

УДК 577.152.3:579.234

ЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ СТАФИЛОКОККОВЫХ ФАГОВ: ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ И СТАБИЛЬНОСТЬЮ

Л.Ю. Филатова, Д.М. Донован*, Д.А. Фостер-Фрей, В.Г. Пугачев**,
Е.В. Кудряшова, Н.Л. Клячко

(кафедра энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; e-mail: luboff.filatova@gmail.com)

Литические ферменты бактериофагов K, phi11 и phi80a способны лизировать (разрушать) клетки антибиотикоустойчивых штаммов *Staphylococcus aureus*, поэтому являются перспективными антимикробными агентами. Исследована стабильность рекомбинантных лизинов фагов K, phi11, phi80a в условиях хранения и функционирования, а также ее взаимосвязь с вторичной структурой ферментов. Показано, что чем меньше содержание неупорядоченных структур в молекулах ферментов, тем выше стабильность (время полуинактивации). При температуре хранения (22°C) наилучшую стабильность проявляет бета-структурный лизин фага phi11. Альфа-спиральный лизин фага K и лизин фага phi80a с разупорядоченной вторичной структурой менее стабильны.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, фаговые лизины, вторичная структура, стабильность.

Для организма человека грамположительная бактерия *Staphylococcus aureus* является опасным патогеном, быстро вырабатывающим устойчивость к антибиотикам. Помимо совершенствования существующих методов лечения стафилококковых инфекций необходим поиск альтернативных способов противобактериального лечения. Одним из перспективных путей является использование цитолитических ферментов бактериофагов (лизины, лизоцимы), продуцируемых бактериофагами в процессе жизненного цикла [1, 2].

Лизины фагов K (LysK), phi11 (LysPhi11) и phi80a (LysPhi80a) лизируют клетки антибиотикорезистентных штаммов *S. aureus* [3, 4] и представляют интерес как потенциальная основа для разработки лекарственных препаратов. Исследование термостабильности и активности ферментов в различных условиях определяет возможность их практического использования. Структура молекул ферментов является фактором, определяющим кинетическое поведение биокатализаторов. К настоящему моменту трехмерные структуры лизинов фагов K, phi11, phi80a не получены из-за сложности их кристаллизации. Вместе с тем исследование вторичной структуры является достаточно информативным для анализа процессов инактивации ферментов. Метод спектроскопии кругового ди-

роизма прост в исполнении и не требует сложной пробоподготовки. Цель работы – исследование активности и стабильности лизинов фагов K, phi11, phi80a в условиях хранения и функционирования, а также выявление взаимосвязи между вторичной структурой и стабильностью.

Материалы и методы

Материалы. Рекомбинантные лизины фагов K (YP_024461), phi11 (YP_500516.1), phi80a (ABF71642.1), содержащие шестигистидиновые последовательности на С-концах молекул, получены в соответствии с методиками [3, 4]. Ферменты хранили в буферном растворе (50 мМ фосфат натрия, 300 мМ хлорид натрия, 250 мМ имидазол, 30%-й глицерин, pH 8,0) в концентрации 11,0–20,0 мг/мл при –20°C.

Культуру бактерий *S. aureus* выращивали до экспоненциальной фазы ($4,0 \times 10^8$ клеток/мл) на L-бульоне, автоклавировали в течение 30 мин при 0,6–0,7 атм, остывшую суспензию осаждали центрифугированием при 9000 об/мин в течение 20 мин, осадок клеток дважды промывали физиологическим раствором. Полученную суспензию проверяли на наличие живых бактерий путем высева образцов на агаризованные питательные среды. Автоклавирование клеток *S. aureus* про-

*Институт природных ресурсов, Сельскохозяйственный центр Бельвилля, США; **Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирск, Россия.

водили для обеспечения безопасности работы с данным микроорганизмом. Сохранение целостности клеточных стенок *S. aureus* было подтверждено методом электронной микроскопии. Идентичность кинетических параметров фермента при использовании для измерения его активности живых и автоклавированных клеток подтверждена экспериментально.

Для приготовления буферных растворов использовали Трис, фосфат калия, цитрат калия, соляную кислоту, гидроксид калия фирмы «Sigma».

Проведение электрофореза. Электрофорез выделенных и очищенных препаратов ферментов проводили по стандартной методике [5].

Определение активности ферментов. Активность ферментов определяли при помощи метода турбидиметрии. В 20 мМ калий-фосфатном буфере с pH 7,5 готовили суспензию клеток *S. aureus* с оптической плотностью, равной 0,6 ед. погл. при длине волны 600 нм. К 0,5 мл суспензии клеток добавляли 2,5–10,0 мкл раствора фермента (0,4 мг/мл) и регистрировали уменьшение оптической плотности клеточной суспензии во времени при 37°C. Скорость реакции определяли как изменение оптической плотности в единицу времени (за вычетом фона) и выражали в $A_{600} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$.

Исследование влияния pH среды на активность ферментов. Клетки *S. aureus* суспендировали в универсальном буфере (20 мМ Трис, 20 мМ калий-фосфат, 20 мМ калий-цитрат, pH 6,0–10,0, $A_{600} = 0,6$ ед. погл., 37°C), к 0,5 мл клеточной суспензии добавляли 10 мкл раствора фермента (0,4 мг/мл) и измеряли активность.

Исследование влияния NaCl на активность ферментов. Клетки *S. aureus* суспендировали в 20 мМ калий-фосфатном буфере ($A_{600} = 0,6$ ед. погл.), содержащем NaCl (0,0–1,0 М), к 0,5 мл клеточной суспензии добавляли 10 мкл раствора фермента (0,4 мг/мл) с последующим измерением активности при температуре 37°C.

Исследование стабильности ферментов. Растворы ферментов (0,4 мг/мл) инкубировали при заданных условиях (температура 4, 22 и 37°C; pH 6,0–9,0; концентрация NaCl 10–500 мМ) в течение определенных промежутков времени с последующим отбором аликвот растворов для измерения активности в стандартных условиях.

Исследование вторичной структуры ферментов методом КД-спектроскопии. Спектры кругового дихроизма ферментов регистрировали в кварцевой ячейке с длиной оптического пути 1 мм, измерения проводили в дальней УФ-области (195–260 нм) на приборе «Jasco J815» со скоростью сканирования 2 нм/с. Перед снятием спектров КД растворы ферментов (0,4 мг/мл) пропускали через фильтр шприцевой «Millex» («Millipore») с диаметром пор 0,22 мкм. Определение содержания элементов вторичной структуры проводили анализом спектров при помощи программы CDNN [6].

Результаты и их обсуждение

Лизины фагов K, phi11, phi80a являются моно-субъединичными белками с молекулярной массой ~55 кДа (рис. 1, табл. 1). Они способны разрушать клетки не только *S. aureus*, но и других стафилококков (табл. 1). Ферменты были очищены с использованием металл-аффинной хроматографии (Ni-NTA). Методом электрофореза в денатурирующих условиях показано, что чистота полученных белковых препаратов более 90% (рис. 1). Молекулы лизинов имеют модульное строение и содержат по два каталитических (CHAP, Amidase) домена и одному субстратсвязывающему (SH3_5) домену (рис. 1). Несмотря на сходство в третичной структуре, молекулы ферментов обладают разными величинами литической активности по отношению к *S. aureus* (штамм 209В 580). Наиболее активным (37°C, pH 7,5) является фермент LysK, обладающий значением активности,

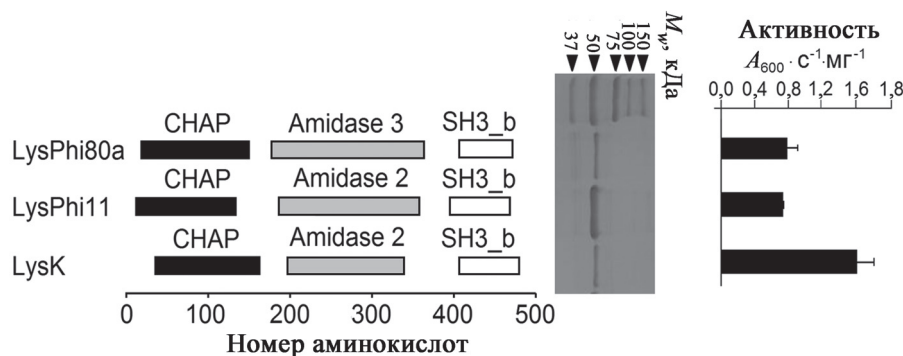


Рис. 1. Схематическое изображение модульной организации, электрофореграммы и величин удельной активности лизинов фагов phi80a, phi11, K

Т а б л и ц а 1

Свойства молекул рекомбинантных стафилолитических ферментов

Фермент	Лизируемые бактерии [3, 4]	M_w , кДа	pH _{опт}
LysK	<i>S. aureus</i> , <i>S. chromogenes</i>	55,8	6,0–9,5
LysPhi80a	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. hyicus</i>	54,9	6,5
LysPhi11	<i>S. simulans</i> , <i>S. xylosus</i>	55,1	6,5

равным $1,6 A_{600} \cdot c^{-1} \cdot mg^{-1}$; активность лизинов фагов phi11 и phi80a приблизительно вдвое ниже (рис. 1).

Важным моментом при исследовании стабильности ферментов является подбор условий, при которых исследуют стабильность. Для хранения выбрали два значения температуры: 22°C (комнатная температура) и 4°C (температура хранения большинства белковых препаратов). Интервалы значений pH и концентрации соли (хлорида натрия) подбирали таким образом, чтобы все три фермента при выбранных параметрах среды имели ненулевую активность. Для этого исследовали зависимость активности лизинов от pH и концентрации соли. В результате анализа экспериментальных данных выбраны значения pH в интервале 6,0–9,0 [7, 8], (табл. 1) и концентраций NaCl в интервале 0–500 мМ (рис. 2). За условия функционирования приняли физиологические значения температуры (37°C) и pH среды (pH 7,5). В качестве количественного критерия оценки стабильности было принято значение времени периода полуинактивации ферментов.

В наших работах ранее приводились данные, характеризующие термостабильность лизинов фагов K, phi11, phi80a, однако стабильность LysK и LysPhi80a охарактеризована лишь при ограниченном наборе условий [7–9].

В условиях функционирования (37°C, концентрация фермента 0,4 мг/мл, pH 7,5) самым стабильным является фермент LysK, который теряет половину активности за 360 мин, в то время как значения времени полуинактивации лизинов фагов phi11 и phi80a существенно ниже (10 и 1 мин соответственно). Полученные закономерности можно интерпретировать с помощью анализа вторичных структур ферментов. Спектры КД (37°C, pH 7,5) всех трех лизинов приведены на рис. 3, а результаты их деконволюции – в табл. 2. КД-спектр фермента LysK является типичным для альфа-спиральных белков с локальными минимумами с отрицательным значением эллиптичности при 208 и 222 нм и положительным значением эллиптичности при 195 нм. КД-спектры лизинов фагов phi11 и phi80a характерны для белков с пре-

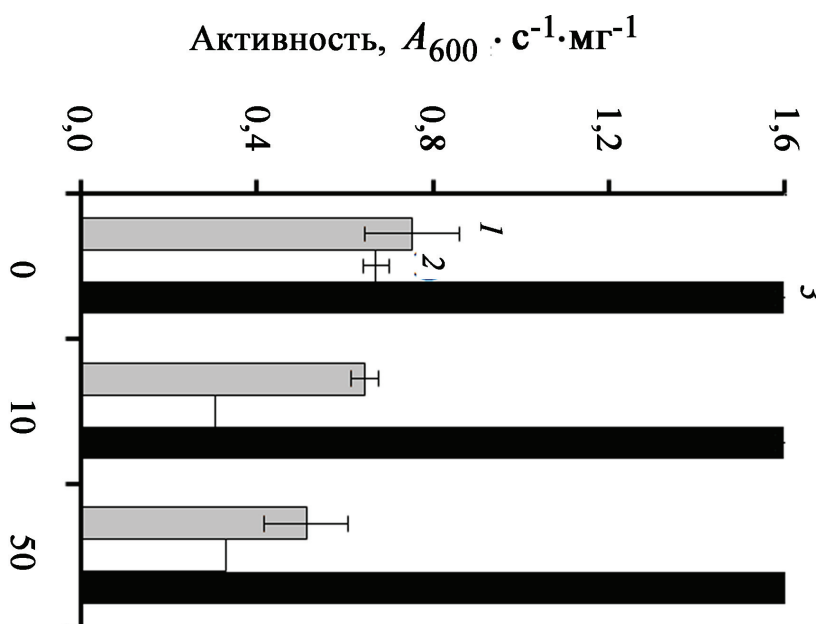


Рис. 2. Зависимость активности лизинов фагов phi80a (1), phi11 (2), K (3) от концентрации хлорида натрия. Условия эксперимента: 37°C, pH 7,5, концентрация фермента 8 мкг/мл

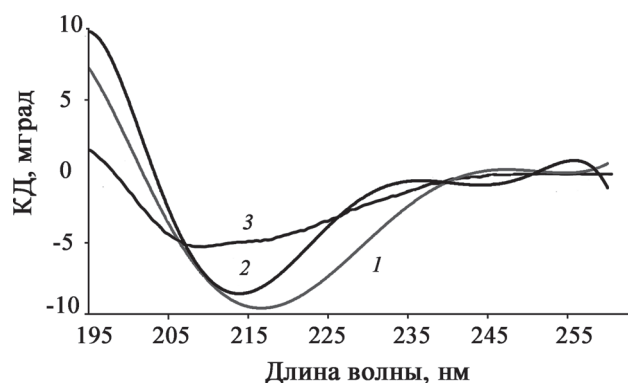


Рис. 3. Спектры КД лизинов фагов phi80α (1), phi11 (2), К (3). Условия эксперимента: 37°C, pH 7,5, концентрация фермента 0,4 мг/мл

обладанием бета-структур с минимумом в районе 216 нм и положительным значением эллиптичности при 195 нм. Однако молекулы этих лизинов содержат большое количество (более 40%) неупорядоченных структур, т.е. они находятся в денатурированном (развернутом) состоянии. Это объясняет невысокие значения времени полуинактивации и активности LysPhi11 и LysPhi80α. Наиболее активным (рис. 2) и стабильным в условиях функционирования является фермент LysK, молекулы которого находятся в неденатурированном состоянии и характеризуются низким (относительно лизинов фагов phi11, phi80α) содержанием неупорядоченных структур (24,7%).

Зависимость времени потери половины активности ферментами в разных условиях хранения (температура, pH и концентрация хлорида натрия) приведены на рис. 4. Анализ данных, приведенных на рис. 4, позволяет выделить общие закономерности потери активности ферментами. Величины

времени полуинактивации ферментов зависят от температуры и pH среды, а от содержания соли практически не зависят. Это может быть связано с тем, что для перераспределения баланса электростатических и гидрофобных взаимодействий в белковой глобуле необходима концентрация соли выше 500 мМ [10]. Стабильность ферментов (время полуинактивации) уменьшается при переходе в щелочную область значений pH (повышение pH с 7,5 до 9,0) и повышении температуры с 4 до 22°C.

Наиболее стабильным является лизин фага phi11, наименее стабильным – LysPhi80α. Максимальные величины времени потери половины активности лизинами фагов phi80α, phi11 и К при 22°C равны 0,25; 8 и 6 сут соответственно. Максимальные величины времени потери половины активности лизинами фагов phi80α, phi11 и К при 4°C равны 3, 140 и 60 сут соответственно (рис. 4). При 22°C, как и при 37°C, лизин фага phi80α имеет вторичную структуру с большим (43,2%) содержанием неупорядоченных структур и как следствие низкую стабильность. В молекуле бета-структурного лизина фага phi11 при понижении температуры с 37 до 22°C (pH 7,5) доля неупорядоченных структур падает на 16,3% (табл. 2), а стабильность увеличивается (время полуинактивации возрастает с 10 мин до 8 сут). В молекулах альфа-спирального LysK аналогичное понижение температуры не вызывает существенных изменений вторичной структуры, и он менее стабилен по сравнению с LysPhi11.

Стоит отметить, что при повышении значения pH у ферментов фагов К и phi11 содержание неупорядоченных структур повышается до 50% за счет снижения содержания альфа-спиралей и бета-структур соответственно. Можно заключить, что

Т а б л и ц а 2

Содержание (%) элементов вторичной структуры в молекулах рекомбинантных лизинов стафилококковых фагов

Элементы вторичной структуры	22°C			37°C		
	LysPhi11	LysPhi80α	LysK	LysPhi11	LysPhi80α	LysK
α-спирали	14,4±1,3	12,3±1,0	34,6±1,0	12,3±1,1	14,0±1,2	33,7±1,0
β-повороты	21,5±0,6	18,8±1,6	18,8±1,3	18,6±0,5	17,4±1,2	17,9±1,3
Антипараллельные β структуры	19,9±4,9	12,9±4,9	18,3±1,0	13,0±4,6	13,1±3,8	13,6±0,5
Параллельные β структуры	17,3±1,7	12,8±1,6	7,3±1,0	13,0±1,6	11,9±1,7	6,9±0,7
Неупорядоченные структуры	26,8±4,2	43,2±3,0	21,0±0,5	43,1±4,0	43,6±2,8	22,9±0,4

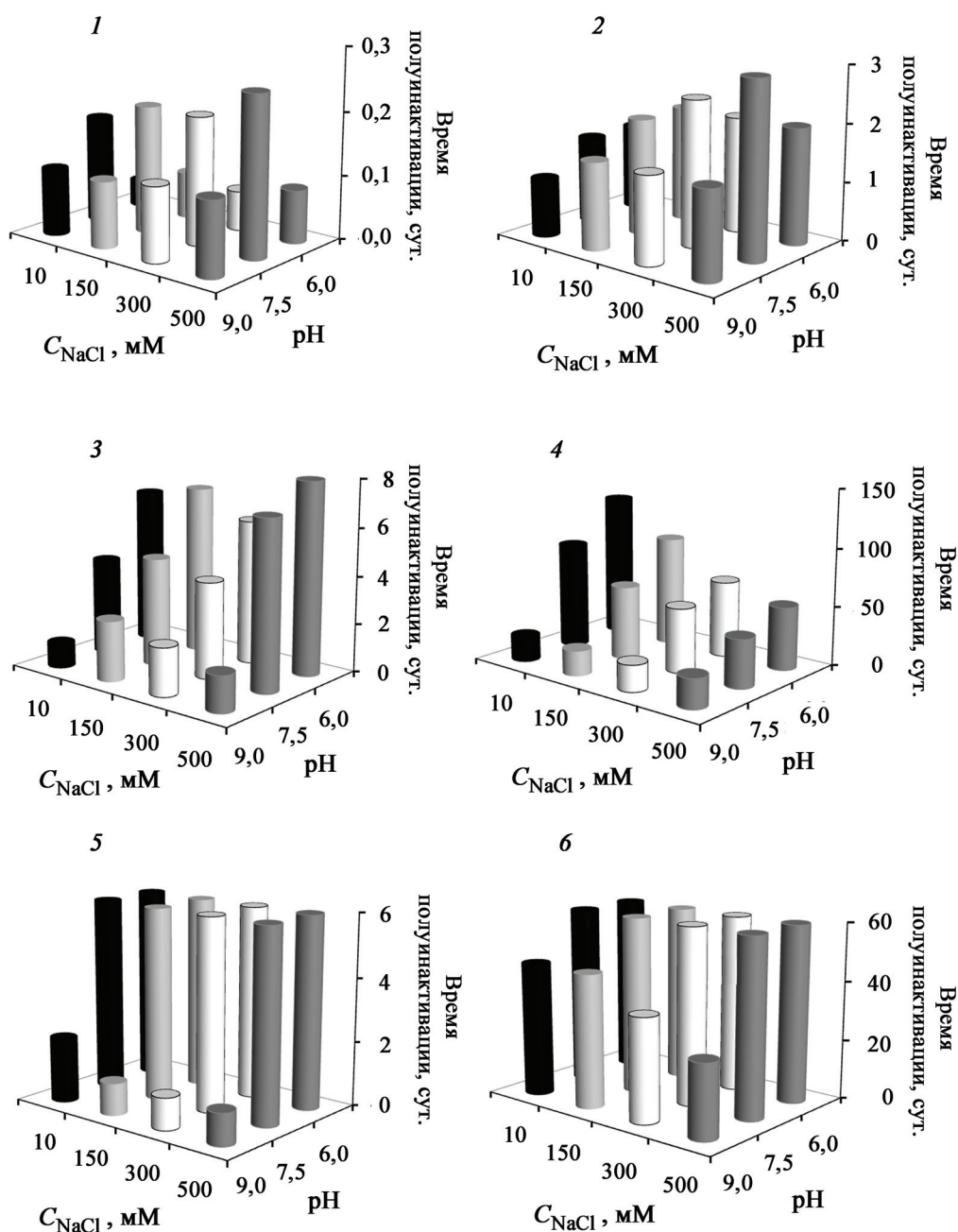


Рис. 4. Величины времени потери половины активности лизинами фагов phi80α (1, 2), phi11 (3, 4), K (5, 6). Условия эксперимента: 22°C (1, 3, 5) или 4°C (2, 4, 6), pH 6,0-9,0, концентрация фермента 0,4 мг/мл

повышение pH до 9,0 вызывает денатурацию LysK и LysPhi11, за счет чего падает их стабильность.

Таким образом, вторичная структура является одним из важнейших факторов, влияющих на стабильность лизинов фагов K, phi11, phi80α (0,4 мг/мл) в условиях хранения и функционирования. В условиях функционирования (37°C, pH 7,5) величина времени потери половины активности лизина фага K на 2–3 порядка выше аналогичных величин для LysPhi11 и LysPhi80α, молекулы которых находятся в денатурированном

состоянии. Понижение температуры до 22°C приводит к уменьшению содержания неупорядоченных структур в молекулах лизина фага phi11, что выражается в резком повышении стабильности фермента. Бета-структурный LysPhi11 в условиях хранения более стабилен, чем альфа-спиральный LysK, вторичная структура которого слабо меняется при действии температуры. Наличие большого количества неупорядоченных структур приводит к крайней нестабильности лизина фага phi80α в условиях хранения и функционирования.

Работа выполнена в рамках гранта Правительства РФ 11G34.31.0004 и гранта РФФ 15-03-00063.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rodriguez-Rubio L., Martinez B., Donovan D.M., Rodriguez A., Garcia P.* // Critical Reviews in Microbiology. 2013. Vol. 39. P. 427.
2. *Schmelcher M., Donovan D.M., Loessner M.* // Future Microbiology. 2012. Vol. 7. P. 1147.
3. *Becker S.C., Foster-Frey J., Donovan D.M.* // FEMS Microbiology Letters. 2008. Vol. 287. P. 185.
4. *Schmelcher M., Shen Y., Nelson D.C., Eugster M.R., Eichenseher F., Hanke D.C., Loessner M.J., Dong S., Pritchard D.G., Lee J.C., Becker S.C., Foster-Frey J., Donovan D.M.* // J. Antimicrobial Chemotherapy. 2015. Vol. 70. P. 1453.
5. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680.
6. *Bohm G., Muhr R., Jaenicke R.* // Protein engineering. 1992. Vol. 5. P. 191.
7. *Filatova L.Y., Becker S.C., Donovan D.M., Gladilin A.K., Klyachko N.L.* // Biochimie. 2010. Vol. 92. P. 507.
8. *Filatova L.Y., Donovan D.M., Becker S.C., Priyma A.D., Kabanov A.V., Klyachko N.L.* // Moscow University Chemistry Bulletin. 2014. Vol. 69. P. 107.
9. *Filatova L.Y., Donovan D.M., Foster-Frey J., Pugachev V.G., Dmitrieva N.F., Chubar T.A., Klyachko N.L., Kabanov A.V.* // Enzyme and Microbial Technology. 2015. Vol. 73–74. P. 51.
10. *Zhang J.* Protein-Protein Interactions in Salt Solutions. Protein-Protein Interactions – Computational and Experimental Tools. Croatia: InTech. 2012. P. 359.

Поступила в редакцию 01.08.15

LYTIC ENZYMES OF STAPHYLOCOCCAL PHAGES: CORRELATION BETWEEN SECONDARY STRUCTURE AND STABILITY

L.Y. Filatova, D.M. Donovan, J.A. Foster-Frey, V.G. Pugachev, E.V. Kudryashova, N.L. Klyachko

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

Lytic enzymes of bacteriophages K, phi11 and phi80 α are able to lyse (destroy) cells of antibiotic resistant strains of *Staphylococcus aureus*, and they can be considered as promising antimicrobial agents. The stability of recombinant lysins of phages K, phi11 and phi80 α was investigated in conditions of storage and functioning, and the relationship between the stability and the secondary structure of the enzymes was found. It was shown that the lower the content of disordered structures in the molecules of enzymes, the greater the stability of lysins (half-inactivation time). Beta-structural lysin of phage phi11 shows the best stability at storage temperature (22°C), both lysin of phage K with alpha-helical structure and lysin of phage phi80 α with disordered secondary structure are less stable.

Key words: *Staphylococcus aureus*, phage lysins, secondary structure, stability

Сведения об авторах: *Филатова Любовь Юрьевна* – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. хим. (luboff.filatova@gmail.com); *Донован Давид* – сотр. Института природных ресурсов (Сельскохозяйственный центр Бельствиля, США); *Фостер-Фрей Джулия* – сотр. Института природных ресурсов (Сельскохозяйственный центр Бельствиля, США); *Пугачев Владимир Георгиевич* – зав. сектором отдела биофизики и экологических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (pugachev@vector.nsc.ru); *Кудряшова Елена Вадимовна* – доцент кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (helena_koudriachova@hotmail.com); *Клячко Наталья Львовна* – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (nlklyacko@gmail.com).