембрану бактерии путем локальной деградации пептидогликана, что впоследствии позволяет бактериофагу перенести свою ДНК в цитоплазму клетки хозяина.

При рассмотрении ферментов бактериофагов, лизирующих бактерии-хозяина, в качестве потенциальных «энзибиотиков» для профилактики и лечения бактериальных инфекций, наиболее привлекательным выбором будут ферменты с высокой стабильностью (или отдельные домены ферментов). Например, рекомбинантное соединение пептидогликан-связывающего домена пг144 и каталитического домена пг181 может обеспечить высокую активность и стабильностью фермента в сочетании с специфическим связыванием с конкретным патогеном.

3. Исследование активного центра пг144 из бактериофага фKZ

При анализе последовательности гена 144 в системе BLAST, было найдено 62 известных и гипотетических аминокислотных последовательности со степенью гомологии больше 30%. На основании анализа гомологичных последовательностей был предложен каталитический остаток - Glu¹¹⁵, что в дальнейшем было подтверждено данными рентгеноструктурного анализа (Fokine, 2008). Анализ рентгеноструктурных данных показал, что пространственное расположение Glu¹¹⁵ в активном центре не оптимально и вероятно наличие "неканонического" дублирующего остатка, участвующего в катализе. Остаток His²⁰⁰, также расположенный в активном центре и обладающий пониженной электронной плотностью (Fokine, неопубликованные данные), был предложен в качестве второго ключевого остатка, обеспечивающего каталитическую активность. Так же было обнаружено, что высококонсервативный остаток Tyr¹⁹⁷ расположенный в -1 субсайте, имеет влияние на каталитическую активность фермента.

Пространственная структура 3BKV фKZ пг144 показывает высокую степень сходства каталитического домена со структурой аналогичного домена трансгликозилазы Slt70 из *E. coli* (Van Asselt, 1999). Положение и ориентация каталитического аминокислотного остатка Glu¹¹⁵ в пг144 сходно с положением для остатка Glu⁴⁷⁸ в Slt70. Ранее был предложен механизм катализа трансгликозилазы Slt70, отличающийся от классического механизма наличием дополнительного аминокислотного остатка Tyr⁵⁹⁷,

находящимся в каталитическом центре фермента и участвующем в катализе. Функция Tyr⁵⁹⁷ заключается в активации каталитического аминокислотного остатка Glu⁴⁷⁸ через образование водородной связи с ним, что увеличивает отрицательный заряд на Glu⁴⁷⁸ и облегчает протонирование *O*-гликозидной связи. В полипептиде фKZ пг144 имеется остаток Tyr¹⁹⁷, расположение и ориентация которого сходны с Tyr⁵⁹⁷ в Slt70. Высокая степень пространственной гомологии позволяет предположить, что катализ фKZ пг144 происходит по варианту, аналогично механизму Slt70.

Основная гипотеза, объясняющая частичное сохранение активности фермента при замене основного каталитического остатка, предполагает наличие двух каталитических участков – главного Glu¹¹⁵/Tyr¹⁹⁷ и дублирующего Glu¹⁷⁸/Tyr¹⁴⁷. Расположение аминокислот предполагаемого второго активного центра относительно цепи пептидогликанового субстрата похоже на конформацию аминокислотных остатков в основном активном центре. При совмещении положения при помощи вычислений минимальных среднеквадратичных отклонений для боковых цепей остатков «основного» и «дублирующего» активного центров была получена практически идентичная позиция (рис.5).

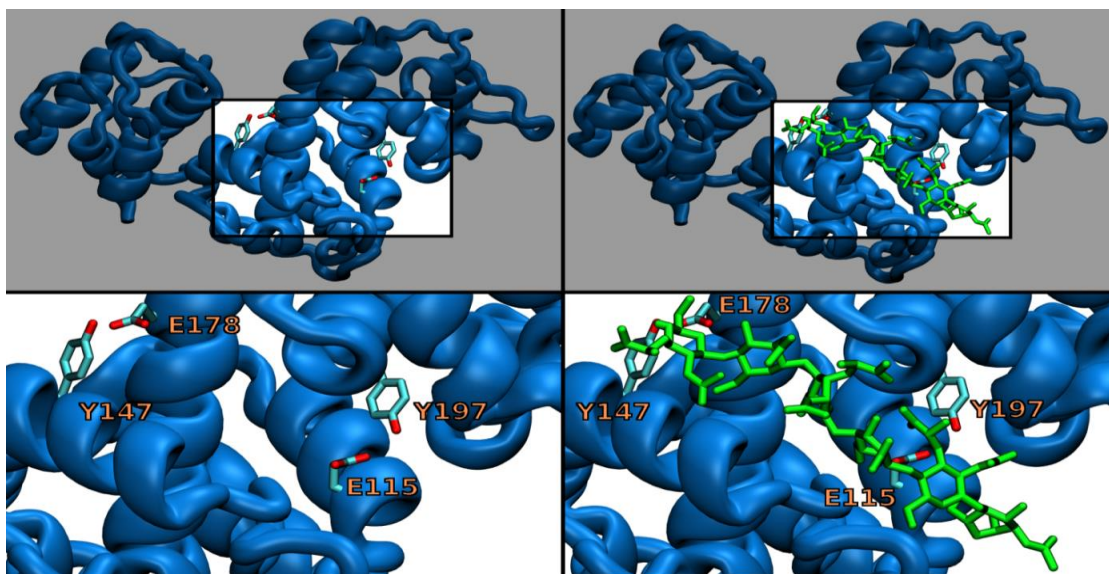


Рисунок 5. Боковые цепи аминокислотных остатков, формирующие активные центры фKZ пг144 и возможное расположение молекулы NAM-NAG. На верхних рисунках изображен общий вид фермента без субстрата (сверху слева) и с субстратом (сверху справа). На нижних рисунках крупным планом изображены сайты связывания фермента без субстрата (снизу слева) и с субстратом (снизу справа).

Чтобы определить роль аминокислотных остатков, которые участвуют в работе активного центра фKZпг144, были получены одиночные и двойные мутанты. Полученные мутанты не показали изменений вторичной структуры и растворимости относительно

фермента дикого типа (по данным связывания с аффинной смолой и спектроскопии кругового дихроизма). Очистку мутантных белков проводили с помощью Ni-хелатной хроматографии без существенных изменений. Полученные препараты мутантных белков содержали 3-6 мг белка с чистотой >90%.

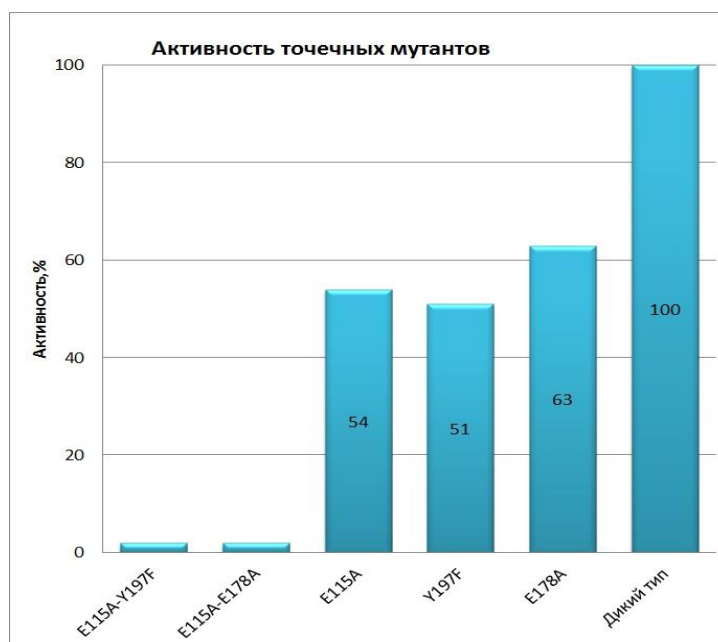


Рисунок 6. Диаграмма активностей одиночных и двойных точечных мутантов фKZ пг144 в сравнении с ферментом дикого типа, принятой за 100%.

Одиночные мутанты E¹¹⁵A, E¹⁷⁸A и Y¹⁹⁷F по каждому из остатков проявляли активность 54, 63 и 51%, соответственно, в сравнении с ферментом дикого типа фKZпг144 (рис. 6). Все мутанты проявляли максимальную активность при том же составе буфера, что и фермент дикого типа (pH=6.2 и I=120 mM NaCl), далее все ферментативные реакции проводили в этих условиях. Замена аминокислотных остатков His²⁰⁰ приводила к снижению активности на 20-30%, что подтверждает предположение об участии остатков гистидина в координации субстрата.

Однако, гипотеза о «дублирующем» активном центре не объясняет исчезновение активности у двойного мутанта (E¹¹⁵A, Y¹⁹⁷F), в котором заменены аминокислотные остатки одного активного центра, в то время как другой не изменен. Чтобы объяснить это явление, необходимо было понять, как изменяется конформация белка, а также взаимодействие белка с субстратом при точечных заменах аминокислотных остатков.

При получении пространственной структуры комплекса фKZпг144 с субстратом, была использована хитотетраоза, которая довольно сильно отличается по структуре от нативного субстрата. Для вычисления конформаций ферменты связанного с субстратом был проведен молекулярный докинг с N-ацетилмурамоил-N-ацетилглюкозамином, как минимальной связывающейся единицей нативного субстрата.

Методами докинга был получен набор возможных конфигураций реакционных комплексов связывания естественного субстрата N-ацетилмурамоила-N-ацетилглюкозамина с ферментом. На основании структуры 3BKV (Fokine, 2008) (комплекс фKZпг144 с синтетическим субстратом N-ацетил-D-глюкозамином) можно предполагать, что данный субстрат будет располагаться аналогичным образом

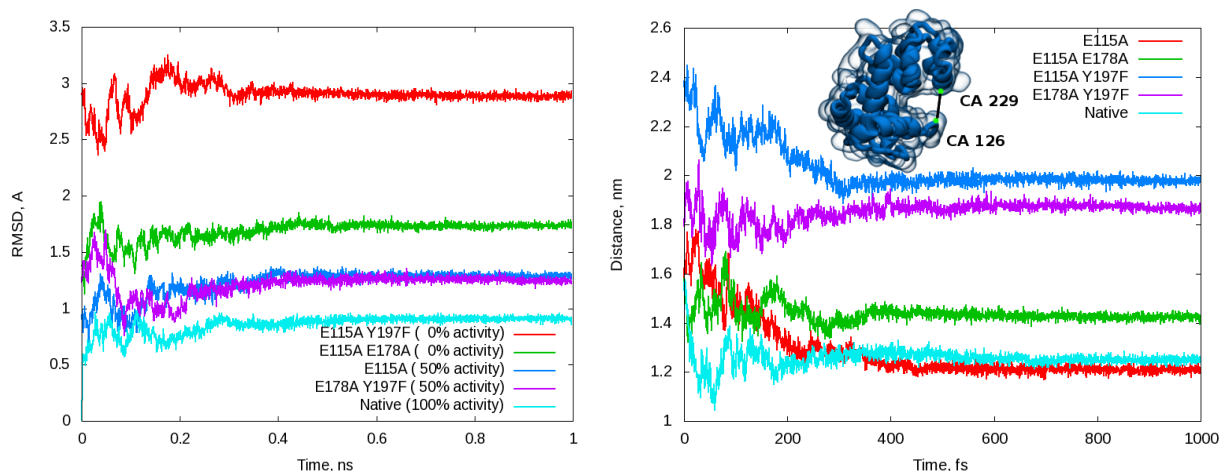


Рисунок 7. А) Среднеквадратичное отклонение белкового остова трансглюкозилаз во время заморозки до 77К. Вычисление отклонения проводилось только для участка, контактирующего с субстратом. В) Изменение расстояния между Cα атомами 126 и 229 аминокислот во время заморозки до 77К.

Была проведена дополнительная оценка изменения конформации белка для всех мутантов методом молекулярно-динамического анализа конфигурации бороздки, путем оценки внешнего вида бороздки (рис. 7А) и расстояний между Cα (атомами 126 и 229 а.о. (рис. 7Б). В случае некоторых мутаций, область активного центра фKZпг144 довольно сильно изменяет свою конформацию, что видимо обусловлено изменением взаимодействия между боковыми цепями а.о., которые формируют активный центр. Например, при мутациях основного активного центра изменяется форма бороздки, в которую укладывается субстрат, что может вызывать снижение аффинности белка к субстрату и, как следствие, реакционной способности. Из рисунка 7 следует, что двойная мутация по основному активному центру приводит наиболее сильному «открытию» бороздки.

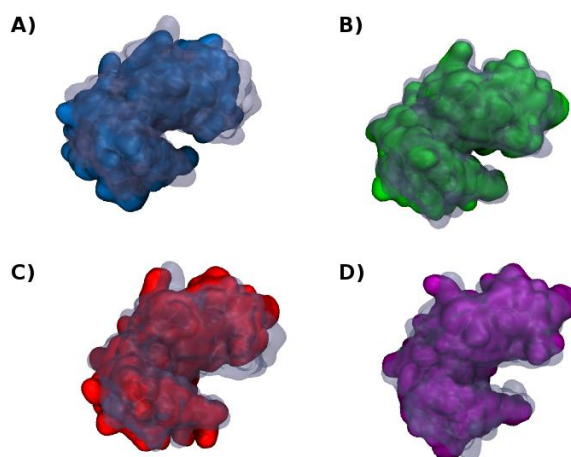


Рисунок 8. Моделирование поверхности мутантных форм фKZ пг144 в сравнении с нативной формой A) $E^{115}A$, B) $E^{115}A/E^{178}A$, C) $E^{115}A/Y^{197}F$, D) $E^{178}A/Y^{197}F$. Полупрозрачная поверхность принадлежит нативной структуре фермента.

Для каждого мутанта было вычислено распределение зарядов на поверхности, доступной растворителю. Вычисление поверхностного заряда глобулы белка фKZ пг144 показывает, что бороздка связывания субстрата имеет преимущественно положительный заряд. Замены аминокислотных остатков в активных центрах также в ряде случаев приводят к сильному изменению распределения зарядов (рис.8). Мутант $E^{115}A - Y^{197}F$ не обладает активностью, несмотря на то, что один из реакционных центров остался не измененным. Двойная мутация близкорасположенных аминокислот привела к сильному изменению конформации связывающей субстрат поверхности, а также смене заряда в этой области бороздки (рис.9). Такое изменение свойств поверхности, вероятно, не позволяет этому мутанту фKZ пг144 связывать субстрат, и фермент полностью теряет активность.

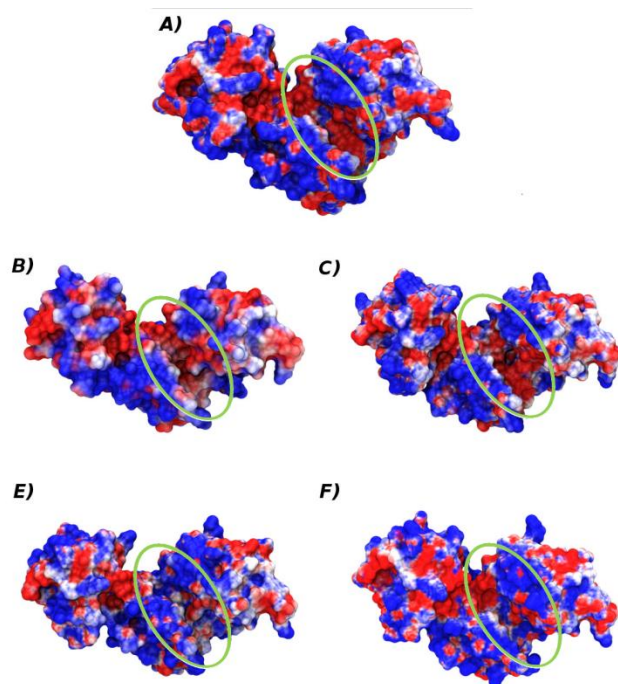


Рисунок 9. Распределение зарядов на поверхности мутантных изоформ фKZ пг144. Выделен участок, связывающий субстрат. А) нативная структура, В) $E^{115}A$, С) $E^{178}A/Y^{197}F$, D) $E^{115}A/E^{178}A$, E) $E^{115}A Y^{197}F$.

Мы предполагаем, что в полипептидной цепи трансгликозилазы фKZ пг144 существует два активных центра: основной E^{115}/Y^{197} и дублирующий E^{178}/Y^{147} . Участок молекулы пептидогликана может связаться с бороздкой на глобуле фермента двумя способами (рис.10). Предположительно, направление укладки субстрата имеет значение для протекания реакции и определяет, какой из активных центров проведет реакцию деградации субстрата. Таким образом, при инактивации одного из участков активного центра соответствующее направление укладки субстрата не будет сопровождаться ферментативным расщеплением.

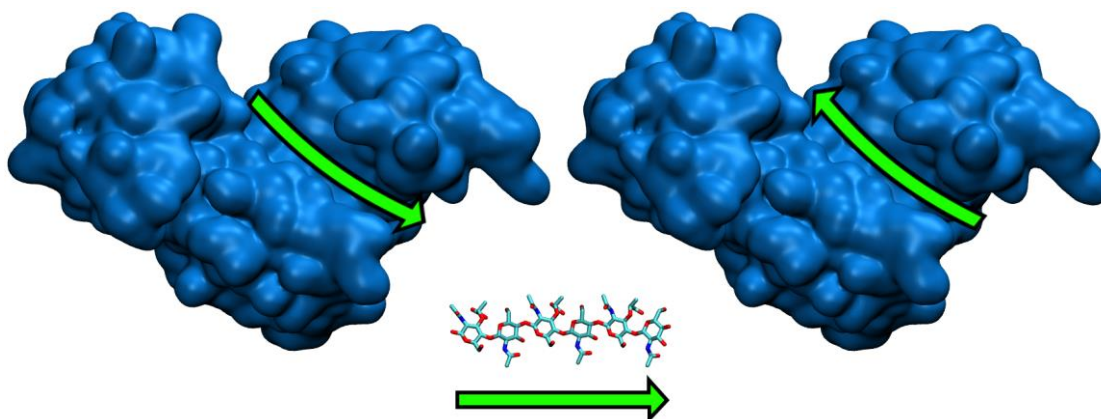


Рисунок 10. Схема возможных направлений укладки субстрата в бороздку фKZ пг144. Субстрат (*N*-ацетилмурамоил-*N*-ацетилглюкозамин) показан над стрелкой.

Ключевой аминокислотой осуществляющей атаку на β 1-4 гликозидную связь является Glu. При его замене происходит полная инактивация одного из активных

центров, что приводит к общему снижению активности фермента в два раза. Одиночные мутации по остатку Туг также приводят к снижению активности фермента. В пространственной модели активного центра Glu и Туг обращены друг к другу и образуют водородную связь. Большую часть времени симуляции методом молекулярной динамики они скоординированы таким же образом. Можно предположить, что Туг фиксирует Glu в наиболее выгодном с точки зрения протекания реакции положении. Замена Туг на Phe приводит к смещению боковой цепи Glu в сторону от выгодного положения и изменению активности мутантного сайта. В эксперименте с двойным мутантом E¹⁷⁸A/Y¹⁹⁷F показано, что инактивации сайта не происходит. Несмотря на выключение одного из активных центров, вызванное заменой Glu, второй активный центр сохраняет активность без остатка Туг. Двойной мутант E¹¹⁵A/E¹⁷⁸A не проявляет активности, так как произведена замена атакующих остатков глутамата в обоих реакционных центрах.

Мутант E¹¹⁵A/Y¹⁹⁷F не обладает активностью, несмотря на то, что один из реакционных центров остался в нативном состоянии. Двойная мутация близкорасположенных аминокислот привела к сильному изменению конформации связывающей субстрат поверхности (рис.8), а также смене заряда в этой области бороздки (рис.9). Такое изменение свойств поверхности, вероятно, не позволяет фKZ пг144 связывать субстрат, и фермент полностью теряет активность.

Полученные данные подтверждают гипотезу о наличии двух активных центров у фермента фKZ пг144 и проясняют механизм действия данного фермента. Дополнительный активный центр, вероятно, появился в ходе эволюционного развития, на что указывает высокая гомология структур активных центров.

Постоянно растущее число полирезистентных бактерий приводит к исчерпанию низкомолекулярных антибиотиков, что диктует поиск новых методов антимикробной терапии. Альтернативой антибиотикам может быть использование «энзибиотиков» - токсических для бактерий ферментов, в том числе пептидогликан-гидролаз. Детальное понимание механизмов действия пептидогликан-лизирующих ферментов позволит создавать на их основе новые, более эффективные средства борьбы с патогенными бактериями. Источником цитолитических ферментов может служить пул существующих бактериофагов. В данной работе был проведен поиск ПЛФ и модификация нативных ферментов, для придания им новых свойств.

Несмотря на законченный результат, разработанный подход позволит проводить рациональный дизайн ПЛФ. Полученные в данной работе ферменты потенциально могут найти применение в качестве «энзибиотиков» для антимикробной терапии против *P. aeruginosa*. Делеционные мутанты ПГ181 устойчивы при повышенной температуре и

обладают широким спектром действия, а также высоким уровнем активности. Данные структуре активного центра и наличии второго активного центра у ПГ144 в перспективе позволят создать новые ферменты с повышенной активностью. Также возможно применение используемых методов к аналогичным ПЛФ.

ВЫВОДЫ

1. Установлены границы функциональных доменов пг181, что позволило получить делеционные варианты этого белка, обладающие литической активностью против *P. aeruginosa* и отличающихся от нативного белка повышенной термостабильностью и активностью.
2. Разработан протокол экспрессии и очистки, позволяющий получить растворимые формы ПЛФ не токсичных для клеток штаммов продуцентов.
3. Установлена детальная структура активного центра пг144 и впервые показано наличие у него дублирующего активного центра, что открывает путь к конструированию эндолизиннов на основе этого белка.
4. Получены новые ПЛФ, которые могут быть использованы как перспективные энзимотики для антимикробной терапии *P. aeruginosa*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи

1. Мирошников К.А., Чертков О.В., Назаров П.А., Месянжинов В.В., Пептидогликанлизирующие ферменты бактериофагоги - перспективные противобактериальные агенты, Успехи биологической химии, 2006, т. 46, с. 65-98.
2. Briers Y, Miroshnikov K, Chertkov O, Nekrasov A, Mesyanzhinov V, Volckaert G, Lavigne R., The structural peptidoglycan hydrolase gp181 of bacteriophage phiKZ, Biochem Biophys Res Commun., 2008, v. 374, № 4, p. 747-51.
3. Чертков О.В., Чупров-Неточин Р.Н., Легоцкий С.В., Сыкилинда Н.Н., Шнейдер М.М., Иванова М.А., Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Буркальцева М.Б., Кострюкова Е.С., Лазарев В.Н., Клячко Н.Л., Мирошников К.А., Свойства пептидогликанлизирующего фермента бактериофага pmg1 pseudomonas aeruginosa, Биоорганическая химия, 2011, том 37, № 6., с. 807-814.
4. Чертков О.В., Легоцкий С.А., Сыкилинда Н.Н., Упоров И.В., Армеев Г.А., Шайтан А.К., Клячко Н.Л., Мирошников К.А., Дублирующий активный центр в структуре эндолитической трансгликозилазы gp144 бактериофага phiKZ, 2017, Acta Naturae, том 9, № 1(32), с. 87-94.

2,3,4 - статьи в журналах, индексируемых в базе данных Web of Science

Тезисы докладов и материалы конференций

1. Чертков О.В., Мирошников К.А. "Цитолитические ферменты phiKZ-подобных бактериофагов Pseudomonas aeruginosa" XIX зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 7-9 февраля 2007.
2. Чертков О.В., Некрасов А.Н., Мирошников К.А. "Цитолитические ферменты гигантских бактериофагов P. aeruginosa" III российский симпозиум "Белки и пептиды", Пушкино, 16-21 сентября 2007.
3. Чертков О.В., Некрасов А.Н., Мирошников К.А. "Пептидогликанлизирующие ферменты Myoviridae бактериофагов" XX зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 11-15 февраля 2008.
4. Чертков О. В., Мирошников К. А. «Точечный мутагенез активного центра литической трансгликозилазы бактериофага phiKZ, gp144» IV съезд Российского общества биохимиков, Новосибирск, 11-15 мая 2008.

5. Мирошников К.А., Чертков О.В., Чупров-Неточин Р.Н., Месянжинов В.В. "Применение пептидогликан-лизующих ферментов бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa* для обнаружения и контроля патогена" IV съезд Российского общества биохимиков, Новосибирск, 11-15 мая 2008

6. Miroshnikov K., Chertkov O., Chuprov-Netochin R., Mesyanzhinov V. "Peptidoglycan-lysing enzymes of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages as potential antibacterials" конференция "Перспективы фаговой терапии" в рамках Польско-Российских мероприятий, посвященных 50-летию сотрудничества Российской и Польской академий наук". Варшава, 9 сентября 2008.

7. Filchikov M.V., Domashin A.I., Sykilinda N.N., Chertkov O.V., Lavigne R., Bernal R.A., Miroshnikov K.A. "Comparative genomics and capsid EM-reconstruction of YuA-like and KMV-like bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*" Eliava-2008: Phage Biology, Ecology and Therapy Meeting, Tbilisi, Georgia June 12-15, 2008.

8. Chertkov O., Legotsky S., Klyachko N., Miroshnikov K. «Point mutagenesis of an active site of the bacteriophage phiKZ lytic transglycosylase, gp144» Phages in Interaction II conference, Leuven, Belgium, December 19 2008.

9. Легоцкий С.А., Левашов П.А., Чертков О.В., Мирошников К.А., Левашов А.В., Клячко Н.Л. "Влияние соединений различных классов на лизис клеточных стенок бактерий под воздействием бактериолитических ферментов" XV Международной конференция студентов, аспирантов и молодых учёных по фундаментальным наукам "ЛОМОНОСОВ - 2008", Москва, 8-11 апреля 2008.

10. O.V. Chertkov, G.A. Armeev, I.V. Uporov, S.A. Legotsky, N.N. Sykilinda, A.K. Shaytan, N.L. Klyachko, and K.A. Miroshnikov "Dual active site in the transglycosylase gp144 of bacteriophage phiKZ" международная конференция "Бактериофаги – теоритические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности", Москва, 13-15 октября 2016.