

УДК 577.152.3:579.234

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ АНТИСТАФИЛОКОККОВЫХ ЭНДОЛИЗИНОВ КИНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Л.Ю. Филатова¹, Д.М. Донован², С.С. Беккер², А.Д. Прийма¹, А.В. Кабанов¹,
Н.Л. Клячко¹

(¹кафедра химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, ²лаборатория биологических наук и биотехнологии, Институт природных ресурсов, исследовательский центр Белтсвилла, США)

С помощью кинетических методов анализа исследованы особенности строения и функционирования антистафилококковых ферментов фагов phi11 и phi80a. Показано, что, несмотря на высокую степень гомологии первичной структуры (99,9%), оптимальные условия функционирования ферментов (температура, pH, концентрация фермента) могут иметь различия. Подтверждено участие в катализе катионов металлов (Ca^{2+} , Mg^{2+}) для эндолизина фага phi11, показана возможность участия в катализе сульфгидрильных групп эндолизинов фагов phi11 и phi80a.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, фаговые эндолизины, катион металла, структура и функции.

Стафилококковые инфекции входят в число самых распространенных и наиболее тяжелых заболеваний. Лечение стафилококковых инфекций осложняется тем, что около 90% штаммов этого микроорганизма устойчивы к антибиотикам. В связи с этим становится актуальным поиск альтернативных методов борьбы с золотистым стафилококком. Бактериофаги – вирусы бактерий, продуцирующие в процессе жизненного цикла ферменты, которые способны лизировать (разрушать) бактериальные клеточные стенки. Эти ферменты могут рассматриваться в качестве серьезной альтернативы антибиотикам. В литературе они получили название «лизинь» или «лизоцимы», большинство из них получены методами генетической инженерии [1–3]. Разрушение (лизис) клеточной стенки происходит за счет гидролиза химических связей в пептидогликане. Ферменты фагов phi11 и phi80a эффективно лизируют клетки золотистого стафилококка, в том числе штаммы, устойчивые к метициллину [4]. Данные ферменты мало изучены как биокатализаторы и представляют интерес как потенциальная основа для разработки лекарственных препаратов. Цель данной работы – характеристика структурно-функциональных свойств ферментов фагов phi11 и phi80a кинетическими методами.

Материалы и методы

Материалы

В работе использованы рекомбинантные ферменты, полученные по методике [5]. Это водные раство-

ры эндолизинов фагов phi80a и phi11 (концентрация 3,84 и 10,15 мг/мл соответственно) в буфере, содержащем 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ хлорида натрия, 250 мМ имидазола и 30% глицерина (pH 8,0).

Молекулы эндолизинов фагов phi80a и phi11 являются моносубъединичными белками с молекулярной массой ~56 кДа. Известны аминокислотные последовательности этих ферментов, они отличаются одной аминокислотой в положении 13 с N-конца. Молекулы ферментов характеризуются наличием двух каталитических (SHAP и Amidase 2) и одного адсорбционного (SH3_5) доменов, а также участков с негомологичными структурами. Домен SHAP может содержать остаток цистеина, ответственный за катализ, а домен Amidase2 – катион металла, принимающий участие в катализе или играющий структурную роль. В качестве субстрата использовали препарат клеток *Staphylococcus aureus* (штамм 209 В-580), любезно предоставленный сотрудниками ОАО «Вектор» (г. Новосибирск). Для приготовления буферных растворов использовали KH_2PO_4 , Трис, цитрат натрия («Sigma»), гидроксид натрия и соляную кислоту фирмы «Диа М».

В работе использованы $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ чистоты >99,0% («Sigma»), FeCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ («ч.д.а.», «РеаХим»), DL-дитиотрейтол (ДТТ), восстановленный глутатион (ГШ), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) фирмы «Sigma», окисленный глутатион (ГССГ) и меркаптоэтанол (МЭ) фирмы «Fluka».

Методы

Измерение активности ферментов. В спектрофотометрическую кювету объемом 0,5 мл, содержащую суспензию клеток золотистого стафилококка с $A_{600} = 0,6$ в 20 мМ KH_2PO_4 (рН 7,5) при температуре 37°C, вносили аликвоту раствора фермента ($c = 0,4$ мг/мл) и следили за изменением оптической плотности во времени. Активность фермента определяли как тангенс угла наклона линейного участка.

Определение рН-профиля ферментов. В спектрофотометрическую кювету объемом 0,5 мл, содержащую суспензию клеток золотистого стафилококка с $A_{600} = 0,6$ в универсальном буфере (20 мМ KH_2PO_4 , 20 мМ Трис, 20 мМ цитрат натрия) с рН 6,0–9,0 при температуре 37°C, вносили 10 мкл раствора фермента ($c = 0,4$ мг/мл) и следили за изменением оптической плотности во времени. Активность фермента определяли как тангенс угла наклона линейного участка.

Исследование влияния температуры на активность ферментов. В спектрофотометрическую кювету объемом 0,5 мл, содержащую суспензию клеток золотистого стафилококка с $A_{600} = 0,6$ в 20 мМ KH_2PO_4 (рН 7,5) при температуре 20–50°C (время доведения кюветы до нужной температуры составляло 3 мин), вносили 10 мкл раствора фермента ($c = 0,4$ мг/мл) и следили за изменением оптической плотности во времени. Активность фермента определяли как тангенс угла наклона линейного участка.

Исследование влияния ионов металлов на активность ферментов. В спектрофотометрическую кювету, содержащую 0,5 мл суспензии клеток золотистого стафилококка с $A_{600} = 0,6$ в деионизованной воде, добавляли 10 мкл раствора, содержащего смесь фермента ($c = 0,4$ мг/мл) с катионом металла (Pb^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} $c = 1$ –10 мМ) и следили за изменением оптической плотности при 37°C.

Исследование влияния ионов металлов на стабильность ферментов. Готовили серии растворов, содержащих фермент ($c = 0,4$ мг/мл) и катион металла (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) в концентрации 1 мМ или 10 мМ, выдерживали при температурах 37 и 4°C, а затем измеряли активность полученных образцов через фиксированные промежутки времени.

Исследование влияния реагентов тиол-дисульфидного обмена и ЭДТА на активность ферментов. В спектрофотометрическую кювету, содержащую 0,5 мл суспензии клеток золотистого стафилококка (20 мМ калий-фосфатный буфер (КФБ) с рН 7,5, $A_{600} = 0,6$), добавляли 10 мкл раствора, содержащего смесь фермента ($c = 0,4$ мг/мл) с реагентом тиол-дисульфидного обмена (дितिотреитол, мер-

каптоэтанол, глутатион, $c = 10$ мМ) или ЭДТА ($c = 0,5$ –2,0 мМ), и следили за изменением оптической плотности при 37°C.

Исследование влияния реагентов тиол-дисульфидного обмена и ЭДТА на стабильность ферментов. Готовили серии растворов, содержащих фермент ($c = 0,4$ мг/мл) и дितिотреитол, меркаптоэтанол, глутатион в концентрации 10 мМ или ЭДТА в концентрации 0,5 или 2 мМ (20 мМ КФБ с рН 7,5), выдерживали при температуре 37°C и измеряли активность полученных образцов через фиксированные промежутки времени.

Результаты и их обсуждение

Оптимизация условий хранения и функционирования ферментных препаратов – важный процесс для обеспечения высокой эффективности работы биокатализаторов. С этой целью было исследовано влияние рН, температуры и концентрации фермента на активность эндолизинов фагов phi11 и phi80a.

Для лизинов фагов phi11 и phi80a зависимости активности от их концентрации линейны в диапазоне до 30 мкг/мл фермента. Полученные данные являются доказательством отсутствия процессов диссоциации-ассоциации белковых молекул при условиях измерения. Стоит отметить, что все эксперименты, описанные в настоящей работе, проводили при значениях концентрации ферментов, находящихся в области линейности.

Величины удельной активности эндолизинов фагов phi11 и phi80a эквивалентны при значениях рН, больших 7,0 (рис. 1). Несмотря на сходство в первичной структуре более чем на 99,9%, эндолизи-

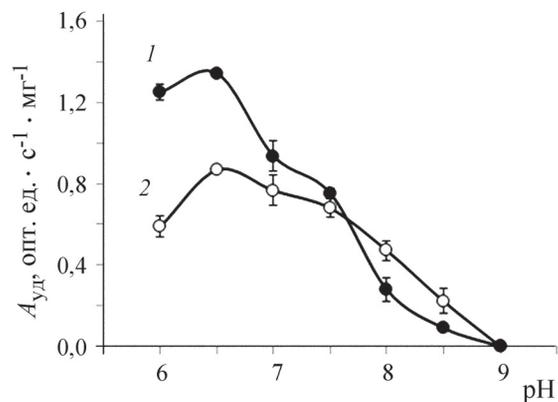


Рис. 1. Зависимость активности от рН для лизинов фагов phi11 (1) и phi80a (2). Условия эксперимента: 37°C, $A_{600} = 0,6$, клетки суспендированы в универсальном буфере (20 мМ Трис–фосфат–цитрат), концентрация ферментов при измерении 8 мкг/мл

ны фагов phi11 и phi80a в кислой среде (pH 6,0–6,5) обладают значениями активности, отличающимися приблизительно вдвое. Стоит отметить, что препараты ферментов не содержали примесных белков (это было подтверждено электрофоретическим методом), что является доказательством корректного расчета удельной активности. Зависимость активности ферментов от pH среды имеет колоколообразный вид с резко выделяющимся максимумом в районе pH 6,5. На основании этого можно предположить наличие в их молекулах двух участвующих в катализе групп с разными значениями pK. Это могут быть остатки Cys и His каталитического домена СНАР.

На рис. 2 приведены зависимости активности эндолизинов от температуры. Видно, что зависимость активности от температуры для лизина фага phi11 характеризуется наличием максимума в интервале температур 35–40°C. Эндолизин фага phi80a наиболее активен при температурах, близких 20°C. Несмотря на высокую гомологию в первичной структуре, эндолизины фагов phi80a и phi11 не только сильно отличаются по активности в кислых средах, но и имеют разные температурные оптимумы.

Стоит отметить, что сотрудниками ОАО «Вектор» (г. Новосибирск) методом электронной микроскопии показано, что клетки золотистого стафилококка идентичны при температурах от 20 до 80°C. Таким образом, можно заключить, что описанные выше закономерности связаны с влиянием температуры именно на фермент, а не на клетки.

Согласно данным моделирования третичной структуры в молекулах ферментов фагов phi11 и phi80a, есть домен Amidase-2, в котором может присутство-

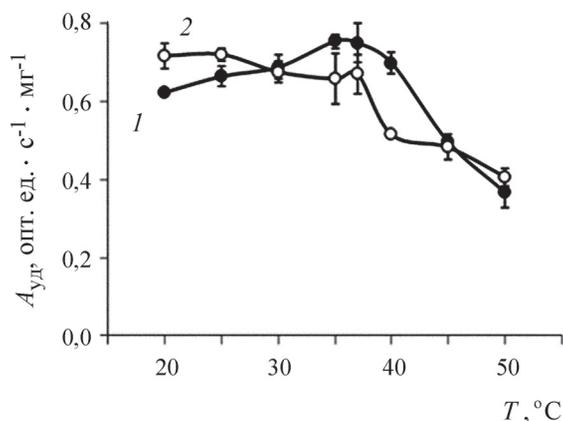


Рис. 2. Зависимость активности от температуры для лизинных фагов phi11 (1) и phi80a (2). Условия эксперимента: $A_{600} = 0,6$, клетки суспендированы в 20 мМ КФБ (pH 7,5), концентрация ферментов при измерении 8 мкг/мл

вать катион Me^{2+} . Катион металла может играть существенную роль в процессах катализа и в поддержании структуры белковой молекулы. Для выяснения роли катионов металлов в обеспечении функционирования ферментов мы исследовали влияние катионов двухвалентных металлов (Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+}) на активность и стабильность эндолизинных фагов phi11 и phi80a.

Для количественной оценки влияния катионов металлов на активность ферментов удельную активность нативных ферментов принимали за 100%. Было установлено, что при добавлении катионов свинца, меди и железа ($c = 1$ мМ) ферменты фагов phi11 и phi80a полностью теряют активность, а катионы кальция, магния и марганца не вызывают подобных явлений.

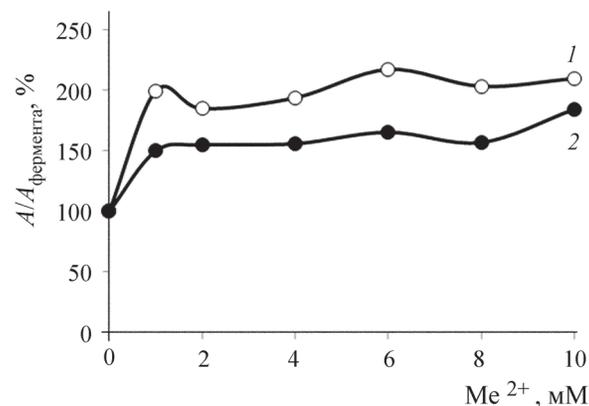


Рис. 3. Влияние катионов кальция (1) и магния (2) на активность эндолизина фага phi11. Условия эксперимента: 37°C, $A_{600} = 0,6$, клетки суспендированы в деионизированной воде, концентрация фермента 8 мкг/мл, $A/A_{фермента}$ — отношение активности фермента в присутствии катиона Me^{2+} к активности фермента без добавок (в мМ указана концентрация катиона металла в инкубируемом образце)

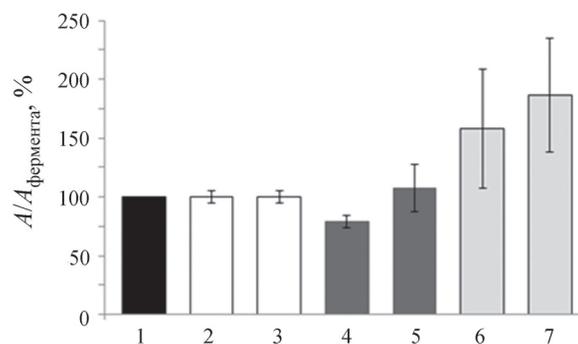


Рис. 4. Влияние катионов кальция (2, 3), марганца (4, 5), магния (6, 7) в концентрациях 1 и 10 мМ на активность эндолизина фага phi80a (1). Условия эксперимента: 37°C, $A_{600} = 0,6$, клетки суспендированы в деионизированной воде, концентрация фермента 8 мкг/мл, $A/A_{фермента}$ — отношение активности фермента в присутствии катиона Me^{2+} к активности фермента без добавок

Катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} в диапазоне концентраций 1–10 мМ увеличивают активность лизина фага phi11 в 1,5–2,5 раза (рис. 3). Возможно, что ввиду близости значений радиусов катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} процесс активации фермента происходит неселективно. Катионы Mn^{2+} ($c = 1–10$ мМ) идентичны катионам Ca^{2+} по влиянию на активность лизина фага phi11. Катионы Ca^{2+} и Mn^{2+} в концентрации 1 или 10 мМ не влияют на активность лизина фага phi80a, в то время как в присутствии катионов Mg^{2+} активность фермента возрастает приблизительно в 1,5 раза (рис. 4). Перечисленные выше экспериментальные факты являются доказательством того, что эндолизин фагов phi80a и phi11 являются металлозависимыми ферментами.

Стабилизирующую способность катионов металлов исследовали при двух значениях температуры: 37°C (физиологическая температура) и 4°C (температура хранения). В качестве количественного критерия для оценки стабилизирующей способности катиона металла при 37°C использовали величину времени полуинактивации фермента (табл. 1). Из табл. 1 видно, что катионы Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} практически не оказывают стабилизирующего влияния на эндолизин фага phi11. Величины времени полуинактивации эндолизина фага phi80a как в присутствии катионов Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , так и в их отсутствие слишком малы для достоверной оценки стабилизирующей способности катионов металлов. Однако они имеют одинаковый порядок, из чего можно заключить, что катионы Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} незначительно повышают стабильность лизина фага phi80a.

Стабилизирующую способность катионов Ca^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} при 4°C оценивали путем сравнения величин остаточной активности индивидуальных фер-

Т а б л и ц а 1

Влияние катионов металлов на время полуинактивации эндолизин фагов phi11 и phi80a (37°C, концентрации фермента в инкубируемом образце 0,4 мг/мл)

Фермент	Аддитив	$T_{1/2}$ при 37°C, мин	
		1 мМ	10 мМ
Лизин фага Phi11	без добавок	8	
	Ca^{2+}	10	9
	Mn^{2+}	10	13
	Mg^{2+}	10	8
Лизин фага Phi80a	без добавок	3	
	Ca^{2+}	5	7
	Mn^{2+}	5	7
	Mg^{2+}	7	9

Т а б л и ц а 2

Влияние катионов металлов на стабильность эндолизин фагов phi11 и phi80a (4°C, концентрация фермента в инкубируемом образце 0,4 мг/мл)

Фермент	Аддитив	Остаточная активность (2 недели при 4°C), %	
		1 мМ	10 мМ
Лизин фага Phi11	без добавок	70	
	Ca^{2+}	60	73
	Mn^{2+}	67	66
	Mg^{2+}	68	72
Лизин фага Phi80a	без добавок	70	
	Ca^{2+}	57	80
	Mn^{2+}	63	76
	Mg^{2+}	88	74

ментов и эндолизин фагов в присутствии катионов металлов через 2 недели инкубации. Как видно из табл. 2, при 4°C катионы Ca^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} не влияют на значение остаточной активности ферментов. Таким образом, исходя из анализа температурной зависимости инактивации эндолизин фагов phi11 и phi80a, можно заключить, что катионы металлов не важны для поддержания структуры ферментов.

Известно, что домен SHAP, который является частью третичной структуры эндолизин фагов phi11 и phi80a, содержит пару Cys/His, отвечающую за каталитические процессы. Для выяснения роли групп SH в поддержании структурно-каталитических свойств эндолизин фагов phi11 и phi80a было изучено влияние дитиотрейтола (ДТТ), меркаптоэтанола (МЭ) и глутатиона в восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) формах на активность и стабильность ферментов.

Известно, что ДТТ, МЭ и GSH – хорошие восстановители –S–S–мостиков, под воздействием этих реагентов не наблюдалось значительного изменения активности эндолизин фагов (табл. 3). Это либо отрицает участие SH-групп в процессах катализа, либо –S–S–мостики находятся глубоко в структуре белка

Т а б л и ц а 3

Влияние реагентов тиол-дисульфидного обмена и ЭДТА на активность эндолизин фагов phi11 и phi80a при 37°C

Реагент	Лизин фага phi11	Лизин фага phi80a	
На мостик –S–S–	ДТТ, 10 мМ	1,2±0,5	1,0±0,5
	МЭ, 10 мМ	0,7±0,2	1,0±0,3
	GSH, 10 мМ	0,8±0,2	0,9±0,3
На SH-группы	GSSG, 10 мМ	0,09±0,03	0,10±0,02
На катион металла	ЭДТА, 0,5 мМ	0,7±0,5	1,1±0,4
	ЭДТА, 2 мМ	0,8±0,5	1,0±0,4
Нет добавок		1,0	1,0

и не подвергаются действию реагентов. Под действием глутатиондисульфида активность ферментов phi11 и phi80a снизилась примерно до 10%. Можно предположить, что происходит образование –S–S– мостиков либо с дезактивацией SH-групп, ответственных за катализ, либо с созданием стерических затруднений вблизи активного центра. Установлено, что реагенты тиол-дисульфидного обмена не влияют на стабильность эндолизин фагов phi11 и phi80a (табл. 4). ЭДТА также не влияет на активность и стабильность эндолизина фага phi80a, но дезактивирует и дестабилизирует эндолизин фага phi11, что (наряду с активацией катионами кальция и марганца) является доказательством металлозависимости этого фермента.

Таким образом, выявлены оптимальные условия функционирования эндолизин фагов phi11 и phi80a (температура, pH, концентрация фермента). Показано, что высокоомологичные эндолизин фагов phi11 и phi80a обладают разными свойствами. Подтвержде-

Работа выполнена в рамках Гранта Правительства РФ 11G34.31.0004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fishetti V.A.* // Current Opinion in Microbiology. 2008. **11**. P. 393.
2. *Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Gorski A.* // Experimental Biology and Medline. 2006. **231**. P. 366.
3. *Lopez R., Garcia E., Garcia P.* // Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies. 2004. **1**. P. 469.
4. *Donovan D.M., Lardeo M., Foster-Frey J.* // FEMS Microbiology Letters. 2006. **265**. P. 133.
5. *Becker S.C., Foster-Frey J., Donovan D.M.* // FEMS Microbiology Letters. 2008. **287**. P. 185.

Поступила в редакцию 30.01.14

INVESTIGATION OF STRUCTURE AND FUNCTION OF ANTISTAPHYLOCOCCAL ENDOLYSINS BY KINETIC METHODS

L.Y Filatova¹, D.M Donovan², S.C Becker², A.D Priyma¹, A.V. Kabanov¹, Klyachko N.L.¹

(¹Division of chemical enzymology, Chemistry department of M.V. Lomonosov Moscow State University; ²Animal Biosciences and Biotechnology, USA)

Peculiarities of structure and function of phages phi11 и phi80a antistaphylococcal endolysins were investigated by kinetic measurements. In spite of high extent of homology in primary structure, both enzymes possess some differences in optimal conditions of functioning. As it was shown, phage phi11 endolysin was activated by metal cations (Ca²⁺, Mg²⁺). Sulfhydryl groups can play an important role in catalytic processes for both phage phi11 и phi80a endolysins.

Key words: *Staphylococcus aureus*, phage endolysins, cation of metal, structure and functions.

Сведения об авторах: *Филатова Любовь Юрьевна* – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (luboff.filatova@gmail.com); *Дэвид. М. Донован* – профессор лаборатория биологических наук и биотехнологии, институт природных ресурсов, исследовательский центр Белтсвилла, США (david.donovan@ars.usda.gov); *Стивен С. Беккер* – профессор лаборатория биологических наук и биотехнологии, институт природных ресурсов, исследовательский центр Белтсвилла, США *Прийма Анастасия Дмитриевна* – аспирант химического факультета МГУ (nastyshka03@mail.ru); *Кабанов Александр Викторович* – зав. лабораторией кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, директор Центра нанотехнологий и доставки лекарств Университета Северной Каролины (США), докт. хим. наук (skabanov@me.com); *Клячко Наталья Львовна* – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (nlklyachko@gmail.com).