

Федеральное Агентство Научных Организаций
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г.К. СКРЯБИНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

КУДРЯКОВА ИРИНА ВАЛЕРЬЕВНА

БИОГЕНЕЗ ВЕЗИКУЛ *LYSOBACTER SP. XL1*

03.01.04 Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Н.В. Васильева

Пущино – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА <i>LYSOBACTER</i> SPP.....	11
1.2 КЛЕТОЧНАЯ ОБОЛОЧКА БАКТЕРИЙ	12
1.2.1 Структурные особенности клеточной оболочки грамположительных бактерий	17
1.2.2 Структурные особенности клеточной оболочки грамотрицательных бактерий.....	19
1.3 ВНЕШНЕМЕМБРАННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ	24
1.3.1 Структура везикул	26
1.3.2 Биогенез везикул	27
1.3.3 Функциональная значимость везикул	31
1.4 БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ	34
1.4.1 Автолизины и вирусные эндолизины	35
1.4.2 Внеклеточные бактериолитические ферменты	36
1.4.3 Специфичность бактериолитических ферментов.....	37
1.4.4 Структурно–функциональные особенности литических ферментов	40
1.4.5 Биомедицинское направление изучения литических ферментов	43
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	46
2.1 БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ И УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.....	46
2.2 ПОЛУЧЕНИЕ ВЕЗИКУЛ	47
2.2.1 Получение везикул методом дифференциального центрифугирования.....	47
2.2.2 Получение везикул методом осаждения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	47
2.3 ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТА ВЕЗИКУЛ <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1 В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ САХАРОЗЫ	47
2.4 ПОЛУЧЕНИЕ ВНЕШНИХ МЕМБРАН <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1	48
2.5 ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПРЕПАРАТОВ ВЕЗИКУЛ И ВНЕШНИХ МЕМБРАН <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1.....	48
2.6 СТРУКТУРНО–ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ Л1 И Л5 <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1	49
2.6.1 Очистка рекомбинантных белков	49
2.6.2 Кристаллизация белков Л1 и Л5 <i>Lysobacter</i> sp. XL1.....	50
2.6.3 Изучение ингибирующего действия синтезированных пептидов на белок Л5 <i>Lysobacter</i> sp. XL1	50
2.6.4 Эксклюзионная хроматография	51
2.6.5 Электрофорез белков в нативных условиях	51

2.6.6	Получение литической протеазы Л5 из везикул <i>Lysobacter</i> sp. XL1.....	51
2.7	ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ БЕЛКА Л5 <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1	52
2.7.1	Получение пептидогликана <i>S. aureus</i> 209P	52
2.7.2	Изучение специфичности действия белка Л5 по отношению к пептидогликану <i>S. aureus</i> 209P	52
2.7.3	Определение типа гидролизуемой связи белком Л5 в синтетическом субстрате Abz–Ala–Ala–Phe–pNA.....	53
2.8	АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	53
2.8.1	Определение концентрации ЭПС	53
2.8.2	Определение концентрации белка методом Бредфорда.....	54
2.8.3	Определение концентрации общего белка методом Лоури	54
2.8.4	Измерение активности щелочной фосфатазы.....	54
2.8.5	Определение концентрации КДО	55
2.9	ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ.....	55
2.9.1	Негативное контрастирование	55
2.9.2	Электронно–микроскопическая иммуоцитохимия.....	55
2.10	ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ В ДЕНАТУРИРУЮЩИХ УСЛОВИЯХ.....	56
2.11	ИММУНОБЛОТТИНГ БЕЛКОВ	56
2.12	КОНСТРУИРОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БЕЛКА Л5 <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1	57
2.12.1	Конструирование липосомальных препаратов на основе фосфолипидов везикул и белка Л5 <i>Lysobacter</i> sp. XL1	57
2.12.2	Конструирование препарата на основе ЭПС и белка Л5 <i>Lysobacter</i> sp. XL1	57
2.13	ИЗМЕРЕНИЕ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОЙ АТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ	58
2.14	ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДОМ СПОТ–ТЕСТА	58
	ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	60
3.1	ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ БИОГЕНЕЗА ВЕЗИКУЛ <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1	60
3.1.1	Изучение роли белка Л5 в биогенезе везикул	60
3.1.2	Изучение роли фосфолипидов в биогенезе везикул <i>Lysobacter</i> sp. XL1.....	68
3.2	СТРУКТУРНО–ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ Л1 И Л5 <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1	70
3.2.1	Получение рекомбинантных белков Л1 и Л5 для кристаллизации	71
3.2.2	Сравнительная структурная характеристика белков Л1 и Л5 <i>Lysobacter</i> sp. XL1	71

3.2.3 Изучение способности литической протеазы Л5 <i>Lysobacter</i> sp. XL1 агрегировать в амилоидоподобные фибриллы	77
3.2.4 Изучение специфичности белка Л5 <i>Lysobacter</i> sp. XL1	77
3.3 КОНСТРУИРОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЛИТИЧЕСКОГО БЕЛКА Л5 <i>LYSOBACTER</i> SP. XL1	81
3.3.1 Конструирование антимикробных препаратов на основе ЭПС и белка Л5 <i>Lysobacter</i> sp. XL1	81
3.3.2 Конструирование антимикробных препаратов на основе фосфолипидов везикул и белка Л5 <i>Lysobacter</i> sp. XL1	83
3.3.3 Изучение лечебного действия антимикробного препарата на основе белка Л5 и ЭПС	84
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	86
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	95

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПААГ, полиакриламидный гель

ТЕМЕД, N,N,N',N'-Тетраметилэтилендиамин

ПСА, персульфат аммония

Ds-Na, додецилсульфат натрия

IPTG, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

ЭДТА, этилендиаминтетрауксусная кислота

FPLC (Fast protein liquid chromatography), жидкостная хроматография низкого давления

ДТТ, 1,4-дитиотреитол

Nonidet P-40 (Octylphenoxy poly(ethyleneoxy)ethanol), неионный неденатурирующий детергент

ДМСО, диметилсульфоксид

PVDF, поливинилиденфторид

ТХУ, трихлоруксусная кислота

КДО, 2-кето-3-дезоксиктонат

ЛПС, липополисахарид

ЭПС, экзополисахарид

MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), метициллиноустойчивый стафилококк

Abz-Ala-Ala-Phe-pNA, флюорогенный синтетический субстрат антранилоил-аланил-аланил-фенилаланил-паранитроанилид

PBPs (Penicillin-binding proteins), пенициллин-связывающие белки

УДФ, уридин-5-дифосфат

PMSF, фенилметилсульфонилфторид

ЯМР, ядерный магнитный резонанс

pI, изоэлектрическая точка

а.о., аминокислотные остатки

о.е., оптические единицы

PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal, 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone), сигнальная молекула, секретируемая *Pseudomonas aeruginosa*

RefSeq (NCBI Reference Sequences Database), база данных достоверно аннотированных последовательностей, включающая геномы, транскрипты и белки

UniprotKB, база данных, включающая информацию о белках: первичная структура, специфичность

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Образование внешнемембранных везикул является распространенным процессом среди грамотрицательных бактерий (Kadurugamuwa&Beveridge 1997; Beveridge 1999; Kuehn&Kesty 2005; Balsalobre *et al.*, 2006; Vasilyeva *et al.*, 2008; Васильева *и др.*, 2009; Olofsson *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2012). Везикулы представляют собой сферические структуры диаметром от 20 до 300 нм, образуемые в результате выпячивания внешней мембраны и последующего отщепления. В состав везикул входят внешнемембранные компоненты (белки, фосфолипиды, ЛПС), компоненты периплазмы (периплазматические белки, включая автолитические ферменты, фрагменты клеточных стенок), компоненты цитоплазмы и цитоплазматической мембраны (в т.ч. ДНК, РНК), а у патогенных бактерий факторы вирулентности. Малые размеры везикул и специфический состав позволяют им выполнять важные функции в жизнедеятельности бактерий: секреция белков, утилизация токсичных метаболитов, получение питательных веществ, расширение экологической ниши. Осознание научным сообществом важности везикулярных исследований способствовало интенсивному изучению их биогенеза (Mashburn–Warren&Whiteley 2006; Kulp&Kuehn 2010; Schwechheimer *et al.*, 2014; Schwechheimer&Kuehn 2015). В настоящее время актуальным является установление факторов, способствующих везикулообразованию, и изучение механизма их действия.

Грамотрицательная бактерия *Lysobacter* sp. XL1 образует внешнемембранные везикулы и секретирует с их помощью бактериолитическую протеазу Л5 (Vasilyeva *et al.*, 2008; Васильева *и др.*, 2009). *Lysobacter* sp. XL1 единственный представитель рода, для которого установлена способность к везикулообразованию. Везикулы *Lysobacter* sp. XL1 частично охарактеризованы. Установлено, что в условиях секреции литических ферментов образуются везикулы разного размера от 50 до 160 нм. В то время как в условиях отсутствия секреции литических белков формируются однородные везикулы диаметром около 20 нм. Было предположено, что гетерогенность везикул в условиях секреции литических ферментов может быть связана с особенностями их формирования, в частности, с секрецией белка Л5. Возможно, также, что в данных условиях образуются особые, отличные по составу секреторные везикулы, а фактором, обуславливающим формирование таких везикул, является белок Л5.

Везикулы *Lysobacter* sp. XL1 образованы внешними мембранами, поэтому в их состав входят внешнемембранные белки, ЛПС и фосфолипиды. Поскольку именно фосфолипиды обуславливают сферическую структуру везикул, можно предположить и их

роль в везикулообразовании у *Lysobacter* sp. XL1. Для этого необходимо изучить фосфолипидный состав *Lysobacter* sp. XL1.

Изучение везикул *Lysobacter* sp. XL1 имеет важное биомедицинское направление. Ранее было показано, что везикулы, содержащие белок Л5, эффективно лизируют широкий спектр микроорганизмов, в т.ч. патогенные штаммы, множественноустойчивые к антимикробным препаратам. Гомогенный фермент Л5 таким действием не обладает (Vasilyeva *et al.*, 2014). Было изучено лечебное действие везикул в отношении стафилококкового сепсиса, вызванного MRSA, и сибиреязвенной инфекции, смоделированных у мышей. Показано, что даже однократная инъекция везикул в качестве лекарственного средства приводит к полному выздоровлению экспериментальных животных (Шишкова *и др.*, 2013). Эти результаты можно использовать в качестве основы для разработки высокоэффективных противомикробных препаратов нового поколения на основе литического фермента Л5 *Lysobacter* sp. XL1 в составе липосом.

Lysobacter sp. XL1 продуцирует пять бактериолитических ферментов, которые разрушают пептидогликан конкурентных бактерий (Степная *и др.*, 1992, 1996, 2005; Муранова *и др.*, 2004; Vasilyeva *et al.*, 2008, 2014). Эти ферменты являются основой высокоэффективного антимикробного препарата для наружного применения – лизоамидаза (Кулаев *и др.*, 2002). Все ферменты в разной степени охарактеризованы. Обращают на себя внимание сериновые литические протеазы Л1 и Л5 (ЕС 3.4.21.12), которые гомологичны друг другу и α -литической протеазе *L. enzymogenes* (Грановский *и др.*, 2010, 2011; Lapteva *et al.*, 2012). Оба фермента обладают литической активностью по отношению к широкому спектру микроорганизмов и проявляют протеазную активность на казеине и синтетическом пептиде (Степная *и др.*, 2001). Однако ферменты отличаются по скорости гидролиза этих субстратов. А для белка Л5 не установлен тип гидролизуемых связей в пептидогликане стафилококка. Несмотря на гомологию, ферменты существенно отличаются способом секреции в окружающую среду: белок Л1, предположительно, использует секреторную систему второго типа (T2SS), как и α -литическая протеаза *L. enzymogenes* (Silen *et al.*, 1989; Fujishige *et al.*, 1992), а для белка Л5 установлено, что его секреция происходит посредством внешнемембранных везикул, как уже упоминалось. Для понимания отличий в топогенезе и функционирования гомологичных белков необходимы структурные исследования, которые ранее не проводились.

Таким образом, актуальность темы работы обоснована важностью изучения биогенеза бактериальных везикул, особенностей топогенеза бактериолитических ферментов для развития фундаментальных основ биохимии клеточной поверхности микроорганизмов и секреции белков.

Целью данной работы было изучить участие белка Л5 и фосфолипидов внешних мембран в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1.

В задачи исследования входило:

1. Установить роль белка Л5 в биогенезе секреторных везикул *Lysobacter* sp. XL1.
2. Изучить роль фосфолипидов в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1.
3. Установить пространственные структуры гомологичных белков Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 и провести их сравнительную характеристику.
4. Определить тип гидролизуемых связей белком Л5 *Lysobacter* sp. XL1 в пептидогликане стафилококка.
5. Разработать подходы к созданию антимикробных препаратов на основе белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1.

Научная новизна работы

Установлено два фактора, влияющих на биогенез везикул *Lysobacter* sp. XL1: секретлируемый белок Л5 и кислый фосфолипид кардиолипин. В качестве доказательства роли белка Л5 в биогенезе везикул изучены особенности везикулообразования у рекомбинантного штамма *Pseudomonas fluorescens* Q2-87/B, продуцирующего этот белок. Показано, что секреция рекомбинантного белка осуществляется посредством везикул и способствует усилению везикулообразования у штамма–продуцента. Впервые установлены пространственные структуры белков Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1. Белок Л1 практически не отличается от известного гомолога, α -литической протеазы *L. enzymogenes*. Для белка Л5 выявлены структурные особенности: плотная кристаллическая упаковка, наличие доменов, существенно отличающихся от эквивалентных доменов его гомологов. Установлено, что на пептидогликане стафилококка фермент Л5 проявляет эндопептидазную и амидазную активности. Впервые обнаружена способность белка Л5 к формированию амилоидоподных структур.

Научно–практическое значение работы

Сконструированы два антимикробных препарата с известным составом на основе ЭПС и белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1, а также на основе фосфолипидов везикул *Lysobacter* sp. XL1 и белка Л5. Препараты эффективно лизируют клетки клинических изолятов бактерий родов *Staphylococcus* и *Bacillus*, в т.ч. множественноустойчивые штаммы. Совместно с Государственным научным центром прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск) изучено лечебное действие препарата на основе ЭПС и белка Л5 в отношении стафилококкового сепсиса, смоделированного у мышей. Установлено, что препарат способствует снижению обсемененности почек на два порядка. Полученные результаты свидетельствуют в пользу перспективности дальнейшей

разработки антимикробных препаратов на основе литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1.

Личный вклад автора

Исследования по установлению роли белка Л5 и фосфолипидов в биогенезе везикул, по подготовке образцов к электронной микроскопии, по изучению специфичности действия белка Л5, по препаративному получению белков для кристаллизации и для анализа дифракцией рентгеновских лучей, по конструированию антимикробных препаратов и проверке их литического действия выполнялись лично автором. Соискатель принимал непосредственное участие в интерпретации и обсуждении всех полученных результатов, в оформлении публикаций и их подаче.

Эксперименты, связанные с электронной микроскопией, проводились совместно с к.б.н. Сузиной Н.Е. (лаборатория цитологии микроорганизмов ИБФМ РАН, г. Пущино).

Эксперименты, связанные с кристаллизацией, рентгеноструктурными исследованиями белков, проводились совместно с д.б.н. Тищенко С.В. (лаборатория структурных исследований аппарата трансляции ИБ РАН, г. Пущино), а также с к.ф.-м.н. Габдулхаковым А.Г. (группа структурных исследований рибосомных белков ИБ РАН, г. Пущино).

Анализ образцов на аминокислотном анализаторе был проведен совместно с Лысанской В.Я. (отдел «Всероссийская коллекция микроорганизмов» ИБФМ РАН, г. Пущино).

Работы, связанные с проверкой литического действия препаратов в отношении патогенных бактерий, а также их лечебного действия, проводились совместно с к.б.н. Шишковой Н.А. (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск).

Благодарности

Автор выражает безграничную благодарность научному руководителю, к.б.н. Васильевой Н.В., за ценное руководство в проведении исследовательской работы, анализе полученных результатов, а также за постоянное внимание и поддержку. Также выражается огромная признательность Барковой Н.Г., Аристовой Е.Б. за постоянную поддержку, ценные советы и участие. Выражается безграничная благодарность за консультацию в области тонкослойной хроматографии к.х.н. Винокуровой Н.Г.; за обсуждение ряда полученных результатов и участие к.б.н. Свиридову А.В., к.б.н. Лисову А.В. и к.б.н. Мачулину А.В.; за ценные советы к.б.н. Цфасман И.М., Ледовой Л.А., Зубрицкой Л.Г.

С доброй памятью и безграничной благодарностью д.б.н. Степной О.А.

Связь с государственными программами

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 11-04-01937 – а), программы УМНИК и гранта Минобрнауки (соглашение №14.607.21.0013).

Апробация работы и публикации

Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: Международная конференция «БИОЛОГИЯ – НАУКА 21 ВЕКА» (Пушино 2012, 2013, 2014, устные доклады); the 38th Federation of European Biochemical Societies Congress (St. Petersburg, Russia 2013, постер); Международная научная конференция «Молодежь в науке – 2014» (Минск, Беларусь 2014, устный доклад); UK–Russia Researcher Links Workshop «Extracellular vesicles – mechanisms of biogenesis and roles in disease pathogenesis» (Moscow, Russia 2015, устный доклад); 6th Congress of European Microbiologists (Maastricht, The Netherlands 2015, постер); IX Международная научная конференция: «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, Беларусь 2015, устный доклад); III Пушинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пушино, Россия, 2016, устный доклад). По материалам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 125 страницах, содержит 8 таблиц и 34 рисунка. Библиографический указатель содержит 360 источника литературы.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *LYSOBACTER* SPP.

Род *Lysobacter* принадлежит к семейству *Xanthomonadaceae* и впервые описан в 1978 г. (Christensen&Cook 1978). Представители рода являются строгими аэробами, заселяющими почву и пресноводные водоемы (Christensen&Cook 1978; Reichenbach 2006). Первоначально род включал четыре вида: *L. antibioticus*, *L. brunescens*, *L. enzymogenes*, *L. gummosus* (de Bruijn *et al.*, 2015). Филогенетический анализ полных геномов представителей семейства *Xanthomonadaceae* (*Lysobacter*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*) показал, что геном *Lysobacter* отличается от геномов *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas* (de Bruijn *et al.*, 2015). Хотя ранее нередко возникала путаница с отнесением представителей рода *Lysobacter* к другим родам. В качестве примера можно привести *L. enzymogenes*, который обозначается в некоторых работах как *Achromobacter lyticus* (Li *et al.*, 1997).

Название рода *Lysobacter* связано с проявлением представителями высокой литической активности по отношению к бактериям, грибам, нематодам, одноклеточным водорослям (Christensen&Cook 1978). Широкий спектр литического действия *Lysobacter* spp. обусловлен продукцией целого ряда биологически активных соединений: внеклеточные ферменты (протеазы, пептидогликангидролазы, глюканазы, липазы, хитиназы), короткие пептиды (например, цикло (L-Pro-L-Tyr), антибиотики (циклодепсипептиды, циклические липодепсипептиды и др.) (Bone *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 2003; Folman *et al.*, 2003; Palumbo *et al.*, 2003, 2005; Ogura *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2012; Cimmino *et al.*, 2014; Pidot *et al.*, 2014; Puopolo *et al.*, 2014). Каждый из этих классов соединений заслуживает особого внимания как с точки зрения биохимии (биосинтез, секреция, катализ), так и с точки зрения широкого практического их применения (медицина, сельское хозяйство, пищевая индустрия, производство моющих средств). В частности, *Lysobacter* считают неисчерпаемым источником новых литических агентов (Pidot *et al.*, 2014).

Несмотря на интенсивное изучение в последнее время представителей рода *Lysobacter*, в литературе отсутствует информация об образовании у них везикул. Штамм *Lysobacter* sp. XL1, изучаемый в ИБФМ РАН, является единственным в этом таксоне, для которого описана способность к везикулообразованию и секреции бактериолитических ферментов с их помощью. Везикулы и литические ферменты неразрывно связаны с клеточной оболочкой бактерий. Везикулы являются структурами, образованными компонентами клеточной оболочки. Внеклеточные литические ферменты в процессе

секреции через клеточную оболочку созревают, т.е. эта структура является важной для их биогенеза. Также для этих белков клеточные стенки других бактерий являются субстратом. Настоящий обзор будет посвящен современным представлениям о строении клеточной оболочки бактерий, об образовании везикул у грамотрицательных бактерий и о функционировании внеклеточных бактериолитических ферментов.

1.2 КЛЕТОЧНАЯ ОБОЛОЧКА БАКТЕРИЙ

Клеточная оболочка – это надмолекулярная структура, состоящая из цитоплазматической мембраны, клеточной стенки (пептидогликановый слой), а у грамотрицательных бактерий еще внешней мембраны и периплазмы. Клеточная оболочка выполняет в клетке основную жизненно важную функцию – обмен информацией с окружающей средой. И для этого в ней есть все необходимое: простые и сложные транспортные системы, сигнальные системы, пул гидролитических ферментов, регуляторные ферменты и пр. Несмотря на долгую историю изучения, появления новых методов в микробиологии/биохимии и совершенствования старых, многие вопросы строения и функционирования клеточной оболочки остаются недостаточно изученными.

Еще в конце XIX бактерии подразделили на грамположительные и грамотрицательные в зависимости от способности их клеточной оболочки связывать краситель (окраска по Граму) (Gram 1884). В современной терминологии грамположительные бактерии принято называть монодермами, а грамотрицательные – дидермами (Forster&Marquis 2012). Обнаружены и переходные группы бактерий. Так, род *Deinococcus* и *Thermus* именуют простыми дидермами, в связи с тем что, несмотря на наличие внешней мембраны, у них отсутствуют гены, ответственные за биосинтез ЛПС, а также имеется толстый слой пептидогликана, что отдаляет их от классических дидерм (Gupta 2011б).

Если рассматривать бактерии в эволюционном отношении, то существует несколько гипотез их происхождения. Одно из предположений заключается в том, что первоначально возникли грамотрицательные бактерии, а затем от них произошли грамположительные (Cavalier-Smith 2006; Griffiths 2007; Valas&Bourne 2009). Альтернативная гипотеза заключается в происхождении дидерм от грамположительных бактерий. В 2009 г. Джеймс Лейк предположил, что дидермы могли произойти в результате эндосимбиотических взаимоотношений между *Actinobacteria* и *Clostridia* (Lake 2009). Позже Гуптой и Эррингтоном была предложена наиболее вероятная гипотеза происхождения дидерм от монодерм (Gupta 2011б; Errington 2013). Появление клеточной стенки (возникновение грамположительных бактерий) явилось ключевым шагом в

эволюции бактерий и дало ряд преимуществ: защита от агрессивных факторов среды; жесткий контроль размеров, формы, ростовой ориентации; защита от безудержных горизонтальных переносов генов и др. Развитие же двухмембранных групп бактерий было обусловлено необходимостью приспособиться к среде с большим разнообразием антибиотиков (Gupta 2000; 2011б). В качестве одного из аргументов в пользу этой гипотезы свидетельствует большая устойчивость грамотрицательных бактерий к антибиотикам по сравнению с монодермами (Spratt 1994). Вероятно, что дополнительная внешняя мембрана могла возникнуть посредством сохранения внешней мембраны эндоспоры предками фирмикут (Errington 2013).

В структурном плане общими компонентами для грамположительных и грамотрицательных бактерий являются цитоплазматическая мембрана и пептидогликан.

Строение и функции цитоплазматической мембраны бактерий достаточно хорошо изучены и подробно описаны в ряде обзоров и книг (Salton 1994; Weiner&Rothery 2007; Dufresne&Paradis–Bleau 2015). В состав цитоплазматической мембраны входят фосфолипиды и белки. Белки (интегральные и периферические) можно отнести к нескольким функциональным классам (белки дыхательной цепи, секреторного аппарата, «энергетические» белки, белки–транспортёры, белки, принимающие участие в сигналинге, часть белков жгутика, белки, необходимые для деления и др.). Фосфолипиды формируют бислой, обуславливающий непрерывность мембраны. Фосфолипидный состав цитоплазматической мембраны, например, *Escherichia coli* представлен фосфатидилэтаноламином, фосфатидилглицеролом и кардиолипином. Цитоплазматическая мембрана выполняет основные жизненно важные для бактериальной клетки функции: защита, дыхание, транспорт питательных веществ в клетку и метаболитов из клетки, секреция белков и компонентов клеточной оболочки, синтез АТФ, репликация ДНК, сигнальная трансдукция, деление клетки. По своей природе цитоплазматическая мембрана является гидрофобной, что позволяет ей защищать внутреннее гидрофильное содержимое цитоплазмы от «утечки», а также от воздействия губительных факторов внешней среды (Jiang *et al.*, 2006).

Секреция белков через цитоплазматическую мембрану как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий осуществляется с помощью Tat (twin arginine translocase) и Sec–систем (Paetzl *et al.*, 2000; Carlos *et al.*, 2000; Mori&Ito 2001; Vassylyev *et al.*, 2006; Tsukazaki *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; Park&Rapoport 2011a; Schneewind&Missiakas 2012; Chatzi *et al.*, 2014; Green&Mescas 2016). Через Tat–систему секреторируются конформационно свернутые белки (Bruser&Sanders 2003; Walther *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2014; Green&Mescas 2016). Sec–система состоит из трех полипептидов

SecY, SecE, SecG, которые встроены в виде тримера в мембрану, а также SecA (Chatzi *et al.*, 2014). В отличие от Tat-системы через SecYEG секретируются конформационно развернутые белки.

Пептидогликан является одним из основных структурных полимеров в клеточной оболочке эубактерий, отвечающий за их форму и жизнеспособность. Основной структурной единицей пептидогликана является углеводный каркас, состоящий из чередующихся остатков сахаров N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, связанных β -1,4-гликозидными связями и закрученных в правую спираль (периодичность – 3 повтора дисахаридов), и пептидная цепь из чередующихся D и L – аминокислот (Schleifer&Kandler 1972; Burge *et al.*, 1977; Doyle&Dziarski 2001; Meroueh *et al.*, 2006; de Pedro&Cava 2015). Первая аминокислота пептидной цепи связана с N-ацетилмурамовой кислотой амидной связью.

Несмотря на то что «химическая формула» пептидогликана известна еще с конца XX века, его пространственное расположение в клетке до конца не понято. Это связано в первую очередь с отсутствием методик, позволяющих изучить структуру пептидогликана в интактной клетке, а также с невозможностью выделить интересующие фрагменты клеточной оболочки в чистом виде, не нарушив их пространственной структуры. Исследование трехмерной структуры пептидогликана необходимо для понимания важных процессов, происходящих в клетке: морфогенез, клеточное деление (в т.ч. функционирование автолитических пептидогликангидролаз), секреция белков и других продуктов клеточного метаболизма и пр.

На сегодняшний момент предложено несколько моделей трехмерного строения пептидогликана бактерий. Классической моделью является предположение о том, что пептидогликановый остов расположен параллельно плазматической мембране, образуя плоскую сеть (рис. 1) (Koch 1998; Holtje 1998). Однако при построении этой модели с помощью математических подходов исследователи пришли к заключению, что она противоречит некоторым известным расчетным параметрам (в частности, диаметр поры), а также такому важному биологическому процессу как деление клетки при смене направления плоскости деления. Исходя из этого, была сформулирована альтернативная модель «эшафот» (перпендикулярная модель), в которой углеводные тяжи ориентированы перпендикулярно плазматической мембране (Dmitriev *et al.*, 2003, 2004). ЯМР-исследования синтезированного фрагмента пептидогликана подтвердили вероятность существования этой модели, но с некоторыми дополнениями: спиральный углеводный каркас (3 повтора дисахаридов) расположен перпендикулярно мембране и вместе с

пептидными цепями формирует архитектуру «пчелиные соты» (рис. 2а) (Meroueh *et al.*, 2006).

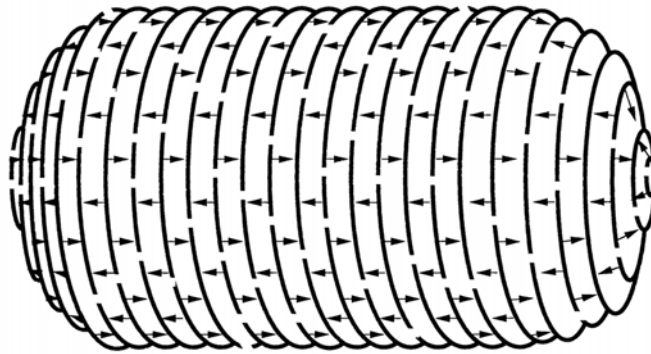


Рис. 1. Классическая модель архитектуры пептидогликана *E. coli* (Holtje 1998). Параллельными линиями изображена углеводная часть пептидогликана, стрелками – пептидные связи между соседними пептидными цепями.

В пользу модели «пчелиные соты» свидетельствуют данные о сопоставимости расчетного размера самой маленькой поры пептидогликана в этой модели диаметру пептидогликансвязывающего участка TolC, равному 70 Å.

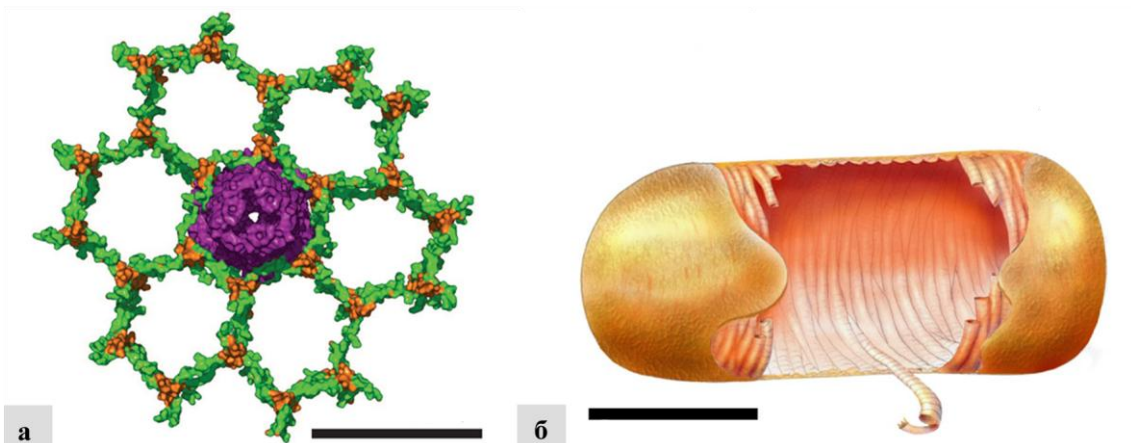


Рис. 2. Модели архитектуры пептидогликана.

а – Модель «пчелиные соты» – модель «эшафот» с дополнением (Meroueh *et al.*, 2006). Вид сверху. На рисунке представлен спиральный углеводный каркас (3 повтора дисахаридов) – отмечен желтым цветом – расположен перпендикулярно мембране и пептидные цепи (зеленый цвет). Из поры выступает белок TolC (фиолетовый цвет). Размер метки равен 100 Å. **б** – Модель архитектуры пептидогликана с несколькими уровнями организации (Hayhurst *et al.*, 2008): полимиризация углеводного каркаса в виде «каната» с последующим его сворачиванием в виде «спирали». Метка соответствует 1 мкм.

Еще одна модель была предложена в результате изучения пептидогликана *B. subtilis* (материал был получен при мягком разрушении клеток) методом атомно–силовой микроскопии (рис. 2б). Было выявлено, что пептидогликан имеет макроструктуру в виде

«канатов» с шириной 50 нм, идущих по короткой оси клеток (Hayhurst *et al.*, 2008). Исследователи предложили, что в процессе биосинтеза углеводные тяжи полимеризуются (углеводный каркас из 5000 дисахаридов в длину) в виде пептидогликановых «канатов», которые в свою очередь сворачиваются в «спираль» с диаметром 50 нм. Последняя встраивается в клеточную стенку посредством поперечных сшивок с уже существующими спиральными «канатами».

Вопрос, касающийся биосинтеза пептидогликана, изучен значительно лучше. В настоящее время накоплено много информации об этом процессе, которая обобщена в книге «Procarvotic cell wall compounds» (Litzinger&Mayer 2010). Биосинтез пептидогликана практически идентичен у монодерм и дидерм. В цитоплазме происходит синтез предшественников УДФ-производных N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты-пептид (так называемые нуклеотиды Парка) (Park&Strominger 1957). Транслокация производных через цитоплазматическую мембрану осуществляется посредством липида II (C₅₅-пирофосфат-N-ацетилмурамовая кислота-пептид-N-ацетилглюкозамин) (Anderson *et al.*, 1965). На последнем этапе сборки (протекает в периплазме в случае дидерм или в компартменте клеточной стенки у монодерм) задействована монофункциональная гликозилтрансфераза, которая обеспечивает углеводное наращивание каркаса, а также транспептидазы PBPс (Archibald *et al.*, 1993). PBPс являются мишенью для β-лактамных антибиотиков, действие которых приводит к суицидальному ингибированию фермента. Известно два класса PBPс: высокомолекулярные и низкомолекулярные. Высокомолекулярные белки PBPс класса А являются бифункциональными, т.е., помимо поперечных сшивок пептидных субъединиц, полимеризуют углеводный каркас. Низкомолекулярные PBPс являются карбоксипептидазами: гидролизуют пептидную связь между терминальными аминокислотами в пептидной цепи (D-Ala-D-Ala), предотвращая поперечные сшивки между соседними цепями (Ghuysen 1991; Litzinger&Mayer 2010).

Транспептидазы катализируют сшивку между пептидными субъединицами. Так, у большинства монодерм терминальная связь D-Ala-D-Ala донорной цепи при взаимодействии с белками PBPс класса А разрушается, при этом формируется тетрапептидил-производное фермента. На втором этапе PBPс переносят этот фрагмент на акцептор – на последнюю аминокислоту глицин (в случае *S. aureus*) в межпептидном мостике (Litzinger&Mayer 2010). Сшивка пептидных субъединиц соседних цепей дидерм происходит непосредственно. Так, только что синтезированные пептидные субъединицы включаются в пептидогликан при формировании DD-поперечных пептидных связей (Glauner&Holtje 1990). Однако со временем при «созревании» пептидогликана количество

LD–поперечных пептидных связей увеличивается: связь между D–Ala в четвертой позиции и NH₂–группой мезо–диаминопимелиновой кислоты (L–конфигурация) соседней цепи. Формирование LD–поперечных пептидных связей обусловлено работой монофункциональной транспептидазы (L,D–TP), отличающейся структурно и функционально от PBPс класса А (Litzinger & Mayer 2010). L,D–TP формирует LD–связи преимущественно в тех регионах пептидогликана, где произошло встраивание предшественника (Siegrist *et al.*, 2013). Исследователями предполагается, что LD–связи выполняют важную физиологическую и структурную функцию, в частности, обеспечивают устойчивость к антибиотикам (de Pedro & Cava 2015)

1.2.1 Структурные особенности клеточной оболочки грамположительных бактерий

Клеточная оболочка монодерм состоит из цитоплазматической мембраны и клеточной стенки, в которой различают внутреннюю и наружную клеточные зоны (рис. 3а).

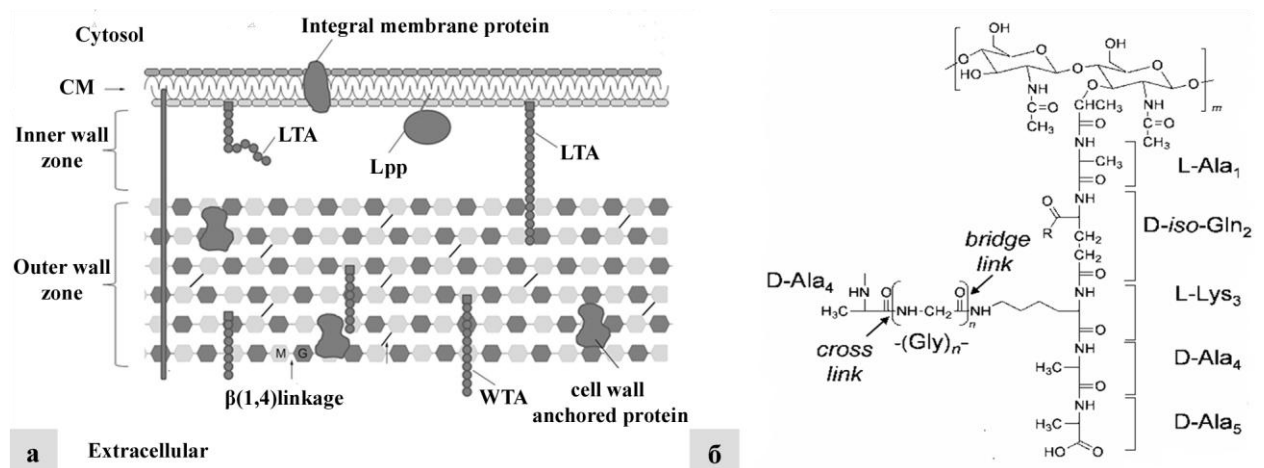


Рис. 3. Структура клеточной оболочки монодерм. **а** – Схема клеточной оболочки монодерм (Forster & Marquis 2012). CM, цитоплазматическая мембрана; inner wall zone, внутренняя клеточная зона; outer wall zone, наружная клеточная зона; cytosol, цитоплазма; integral membrane protein, интегральные белки; LTA, липотейхоевые кислоты; Lpp, липопротеин; $\beta(1,4)$ linkage, гликозидная связь между двумя структурными сахарами пептидогликана; WTA, тейхоевые и тейхуроновые кислоты; cell wall anchored protein, белки, заякоренные в пептидогликан; extracellular, внеклеточное пространство.

б – Структура пептидогликана *S. aureus* (Sharif *et al.*, 2009). Сахарные единицы пептидогликана (N–ацетилглюкозамин и N–ацетилмурамовая кислота); чередующиеся D и L–аминокислоты в пептидной цепи; L–лизин и D–аланин соседних пептидных цепей соединены посредством пентапептидного глицинового мостика.

Стоит отметить, что у монодерм выделяют также пространство в клеточной оболочке, напоминающее периплазматическое дидерм (внутренняя зона клеточной стенки) (Dijkstra&Keck 1996).

Клеточная стенка монодерм защищает клетку от механического и осмотического лизиса и служит площадкой для закрепления анионных полимеров. Толщина внутренней клеточной зоны составляет 30 нм. Эта зона включает также белки и цепи липотейхоевых кислот. Внешняя клеточная зона состоит из пептидогликана и присоединенных к нему анионных полимеров (тейхоевые, тейхуроновые кислоты) и транспептидаз сортаз (обуславливают встраивание в клеточную стенку белков, поглощающих геммовое железо и играющих роль в патогенезе, а также участвующих в формировании спор и др.) (Mazmanian *et al.*, 2003; Marraffini *et al.*, 2006a; Marraffini&Schneewind 2006б). Толщина этой зоны от 25 до 50 нм (Reichmann&Grundling 2011; Vollmer *et al.*, 2008a; Forster&Marquis 2012).

Пептидные субъединицы соседних цепей у грамположительных бактерий соединены межпептидными мостиками, структура которых весьма вариабельна. Согласно классификации Шлейфера и Кандлера, у грамположительных бактерий обнаружено более 100 различных типов пептидогликана (Schleifer&Kandler 1972). Хемотипы пептидогликана различаются по аминокислотным последовательностям и их позициям, участвующим в формировании поперечной сшивки с соседней пептидной цепью. Такая сшивка может осуществляться либо непосредственно между двумя пептидными субъединицами, либо с помощью пептидного мостика. Например, пептидогликан *S. aureus* относится к типу А3а: межпептидный мостик из пяти глицинов формируется между L-Lys в третьей позиции первой пептидной цепи и D-Ala в четвертой позиции соседней цепи (рис. 3б). Для пептидогликана монодерм характерен высокий процент поперечных сшивок. Так, для *S. aureus* установлено значение в 80–90% (Gally *et al.*, 1991).

К анионным полимерам относятся тейхоевые кислоты, тейхуроновые кислоты и липотейхоевые кислоты, о структуре, биосинтезе и функционировании которых накоплено немало экспериментальных данных (Наумова 1978; Beveridge&Murray 1980; Schaffer&Messner 2005; Потехина 2006; Brown *et al.*, 2013; Chapot-Chartier&Kulakauskas 2014; Malanovic&Lohner 2016). Показано, что анионные полимеры играют важную роль в регуляции активности автолитических ферментов, необходимых для роста и деления бактериальной клетки; в связывании и резервировании катионов; в процессах межклеточного узнавания; рецепции фагов; в формировании структуры полиэлектролитного геля и определения ее механических свойств; в патогенезе; а также в

секреции внеклеточных ферментов (Потехина 2006; Forster&Marquis 2012; Schneewind&Missiakas 2012; Malanovic&Lohner 2016).

1.2.2 Структурные особенности клеточной оболочки грамотрицательных бактерий

Клеточная оболочка дидерм включает в себя внутреннюю, цитоплазматическую мембрану и внешнюю мембрану, между которыми расположена периплазма и пептидогликан (рис. 4). Внешняя мембрана ассиметрична: внутренний ее слой составляют фосфолипиды, а внешний – ЛПС. Также в ее состав входят мембранные белки.

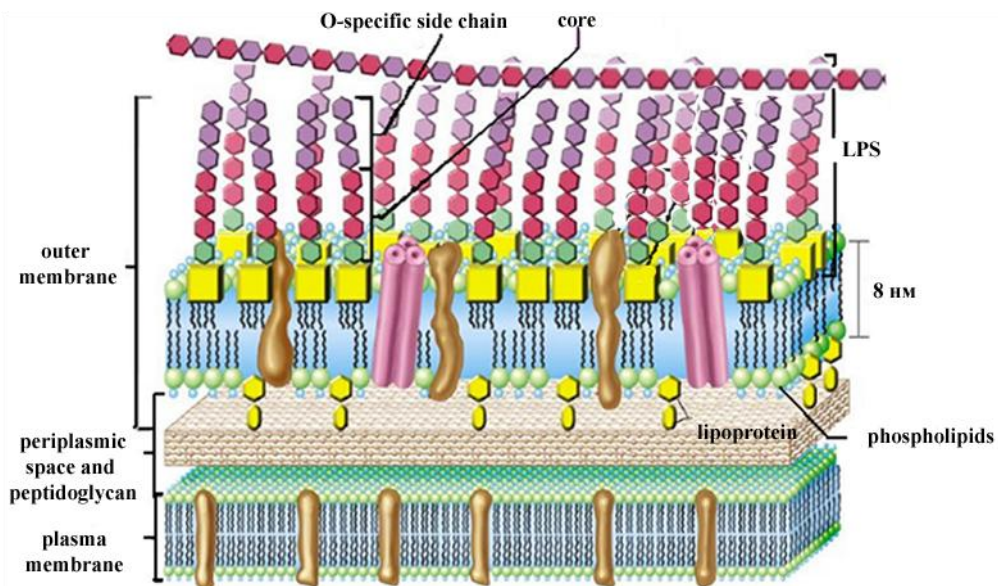


Рис. 4. Схема клеточной оболочки дидерм (Poinsot *et al.* 2012).

Plasma membrane, цитоплазматическая мембрана; periplasmic space and peptidoglycan, периплазматическое пространство и пептидогликан; outer membrane, внешняя мембрана; capsular polysaccharide, капсульный полисахарид; LPS, липополисахарид и его составные части: липид А, кор и O-специфический участок; peptidoglycan, пептидогликан; porin, порины; lipoprotein, липопротеин.

Пептидогликановый слой дидерм имеет толщину около 7–8 нм (Vollmer&Holtje 2004) и характеризуется отсутствием межпептидных мостиков между пептидными субъединицами, которые соединяются непосредственно друг с другом. В результате, для грамотрицательных бактерий характерен лишь один хемотип пептидогликана – A1 γ : пептидная связь формируется между карбоксильной группой D-Ala в четвертой позиции пептидной субъединицы и NH₂-группой мезо-диаминопимелиновой кислоты в третьей позиции соседней субъединицы (Schleifer&Kandler 1972). Процент сшивки пептидных цепей составляет около 50%.

Менее развитый пептидогликановый слой грамотрицательных бактерий по сравнению с грамположительными компенсируется наличием внешней мембраны,

которая и выполняет основную защитную функцию. Внешняя мембрана ассиметрична. Ее внутренний слой составляют фосфолипиды. Защиту от встраивания фосфолипидов во внешний слой обеспечивают внешнемембранный фермент PldA и ABC транспортная система (Ma путь) (Malinverni&Silhavy 2009). В целом, внутренний слой внешней мембраны содержит те же фосфолипиды, что и цитоплазматическая мембрана, но в других соотношениях (например, у *E. coli* и *Helicobacter pylori*) (Olofsson *et al.*, 2010; Dufresne&Paradis–Bleau 2015). В настоящее время роль фосфолипидов в различных физиологических процессах бактерий (например, биогенез мембранных белков, трансдукция сигнала и пр.) довольно интенсивно изучается.

Наружный слой внешней мембраны состоит из ЛПС и выполняет значимую роль в жизнедеятельности бактериальной клетки. ЛПС обуславливает стабилизацию внешней мембраны, является барьером для внедрения в клетку опасных соединений, в том числе антибиотиков, участвует в биогенезе внешнемембранных белков, а также определяет вирулентность патогенных штаммов (эндотоксин) (Cruy *et al.*, 1984; Vos *et al.*, 2007; Wang&Quinn 2010; Page 2012; Gujrati *et al.*, 2014). ЛПС состоит из трех частей: O–специфический участок (O–антигенный полисахарид), кор и липид А (рис. 5).

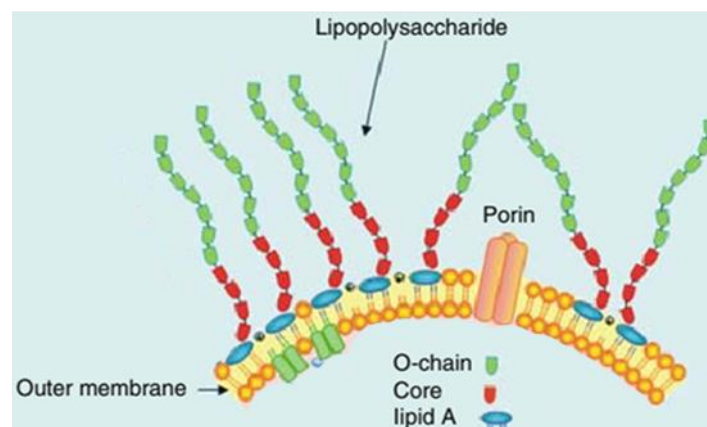


Рис. 5. Схема структуры внешней мембраны дидерм (Silipo *et al.*, 2010). На схеме представлены порины (porins), фосфолипиды, формирующие внутренний листок внешней мембраны (желтый цвет), и ЛПС, состоящий из липида А (lipid A), кора (core) и O–антигена (O–chain).

O–антиген выступает в качестве связывающего сайта для бактериофагов и белков иммунной системы, обуславливает формирование биопленок (Fletcher *et al.*, 1993; Thuruthyil *et al.*, 2001; Baumgarten *et al.*, 2012). O–антигенные единицы очень вариабельны и состоят из 2 – 6 сахарных остатков. Так, 20 антигенных структур определены для *P. aeruginosa* (Raymond *et al.*, 2002; Kintz&Goldberg 2008), для *E. coli* – 170 типов, которые определяются как серотипы (Raetz&Whitfield 2002).

Коровые сахара более консервативны по сравнению с антигенными. В коровом участке выделяют два домена: внутренний кор, представленный КДО и L-глицеро-D-манно-гептозой; и внешний кор, состоящий в основном из гексоз. Благодаря присутствию остатков кислых моносахаридов и фосфатных групп кор, как и липид А, обладает способностью связывать катионы двухвалентных металлов, что играет важную роль в стабилизации внешней мембраны (Wilkinson 1983; Mashburn-Warren&Whiteley 2006). Элиминация двухвалентных катионов от ЛПС дестабилизирует этот комплекс и мембранную систему в целом. Мутации по компонентам корового участка приводили к повышенной восприимчивости бактерий к антибиотикам и снижали вирулентность патогенных бактерий (Nikaido&Vaara 1985; Nikaido 2003).

Липид А необходим для бактериального роста, и ингибирование его биосинтеза приводило к летальному исходу бактерий (Raetz 1993; Wyckoff *et al.*, 1998). Липид А представляет собой гидрофобную часть ЛПС, состоит из глюкозаминовых дисахаридов, связанных β -1,6-гликозидной связью и формирующих амидные и эфирные связи с жирными кислотами (Bos *et al.*, 2007; Page 2012). Именно липид А выполняет роль эндотоксина патогенных бактерий, который способствует развитию сепсиса (Li *et al.*, 2008; Wang&Quinn 2010). Составляющие ЛПС способствуют стабильности всего комплекса и мембраны в целом за счет гидрофобных взаимодействий углеводных цепей липида А, водородных связей между сахарами коровой части и ионных мостиков между фосфатами липида А, коровой части и двухвалентными катионами (Page 2012).

Белки внешней мембраны выполняют важную функциональную нагрузку: обеспечивают секрецию белков во внеклеточное пространство, а также способствуют правильной сборке самой внешней мембраны (Вам-комплекс и Lol-система) (Bos *et al.*, 2007; Page 2012; Calmettes *et al.*, 2015). Практически все интегральные внешнемембранные белки имеют домен β -баррель, который формируется из четного числа β -цепей, идущих антипараллельно (Mirus *et al.*, 2010). В отличие от α -спиральной конформации β -баррель является менее гидрофобным и способен пересечь цитоплазматическую мембрану, а в дальнейшем и встроиться во внешнюю. Внешнемембранные белки в конформации β -баррель делятся на четыре класса: «классические» порины, субстрат-специфичные порины, белки, участвующие в биогенезе мембраны, белки секреторного аппарата (Mirus *et al.*, 2010).

«Классические» порины обеспечивают неспецифичную диффузию гидрофильных соединений через внешнюю мембрану. Например, белки PhoE, OmpF и OmpC *E. coli*, через поры которых диффундируют небольшие гидрофильные соединения около 600 Да (Nakaе 1975). В мембране они формируют тримерный комплекс. Размер поры OmpC

меньше, чем в порине OmpF. При этом бактерия контролирует продукцию этих белков в зависимости от условий окружающей среды: при высокой ионной силе и температуре продуцируется OmpC, при низких показателях указанных факторов – OmpF (Mirus *et al.*, 2010). Два других порина OmpF *P. aeruginosa* и OmpA *E. coli* примечательны тем, что через них медленнее диффундируют моносахариды, но способны проходить крупные электролиты. «Классические» поры обеспечивают также процессинг субстрата. Например, PagP *E. coli* принимает участие в биосинтезе ЛПС, а именно переносит остаток пальмитиновой кислоты от фосфолипидов к липиду A (Ahn *et al.*, 2004).

Субстрат–специфичные поры участвуют в переносе сахарозы (например, ScrY у *E. coli*), жирных кислот (например, FadL у *E. coli*), сидерофоров (например, TonB–зависимый внешнемембранный транспортер) и др. (Black *et al.*, 1987; Mirus *et al.*, 2010). К белкам, принимающим участие в биогенезе внешней мембраны, относится Vam–комплекс *E. coli*, состоящий из пяти белков (Calmettes *et al.*, 2015). Белок VamA обеспечивает финальную сборку внешнемембранных белков, а ассоциированные в комплекс липопротеины VamBCDE влияют на функционирование самого VamA (Rigel *et al.*, 2013). Белок VamA содержит пять периплазматических доменов POTRA (polypeptide translocation associated), которые представляют собой «площадку» для взаимодействия с остальными компонентами Vam–комплекса, а также с шаперонами внешнемембранных белков (Ricci *et al.*, 2012). Предполагается, что встраивание белков во внешнюю мембрану осуществляется через латеральную пору VamA (Calmettes *et al.*, 2015). Также исследователи считают, что процесс может облегчаться за счет дестабилизации мембраны около VamA в силу особенностей структуры этого белка (имеются разомкнутые β –цепи в β –барреле). В свою очередь, более тонкий липидный слой, который наблюдается вблизи VamA, может также способствовать встраиванию белков за счет более низкого кинетического барьера для их фолдинга (Kleinschmidt&Tamm 2002). Имеются экспериментальные данные о том, что ЛПС может способствовать фолдингу встраиваемых внешнемембранных белков. Предполагается, что роль ЛПС в биогенезе внешнемембранных белков осуществляется на поздних стадиях, после встраивания белков во внешнюю мембрану, которая может заключаться в реорганизации петель белка, выходящих за пределы клетки (Ames *et al.*, 1974; Koplou&Goldfine 1974; Sen&Nikaido 1990; Vos *et al.*, 2007).

Белки секреторного аппарата обеспечивают секрецию внеклеточных белков, перенос ДНК, сборку фимбрий и пилей и др. В настоящее время у грамотрицательных бактерий установлено шесть путей секреции (Type Secretion Systemes, TSS) (Silen *et al.*, 1989; Koronakis *et al.*, 1989; Ladant&Ullmann 1999; Thanassi&Hultgren 2000;

Lee&Schneewind 2001; Christie 2001; Hinsa *et al.*, 2003; Galan&Wolf–Watz 2006; Remaut *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2007; Alvarez–Martinez&Christie 2009; Galan *et al.*, 2014; van Ulsen *et al.*, 2014; Durand *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2015). Секреция субстратов через клеточную оболочку осуществляется либо в один этап, либо является двухстадийным процессом. Секреторные системы T5SS и T2SS относятся к двухстадийным механизмам.

Протеом внешних мембран некоторых дидерм хорошо изучен, например, у *E. coli* и *Pseudomonas spp.* (Hancock&Worobec 1998; Lee *et al.*, 2007; Winsor *et al.*, 2009; Taddei *et al.*, 2011). Для рода *Lysobacter* в настоящее время установлено только четыре полных генома (*L. antibioticus* ATCC 29479, *L. antibioticus* 76, *L. gummosus* 3.2.11, *L. capsici* 55), которые доступны в базах данных (RefSeq; de Bruijn *et al.*, 2015).

Еще одним важным компонентом клеточной оболочки являются липопотеины. Выделяют свободную и связанную с пептидогликаном форму липопотеинов (Braun&Bosch 1972). Липопотеины являются одними из основных соединений, обуславливающих жесткость внешней мембраны. Об этом свидетельствуют исследования, связанные с мутациями, приводящими к усечению структуры липопотеина или к нарушению связывания липопотеина и пептидогликана (Deatherage *et al.*, 2009; Schwechheimer *et al.*, 2013). Это в свою очередь ведет к «разрыхлению» внешней мембраны, увеличению ее проницаемости и усилению везикулообразования. Встраивание липопотеина во внешнюю мембрану осуществляется через N–ацилдиацилглицерилцистеин (Bos *et al.*, 2007). Сразу после секреции через цитоплазматическую мембрану происходит ацетилирование N–участка липопотеина, после чего он поступает в систему Lol, состоящую из пяти белков и необходимую для доставки липопотеинов к внешней мембране (Okuda&Tokuda 2011; Calmettes *et al.*, 2015). Однако механизм обмена между внешней мембраной и Lol–системой в настоящее время не изучен.

Важным компартментом клеточной оболочки является периплазма, которая составляет 20–40% от всего объема бактериальной клетки. В периплазме происходит непрерывающийся поток макромолекул: моно– и олихосахариды, аминокислоты, пептиды, растворимые биосинтетические предшественники пептидогликана, секретируемые белки, автолизины, периплазматические шапероны, а также гидролитические и детоксицирующие ферменты (Seltmann&Holst 2002). Именно в переплазме происходят такие важные для клетки процессы, как детоксикация вредных соединений (например, β –лактамаза инактивирует β –лактамы антибиотики, предотвращая их попадание к транспептидазам PBP_s, расположенным в цитоплазматической мембране); биосинтез пептидогликана и его ресинтез; рост и деление

бактериальной клетки; распад сложных соединений до более простых, способных транспортироваться через цитоплазматическую мембрану за счет работы различных гидролитических ферментов; в периплазме временно находятся предшественники секретируемых за пределы клетки белков (например, пробелки Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1, а также α -литической протеазы *L. enzymogenes* поступают после секреции через цитоплазматическую мембрану в периплазму) и др. (Silen *et al.*, 1989; Fujishige *et al.*, 1992; Archibald *et al.*, 1993; Kadurugamuwa&Beveridge 1995; Ciofu *et al.*, 2000; Dwyer&Hellinga 2004; Vasilyeva *et al.*, 2008; Litzinger&Mayer 2010).

На сегодняшний день остается много вопросов, связанных с понимаем пространственной структуры клеточной оболочки, в особенности пептидогликана, что в свою очередь создает ряд вопросов, связанных с работой пептидогликангидролаз (внутри- и внеклеточных). Внутриклеточные (автолитические) пептидогликангидролазы являются активными участниками в замене «старого» пептидогликана новым, а также принимают активное участие в деление клетки. Внеклеточные (бактериолитические) пептидогликангидролазы расщепляют пептидогликан конкурентных бактерий, что приводит к лизису клеток-мишеней.

Клеточная оболочка является активным участником биогенеза секретируемых белков, в том числе бактериолитических ферментов. Созревание секретируемых белков происходит в процессе транслокации через этот компартмент. Также клеточная оболочка является ключевым участником биогенеза везикул, а отдельные ее компоненты являются факторами, обуславливающими этот процесс.

1.3 ВНЕШНЕМЕМБРАННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Впервые образование везикул было зафиксировано у *V. cholerae* (Chatterjee&Das 1967). Везикулы представляют собой сферические структуры диаметром от 20 до 300 нм, образуемые в результате выпячивания внешней мембраны и последующего отщепления (рис. 6). Поэтому называются они внешнемембранными. Сейчас считается, что образование внешнемембранных везикул является физиологической особенностью практически для всех грамотрицательных бактерий (Kadurugamuwa&Beveridge 1997; Beveridge 1999; Kuehn&Kesty 2005; Balsalobre *et al.*, 2006; Olofsson *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2012).

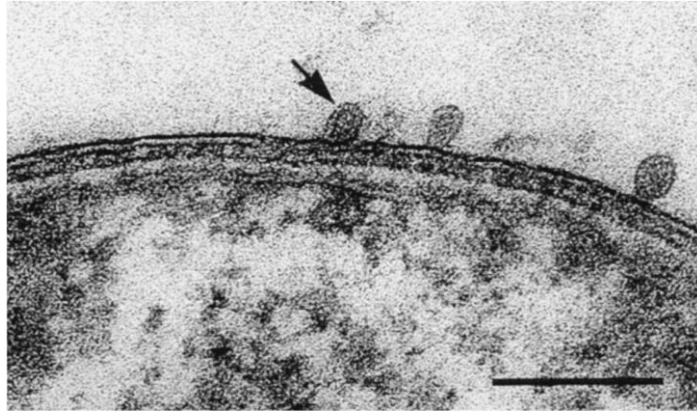


Рис. 6. Электронная микроскопия ультратонких срезов клеток *P. aeruginosa* PAO1 (Beveridge 1999).

Стрелкой указано образование везикулы. Метка соответствует 250 нм.

Стоит отметить, что везикулы формируют также монодермы и эукариотические организмы (Dorward&Garon 1990; Silverman *et al.*, 2008, 2010; Lee *et al.*, 2009; Ellen *et al.*, 2009, 2010; Rivera *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010; Gurung *et al.*, 2011; Deatherage&Cookson 2012; Rodrigues *et al.*, 2013; Gaudin *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2015). Наиболее изученным процессом является формирование эукариотами экзосом (Keller *et al.*, 2006; Mathivanan&Simpson 2010). Везикулы выполняют важную роль в жизнедеятельности организмов их образующих: секреция биологически активных соединений, в том числе факторов патогенности; межклеточный сигналинг; регуляция иммунной системы; формирование биопленок и др. (Deatherage&Cookson 2012; Brown *et al.*, 2015). В силу того что везикулы монодерм, микобактерий, грибов более молодое направление, чем везикулы дидерм, вопросов, связанных с их биогенезом и функционированием, еще больше, и каждый из них заслуживает особого внимания. Можно ли провести параллели между везикулами грамотрицательных бактерий, грамположительных бактерий, микобактерий, архей, эукариот? В каких-то вопросах, например, в их значимости – однозначно да. Что касается вопросов формирования, то этот процесс изучен недостаточно хорошо. Имеются данные об общих чертах формирования везикул археями и эукариотами. Относительно монодерм данных незначительное количество, поэтому проводить сравнение с возникшей от них группой дидерм пока сложно. Дальнейшие исследования везикул всех этих групп живых организмов позволят создать общую эволюционную картину зарождения процесса образования везикул. В данном разделе мы остановимся на везикулах грамотрицательных бактерий.

В настоящее время сложилось два основных направления везикулярных исследований – изучение биогенеза везикул и их значимости в жизнедеятельности бактериальной клетки (межбактериальные взаимодействия, взаимодействия «патоген –

хозяйин»). Основателями этих направлений можно считать американских исследователей Кадуругамуву и Бевериджа (Kadurugamuwa&Beveridge 1995, 1996, 1997; Kadurugamuwa *et al.*, 1998). Сейчас все эти направления интенсивно развиваются.

1.3.1 Структура везикул

В состав везикул входят компоненты внешней мембраны (ЛПС, белки, фосфолипиды), периплазматические компоненты и компоненты цитоплазмы, в т.ч. ДНК и РНК и, по некоторым данным, цитоплазматической мембраны (Kadurugamuwa&Beveridge 1995; Horstman&Kuehn 2000; Lee *et al.*, 2008; Olofsson *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Perez–Cruz *et al.*, 2013, 2015; Zielke *et al.*, 2014).

Некоторые исследователи относятся к наличию цитоплазматических составляющих в везикулах скептически, указывая на возможное загрязнение препаратов компонентами этих фракций (Schwechheimer&Kuehn 2015). Однако группа испанских исследователей под руководством Елены Меркад показала наличие у *P. aeruginosa* PAO1, *Acinetobacter baumannii* AB41, *Neisseria gonorrhoeae* DSM 15130 двухмембранных везикул (Perez–Cruz *et al.*, 2015). При этом суммарные препараты везикул были очищены посредством фильтрации и в градиенте плотности, что позволяет исключить загрязнение. Методом крио–электронной микроскопии, позволяющим видеть биологические образцы в состоянии близком к нативному, удалось обнаружить двухмембранные везикулы. Кроме того, наличие компонентов цитоплазмы и цитоплазматической мембраны в везикулах было подтверждено методом тандемной масс–спектрометрии. Исследователи предположили, что процесс формирования двухмембранных везикул может происходить по механизму, предложенному Бевериджем и Кадуругамувой (Kadurugamuwa&Beveridge 1995). Однако эта модель была описана для везикул, образуемых под действием антибиотика гентамицина. Предполагается, что при действии антибиотика на клеточную оболочку бактерии происходит активация работы автолитических ферментов, приводящая к изменению жесткости внешней мембраны за счет нарушения ее связи с пептидогликаном и, как следствие, к формированию везикул. Тем не менее данная модель никак не объясняет механизм проникновения цитоплазматической составляющей в везикулы. Вероятно, в будущем изучение биогенеза двухмембранных везикул, их функциональной значимости и возможности их образования у различных таксонов бактерий будет интенсивно изучаться.

Сравнительный анализ компонентов везикул и внешних мембран бактерий выявил их неидентичность (Kadurugamuwa&Beveridge 1995; Васильева *и др.*, 2009; Tashiro *et al.*, 2011; Lappann *et al.*, 2013; Roier *et al.*, 2015). Так, внешняя мембрана *P. aeruginosa* PAO1 содержит ЛПС двух типов: нейтральный (А–тип), имеющий небольшой О–специфический

участок и небольшое количество фосфатных групп; и отрицательно заряженный (В–тип), у которого О–специфическая часть, напротив, выступает над мембраной примерно на 40 нм и состоит из отрицательно заряженных сахаров, а коровая часть обогащена фосфатными и карбоксильными группами (Li *et al.*, 1996). Везикулы же, образуемые этой бактерией, содержат исключительно ЛПС В–типа (Kadurugamuwa&Beveridge 1995).

Протеом везикул, который в последнее время интенсивно изучается, также отличается от протеома внешней мембраны (Kato *et al.*, 2002; Lappann *et al.*, 2013; Roier *et al.*, 2015). Причем, если раньше было отмечено, что везикулы обогащены в основном внешнемембранными поринами, то сейчас в составе везикул обнаруживают и другие, функционально отличные внешнемембранные белки (Lee *et al.*, 2008; Tashiro *et al.*, 2011; Lappann *et al.*, 2013). Например, для везикул *N. meningitidis* установлено, что они обогащены внешнемембранными белками–аутопереносчиками и регуляторными белками, вовлеченными в поступление катионов цинка и железа в клетку. В то же время в их составе не обнаруживаются внешнемембранные порины PorA и PorB, белок RmpM, связывающий пептидогликан и др. (Lappann *et al.*, 2013).

При изучении фосфолипидного состава везикул *P. aeruginosa* PAO1 было обнаружено, что в их составе преобладает фосфатидилглицерол, в то время как во внешних мембранах – фосфатидилэтаноламин (Tashiro *et al.*, 2011).

Сейчас существует теория направленной сортировки компонентов внешней мембраны и периплазмы в везикулы (Haurat *et al.*, 2011; Bonnington&Kuehn 2014; Roier *et al.*, 2015). Неидентичность состава внешних мембран и везикул способствовала формулированию идеи о локусной природе образования последних (Kadurugamuwa&Beveridge 1995). Это, в свою очередь, положило начало развитию одного из направлений везикулярных исследований – изучению биогенеза везикул.

1.3.2 Биогенез везикул

К настоящему времени накоплено много экспериментальных данных, связанных с биогенезом везикул разных таксонов грамотрицательных бактерий. Однако в целом этот процесс еще не изучен. Все основные данные сведены в три модели биогенеза везикул. Впервые модели были обобщены Машберном–Вореном и Вайтли (Mashburn–Warren&Whiteley 2006). В дальнейшем их несколько дополнили Кухн с коллегами (рис. 7) (Kulp&Kuehn 2010).

Первая модель – временный разрыв связей между внутренней мембраной – пептидогликаном (рис. 7а). Одной из причин стабилизации внешней мембраны являются поперечные «сшивки» с пептидогликаном. Одним из таких «сшивающих» агентов является липопроtein. Липидной частью липопроtein закреплен во внешней мембране, в

то время как другая часть либо свободна, либо ковалентно связывает пептидогликан (Schwechheimer *et al.*, 2013). Было установлено, что в везикулах концентрация липопротеина низкая, а белки, связанные с липопротеином, «исключены» из везикул, что и позволило сделать предположение о формировании везикул в участках, в которых отсутствует ковалентная связь липопротеин – пептидогликан (Hoekstra *et al.*, 1976; Wensink&Witholt 1981). В дальнейшем эти данные были подтверждены и дополнены группой американских ученых под руководством Кухн. Было установлено, что нулевая мутация по трем генам транспептидаз, ответственным за формирование ковалентных связей между пептидогликаном и внешней мембраной, приводила к усилению везикулообразования примерно в 30 раз (Schwechheimer *et al.*, 2014). Схожий эффект установлен для внешнемембранного порина OmpA *E. coli*, *Salmonella* sp., *A. baumannii*, содержащего периплазматический сайт для связывания с диаминопимелиновой кислотой пептидогликана: при мутации по гену этого порина происходило усиление везикулообразования (Deatherage *et al.*, 2009, Moon *et al.*, 2012). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что формирование везикул происходит в участках свободных от «сшивающих» агентов.

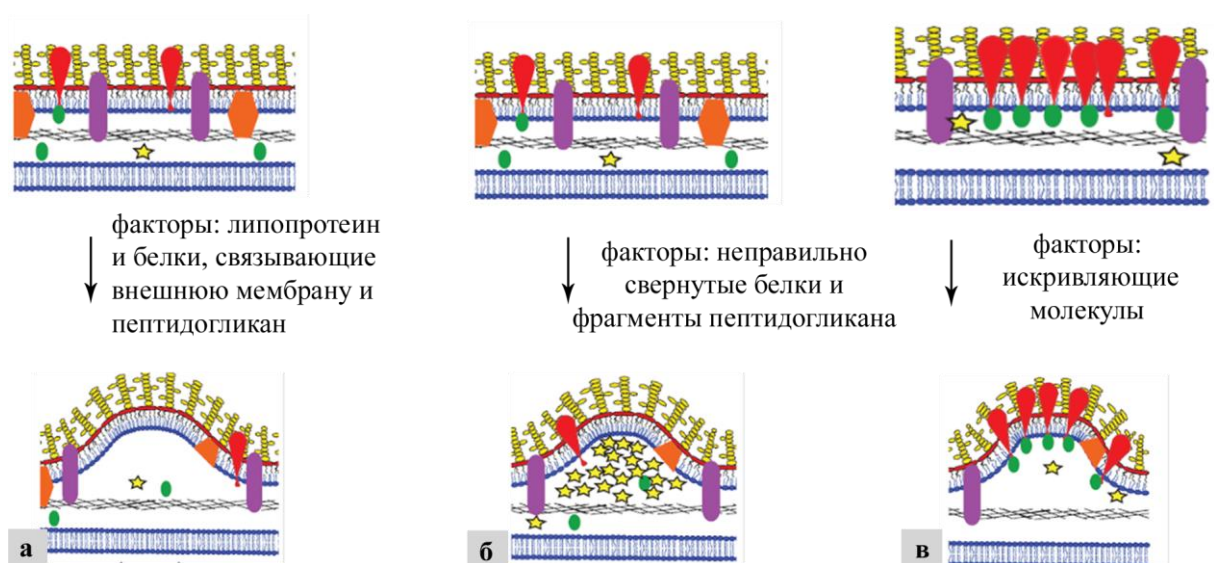


Рис. 7. Модели формирования мембранных везикул (Kulr&Kuehn, 2010). Рядом со стрелками указаны известные факторы, обуславливающие биогенез везикул грамотрицательных бактерий.

Вторая модель – давление периплазматических компонентов на внутреннюю сторону внешней мембраны (рис. 7б). Впервые образование везикул по этому типу было предложено Зоу с коллегами, которые обнаружили в составе везикул компонент пептидогликана – мурамовую кислоту (Zhou *et al.*, 1998). В дальнейшем было установлено, что при мутации автолизина *Porphyromonas gingivalis* биогенез везикул усиливается (Hayashi *et al.*, 2002). Исследователи предположили, что при мутации

автолизинов происходит неполная деградация клеточной стенки при обновлении, что приводит к накоплению фрагментов пептидогликана в периплазме, а они в свою очередь могут осуществлять давление на внешнюю мембрану. Кухн с коллегами продолжили исследования в этом направлении и несколько дополнили предложенную модель. Было показано, что при мутации гена *degP* (продукт этого гена DegP выступает в роли периплазматического шаперона при низких температурах и в роли протеазы при высоких температурах) происходит усиление везикулообразования (McBroom&Kuehn 2007; Tashiro *et al.*, 2009). Причем эффект усиливался с повышением температуры: при 30°C эффект отмечен не был, однако при 37°C происходило увеличение количества образуемых везикул, что связано с накоплением неправильно свернутых белков в периплазме (McBroom&Kuehn 2007). Исследователи предположили, что накопление таких белков в периплазме может приводить к давлению на внутреннюю сторону внешней мембраны и к усилению везикулообразования, а это в свою очередь спасает клетку от гибели за счет выброса ненужного для нее «белкового мусора». Эта гипотеза была также подтверждена экспериментами. При двойной мутации генов пермеазы AmpG (обеспечивает транспорт муропептидов из периплазмы в цитоплазму) и амидазы AmiD (мутация по этому гену способствовала накоплению больших фрагментов пептидогликана, которые не могли пройти через порины во внешнюю среду) везикулообразование у *E. coli* усиливалось примерно в 14 раз. Группа Кухн выявила, что при описанных мутациях, приводящих к накоплению неправильно свернутых белков или фрагментов пептидогликана, которые усиливают везикулообразование, количество ковалентных связей между липопротеином и пептидогликаном остается неизменным (Schwechheimer *et al.*, 2014). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что описанные два механизма не взаимосвязаны, хотя могут идти в пределах одной бактериальной клетки.

Третья модель – искривляющие молекулы, которые приводят к формированию внешнемембранных везикул в силу своей биохимической структуры (рис. 7в). Ранее уже отмечалось, что внешние мембраны *P. aeruginosa* PAO1 содержат ЛПС двух типов: нейтральный (А–тип) и отрицательно заряженный (В–тип). В везикулах, образуемых этой бактерией, обнаруживается только отрицательно заряженный ЛПС (Kadurugamuwa&Beveridge 1995). Это позволило предположить, что биогенез везикул *P. aeruginosa* PAO1 может осуществляться в участках, обогащенных липополисахардом В–типа, из–за отталкивания одноименно заряженных компонентов. В пользу этой гипотезы свидетельствуют результаты везикулообразования у *P. aeruginosa* PAO1 в условиях кислородного стресса. Показано, что в условиях кислородного насыщения увеличивалась концентрация ЛПС В–типа и, соответственно, количество образуемых везикул (Sabra *et*

al., 2003). Схожее действие было обнаружено при обработке бактерии *P. aeruginosa* перекисью водорода: наблюдалось увеличение синтеза В-типа ЛПС, а также количества образуемых везикул (Macdonald&Kuehn 2013). Эта гипотеза была дополнена исследованиями Машберн–Ворена и Вайтли (Mashburn–Warren&Whiteley 2006). Так, в биогенезе везикул *P. aeruginosa* PAO1 была предположена роль сигнальных молекул PQS, дестабилизирующих отрицательно заряженный ЛПС за счет взаимодействия PQS с катионами Ca^{2+} и Mg^{2+} . Это приводило к дестабилизации «солевых мостиков» между молекулами ЛПС за счет усиления отталкивания отрицательно заряженных компонентов. В пользу этого свидетельствуют экспериментальные данные, согласно которым при добавлении катионов Mg^{2+} действие PQS супрессировалось. Альтернативный механизм действия PQS на внешнюю мембрану, вызывающий формирование везикул, предложен американскими учеными Шетзером и Вайтли (Schertzer&Whiteley 2012). Исследования действия PQS проводились на эритроцитах, которые не содержат специфических рецепторов к PQS, а также ядра, поэтому изменения на генетическом уровне были исключены, что позволило однозначно трактовать полученные результаты. Было показано, что при низких концентрациях PQS наблюдается формирование эритроцитами выпячиваний, что, по мнению авторов, связано с «расширением» внешнего слоя. Результаты, полученные на модельной системе, были экстраполированы на бактериальную клетку. PQS секретируется посредством активного транспорта к внешней мембране бактерии, где встраивается во внешний слой за счет специфического взаимодействия с липидом А ЛПС. Это может приводить к «расширению» внешнего слоя, в результате формируется выпячивание, которое завершается образованием везикул (везикулы имеют значение отношения внешнего слоя к внутреннему больше 1). Данная модель напоминает механизм образования везикул, предложенный Ройером с коллегами, при накоплении фосфолипидов во внешнем слое внешней мембраны (как следствие, ее расширение по отношению к внутреннему слою) при нарушении системы VacJ/Yrb (ABC–транспортная система), ответственной за поддержание асимметрии во внешней мембране (Roier *et al.*, 2016).

Однако в качестве искривляющих внешнюю мембрану веществ стоит отметить еще одно соединение – кислый фосфолипид кардиолипин. Экспериментально было установлено, что в участках мембраны *E. coli* с высоким искривлением обнаруживался этот фосфолипид (Renner&Weibel 2011). В настоящее время данных о роли фосфолипидов в биогенезе везикул немного, причем многие из них противоречивы (Malinverni&Silhavy 2009; Tashiro *et al.*, 2011; Chowdhury&Jagannadham 2013; Kulkarni *et al.*, 2014; Roier *et al.*, 2016).

Несмотря на накопленные экспериментальные данные, механизмы действия факторов, обуславливающих биогенез везикул, остаются до конца не понятыми.

1.3.3 Функциональная значимость везикул

Везикулы играют важную роль в жизнедеятельности бактериальной клетки, выполняя следующие функции: защита клетки в стрессовых условиях, межбактериальные взаимодействия, взаимодействия «патоген – хозяин».

В настоящее время доказана роль везикул в защите бактерий от стрессовых факторов. Так, установлено, что при добавлении толурола в ростовую среду клетки *P. putida* H-2000 выводят его посредством внешнемембранных везикул (Kobayashi *et al.*, 2000). Другим примером могут служить везикулы, содержащие в своем составе β -лактамазу, защищая клетки от агрессивного воздействия антибиотиков пенициллинового ряда (Ciofu *et al.*, 2000).

Одним из самых известных примеров «содружества» бактерий является биопленка. Везикулы являются важной составляющей биопленок (Schooling&Beveridge 2006; Wang *et al.*, 2015). Стоит отметить, что 80% бактериальных патогенных бактерий ассоциированы в биопленки (Davies 2003). Так, для везикул патогенной бактерии *P. gingivalis* (возбудитель периодонтита) установлена способность коагрегировать другие бактерии: *Eubacterium saburreum* с *Capnocytophaga ochracea*, *S. aureus* с *Streptococcus* spp. и др. (Kamaguchi *et al.*, 2003). Более того, везикулы *P. gingivalis* обуславливают лучшее проникновение *Tannerella forsythia* в эукариотические клетки (Inagaki *et al.*, 2006). Механизмы коагрегации бактерий и опосредованной инвазии за счет везикул в настоящее время не известны. Томас Баумгартен с коллегами пришли к выводам, что при формировании везикул происходит повышение гидрофобности клеточной поверхности, что может усилить формирование биопленок клетками (Baumgarten *et al.*, 2012). Роль везикул в пределах биопленки может также заключаться в защите бактерий от воздействия антимикробных факторов, в данном случае везикулы выступают в качестве ловушки. Так, американскими исследователями под руководством Бевериджа было показано, что везикулы связывают гентамицин, защищая бактериальные клетки биопленки от гибели (Schooling&Beveridge 2006).

Имеются данные об упаковке ДНК, плазмид в везикулы и трансформации данного материала соседним клеткам (Yaron *et al.*, 2000; Renelli *et al.*, 2004). Таким образом, везикулы представляют собой еще один способ переноса генетической информации наряду с трансформацией, конъюгацией и трансдукцией (Mashburn–Warren&Whiteley 2006).

Большинство перечисленных примеров описывают роль везикул как полезных не только микроорганизмам, продуцирующим их, но и другим бактериям. Однако возможно

и другое развитие событий. Установлено, что везикулы *P. aeruginosa* PAO1 содержат автолизин, обуславливающий лизис других бактерий, что позволяет получать питательные вещества и занимать определенную экологическую нишу (Li *et al.*, 1996). При проверке литической активности этих везикул по отношению к различным представителям грамположительных и грамотрицательных бактерий был обнаружен положительный эффект (Li *et al.*, 1998б). Также был обнаружен литический эффект, хотя и более слабый, везикул, выделенных из культуральной жидкости других представителей грамотрицательных бактерий: *E. coli*, *S. pullorum*, *Shigella flexneri* и др. Причем преимущественно все везикулы обладали литической активностью по отношению к бактериям с пептидогликаном A1 γ , который характерен для всех грамотрицательных бактерий. Исследователи предположили, что происходит это в силу возможного распознавания автолизинном схожей структуры пептидогликана с пептидогликаном продуцента (Li *et al.*, 1998б). Так, пептидогликаны A1 α (бактерии *B. subtilis*, *S. viridians*) и A2 α (бактерия *Micrococcus luteus*) очень схожи с пептидогликаном A1 γ , поэтому подвергались гидролизу. Несколько неожиданным был положительный результат при действии везикул *P. aeruginosa* на бактерии с хемотипами A4 α (*Lactococcus lactis*) и A4 γ (*Brachy bacterium conglomeratum*). Ученые предположили, что другие ферменты (протеаза, липаза, фосфолипаза С) также принимают в этом процессе непосредственное участие за счет воздействия на саму клеточную оболочку или на ее вторичные полимеры. Благодаря такой агрессивной тактике везикул по отношению к клеткам–мишеням в литературе появился термин «хищные» везикулы (Li *et al.*, 1996). Так, везикулы *Mucococcus xanthus*, секретирующие щелочную фосфатазу во внеклеточное пространство, в условиях голодания добывают нужные клеткам фосфаты за счет хищнической деятельности (Evans *et al.*, 2012). На собственные клетки везикулы не оказывают летального действия, что обусловлено, по–видимому, распознаванием и строгим контролем над автолитическими ферментами (Li *et al.*, 1998б; Kadurugamuwa *et al.*, 1998). Для везикул *Lysobacter* sp. XL1 установлено, что они обладают широким спектром литического действия в отношении живых условно–патогенных и патогенных бактерий, в том числе в отношении множественноустойчивых к антибиотикам штаммов (Vasilyeva *et al.*, 2014).

Исследователи предполагают, что взаимодействие везикул с грамположительными и грамотрицательными бактериями имеют разные механизмы. Кадуругамувай и Бевериджем была предложена модель таких взаимодействий (рис. 8) (Kadurugamuwa&Beveridge 1996).

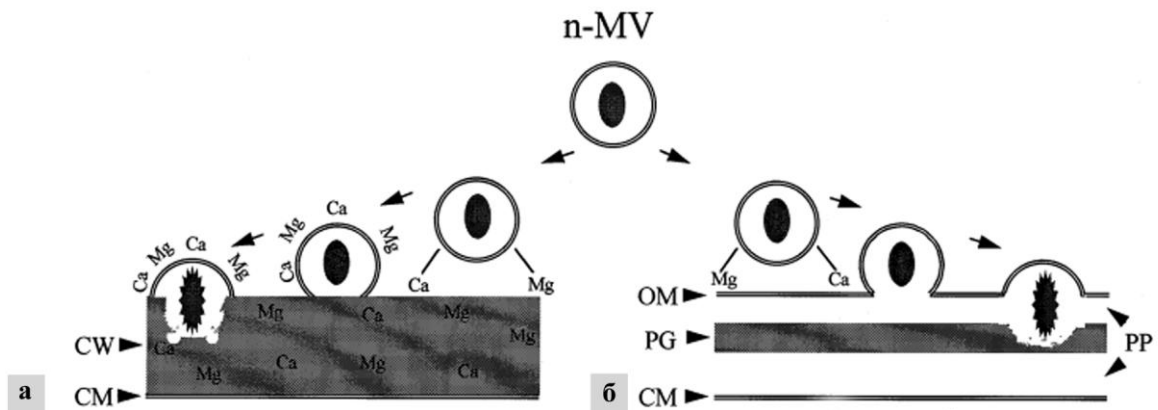


Рис. 8. Модель взаимодействия везикул с клеточными стенками бактерий (Kadurugamuwa&Beveridge 1996).

а – Взаимодействие везикул с клеточной стенкой грамположительных бактерий. **б** – Взаимодействие везикул с клеточной оболочкой грамотрицательных бактерий. N–MV, внешне-мембранные везикулы; CW, клеточная стенка; CM, цитоплазматическая мембрана; OM, внешняя мембрана; PG, пептидогликан; PP, периплазма.

При взаимодействии с поверхностью грамположительных бактерий происходит раскрытие везикул, и их литическое содержимое, в частности пептидогликангидролаза, расщепляет пептидогликан в зоне адгезии (рис. 8а). При взаимодействии везикул с грамотрицательными бактериями происходит слияние везикулярной мембраны с внешней мембраной клетки-мишени. В результате, литическое содержимое везикул попадает в периплазматическое пространство и происходит гидролиз пептидогликана (рис. 8б).

Вопросу взаимодействия «патоген – хозяин» исследователи уделяют особое внимание, т.к. везикулы патогенных бактерий играют важную роль в развитии острой инфекции за счет факторов вирулентности, содержащихся в них (Kadurugamuwa&Beveridge 1995, 1996, 1997; Horstman&Kuehn 2000; Kato *et al.*, 2002; Balsalobre *et al.*, 2006; Olofsson *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 2012; Kunsmann *et al.*, 2015; Roier *et al.*, 2015). Так, более 95% активности теплолабильного энтеротоксина (LT–токсин) *E. coli* содержится в везикулах (Horstman&Kuehn 2002; Kesty&Kuehn 2004). Высоковирулентная бактерия *E. coli* O104:H4 (гибрид энтерогеморрагической и энтероагрегативной *E. coli*), вызвавшая в 2011 г. вспышку гемолитико–уретического синдрома, секретирует посредством везикул целый спектр факторов вирулентности: шига–токсин (Stx2a), флагеллин H4, O104 ЛПС (Kunsmann *et al.*, 2015). В везикулах *H. pylori* обнаружены также многочисленные адгезины и факторы вирулентности: адгезины BabA и SabA, токсины CagA и VacA (Olofsson *et al.*, 2010). В силу небольших размеров, подходящей структуры (в том числе наличия адгезинов) везикулы способны проникать глубоко в ткани, куда не может проникнуть сам возбудитель, способствуя развитию тяжелой

интоксикации организма. В настоящее время множество экспериментальных статей и обзоров посвящено механизмам проникновения везикул, содержащих факторы вирулентности, в ткани хозяина, а также последствиям такого «вторжения» (Kadurugamuwa&Beveridge 1995; Kuehn&Kesty 2005; Ellis&Kuehn 2010; Olofsson *et al.*, 2010; Amano *et al.*, 2010; Tashiro *et al.*, 2012; Kulkarni *et al.*, 2014; Avila–Calderon *et al.*, 2015; Kaparakis–Liaskos& Ferrero 2015; Kunsmann *et al.*, 2015; Olsen&Amano 2015; Xie 2015).

Для бактерий *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *E. coli*, *H. pylory* установлено, что они формируют гетерогенные везикулы по размеру, составу и выполняемым функциям (Balsalobre *et al.*, 2006; Olofsson *et al.*, 2010; Rompikuntal *et al.*, 2012; Kunsmann *et al.*, 2015). Функциональная значимость таких везикул мало изучена, но очевидно, что это может позволить бактериальной клетке одновременно выполнять несколько функций. Так, для *H. pylory* выявлено две субпопуляции везикул, каждая из которых имеет определенный набор факторов патогенности (Cag A/VacA и SubA/BabA), что может обеспечивать проникновение этих везикул в разные клетки хозяина (Olofsson *et al.*, 2010). Для везикул штаммов *E. coli* O104:H4 также установлено перераспределение факторов патогенности по фракциям (Kunsmann *et al.*, 2015). Необходимо дальнейшее изучение гетерогенности везикул, в т.ч. и у непатогенных бактерий, о которых в настоящее время сведений нет.

Хочется отметить, что везикулы интенсивно изучаются лишь на протяжении двух последних десятилетий, и, несмотря на развитие новых методов и подходов, остается множество вопросов, связанных с пониманием их структуры, установлением факторов везикулообразования и механизмами их действия, а также с функциональной значимостью. Дальнейшее исследование всех этих вопросов может позволить использовать везикулярные структуры в качестве модели для создания лекарственных средств с адресной доставкой.

1.4 БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

Бактериолитическими ферментами (пептидогликангидролазами) называются ферменты, способные разрушать пептидогликан – основной структурный компонент клеточной стенки бактерий. История их изучения начинается с открытия Александром Флемингом лизоцима (Fleming 1922). С тех пор открыто много белков с похожими функциями. Способность продуцировать бактериолитические ферменты является общей чертой всех живых организмов (Viterbo *et al.*, 2002; Vollmer *et al.*, 2008б; Callewaert&Michiels 2010; Schmelcher *et al.*, 2012). Самый широкий спектр

бактериолитических ферментов обнаружен у бактерий. Бактериальные пептидогликангидролазы делят на две группы: внеклеточные и внутриклеточные (автолизины). Также выделяют бактериолитические ферменты вирусов – эндолизины.

1.4.1 Автолизины и вирусные эндолизины

Автолизины выполняют значимую роль в жизнедеятельности бактериальных клеток: рост, деление, спорообразование, аллолизис, формирование биопленок и др. (Heilmann *et al.*, 1997, Ishikawa *et al.*, 1998, Garcia *et al.*, 1999a, Lewis 2000; Fukushima *et al.*, 2002, Koraimann 2003, Guiral *et al.*, 2005, Ellermeier *et al.*, 2006). Так, мутация по автолизину LytB *S. pneumoniae* ведет к формированию неотделенных друг от друга клеток (Garcia *et al.*, 1999a). Автолизины принимают участие в сборке секреторных машин (Koraimann 2003; Zahrl *et al.*, 2005). Установлено, что автолизины LytA, LytC и CbpD *S. pneumoniae* принимают участие в процессе аллолизиса, в результате которого часть бактериальной культуры (компетентные клетки) начинает продуцировать бактериоцины и приобретает способность лизировать оставшуюся часть (некомпетентные клетки) культуры, получая т.о. питательные вещества (Guiral *et al.*, 2005). Бактериоцины активируют автолизины некомпетентных клеток, что приводит к их лизису (Vollmer *et al.*, 2008б). К настоящему времени накоплено большое количество работ по характеристике автолитических ферментов и их регуляции (Chan&Glaser 1972; Holtje&Tomasz 1975; Lindsay&Glaser 1976; Garcia *et al.*, 1999б; Margot *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000).

Регуляция автолизинов представляет собой важный процесс для жизнеспособности и функционирования бактериальных клеток. К настоящему времени известны два типа регуляции: на транскрипционном и посттрансляционном уровнях (Smith *et al.*, 2000; Vollmer *et al.*, 2008б). Посттрансляционная регуляция осуществляется посредством авторегуляции, процессинга пептидогликангидролаз, изменения пептидогликана, взаимодействия с тейхоевыми, липотейхоевыми кислотами, а также с кардиолипином (Holtje& Tomasz 1975; Oshida *et al.*, 1995; Wecke *et al.*, 1996; Odintsov *et al.*, 2004; Потехина 2006; Vollmer *et al.*, 2008б; Ruggiero *et al.*, 2010; Perez–Dorado *et al.*, 2010; Carrasco–Lopez *et al.*, 2011; van Heijenoort 2011; Kumar *et al.*, 2013). Например, у *B. subtilis* в различных участках клеточной стенки обнаружена разная структура тейхоевых кислот (Mauel *et al.*, 1995). Предполагается, что распределение разных тейхоевых кислот по клеточной стенке является одним из механизмов регуляции автолитических ферментов. Изучение взаимодействия автолизинов с тейхоевыми и липотейхоевыми кислотами позволило прояснить картину бактерицидного действия антибиотика пенициллина (Наумова 1978). Было установлено, что бактериальный лизис в присутствии пенициллина является следствием работы автолитических ферментов. При добавлении пенициллина к

растущей культуре происходит элиминация липотейхоевой кислоты в окружающую среду. Было предположено, что пенициллин разрушает эндогенный комплекс автолизин–липотейхоевая кислота, в результате чего фермент высвобождается, активируется и разрушает клеточную стенку бактерии. Согласно другой, более поздней гипотезе, добавление пенициллина (или антибиотика пенициллинового ряда) инактивирует PBP_s ферменты, участвующие в перекрестном сшивании полисахаридов и пептидов при синтезе пептидогликана. Происходит замещение пептидной связи D-Ala-D-Ala пептидной субъединицы в предшественнике пептидогликана β-лактамным кольцом, что приводит к необратимому взаимодействию PBP_s с таким фрагментом (Нельсон&Кокс 2012). В результате синтез пептидогликана блокируется, и бактерии погибают.

Бактериолитические ферменты вирусов принято называть эндолизинами. Впервые термин введен в научный оборот Джакобом и Фестесом, которые в 1958 г. ввели для фагового фермента, способного лизировать *E. coli* K-12, наименование эндолизин (Jacob&Fuerst 1958). Основное назначение фаговых эндолизинов сводится к высвобождению зрелых фаговых частиц в конце цикла развития (Schmelcher *et al.*, 2012). В целом, эндолизины, как и автолизины, изучены достаточно хорошо (Schmelcher *et al.*, 2012; Roach&Donovan 2015).

1.4.2 Внеклеточные бактериолитические ферменты

Внеклеточные бактериолитические ферменты позволяют бактериям бороться с конкурентными микроорганизмами и занимать при этом определенную экологическую нишу, а также получать питательные вещества. Так, для стафилолизина (протеаза LasA) *P. aeruginosa* установлена литическая активность в отношении живых клеток *S. aureus*, *M. radiodurans* и *Gaffkia tetragena* (Lache *et al.*, 1969). β-литическая протеаза *L. enzymogenes* лизирует *Arthrobacter globiformis*, *M. luteus* и *S. aureus* (Whitaker 1965a; Gillespie&Cook 1965). Этот фермент известен так же, как β-литическая протеаза *A. lyticus* M497-1 (Kessler 2013). Литическая протеаза Л5 *Lysobacter* sp. XL1 способна лизировать живые клетки *B. subtilis* W23, *M. roseus* B1236, *E. coli* K12 и др. (Vasilyeva *et al.*, 2014). Для лизостафина *S. simulans* установлена способность лизировать представителей рода *Staphylococcus* и больше никакие другие бактерии, поэтому данный фермент получил исторически такое название (Schindler&Schuhardt 1965).

Некоторые бактерии секретируют одновременно несколько различных литических ферментов (комплекс), что значительно повышает и расширяет бактериолитическую активность по сравнению с отдельными ферментами. Наблюдается так называемый синергетический эффект. В качестве примера можно привести ферментный комплекс *L. gummosus*, эффективно разрушающий *in vitro* биопленку *S. epidermidis* за счет

согласованного действия бактериолитических и протеолитических ферментов (Gokcen *et al.*, 2014). Лизоамидаза, включающая в себя пять бактериолитических ферментов *Lysobacter* sp. XL1 (Л1–Л5), обладает широким спектром литического действия в отношении живых патогенных грамположительных бактерий, является единственным препаратом, который разрушает споры бацилл, в том числе споры сибирской язвы *B. anthracis*. Ахромопептидаза обладает высокой литической активностью за счет α и β -литических протеаз *L. enzymogenes* (ранее считалось, что *A. lyticus*) (Kessler 2013).

Внеклеточные бактериолитические ферменты в отличие от автолизинов и эндолизинов изучены гораздо хуже. Многие ферменты еще до конца не охарактеризованы или вовсе не изучены, а аннотированы как мурамидазы, амидазы и др. из-за сходства их нуклеотидных последовательностей с последовательностями уже изученных ферментов. У представителей рода *Lysobacter* выделено и охарактеризовано лишь несколько ферментов: α и β -литические протеазы *L. enzymogenes* (Silen *et al.*, 1989; Fujishige *et al.*, 1992; Mace&Agard 1995; Fuhrmann *et al.*, 2004; Kessler 2013); эндопептидаза LysC *L. enzymogenes* (API *A. lyticus*) (Sakiyama&Masaki 2013); литические белки Л1–Л5 *Lysobacter* sp. XL1 (Степная *и др.*, 1992, 1996, 2005; Муранова *и др.*, 2004; Vasilyeva *et al.*, 2008, 2014).

1.4.3 Специфичность бактериолитических ферментов

Как уже отмечалось, пептидогликан является основным субстратом бактериолитических ферментов. В зависимости от типа разрушаемой связи в нем выделяют три группы ферментов: N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазы, эндопептидазы, гликозидазы (рис. 9) (Holtje&Tuomanen 1991). Первые две группы являются по сути протеазами и гидролизуют пептидную часть пептидогликана, последняя участвует в гидролизе полисахаридной части пептидогликана.

Гликозидазы разрушают β -1,4-гликозидную связь в сахарном остове пептидогликана. Гликозидазы делятся на мурамидазы, N-ацетилглюкозаминидазы и литические трансгликозилазы (Vollmer *et al.*, 2008б). Первые два типа ферментов различаются освобожденным фрагментом на редуцирующем конце. В случае с мурамидазами продукт образуется с мурамовой кислотой на редуцирующем конце. Мурамидазами являются лизоцим Т4 фага, LytC *Streptomyces pneumoniae*, целлозил *S. coelicolor*, внеклеточная мурамидаза Л3 и автолитические ферменты А4, А9 *Lysobacter* sp. XL1 и др. (Степная *и др.*, 1996; Garcia *et al.*, 1999б; Цфасман *и др.*, 2007; Vollmer 2008в). Целлозил *S. coelicolor* проявляет β -1,4-N,6-O-диацетилмурамидазную активность: способен гидролизовать O-ацетилированные пептидогликаны, характерные для многих патогенных бактерий (Vollmer 2008в). К классам N-ацетилглюкозаминидаз и литических

трансгликозилаз относятся только автолизины и эндолизины. Например, N-ацетилглюкозаминидазы AltA *Enterococcus faecalis*, AltA *S. aureus*, автолитические ферменты A1, A8, A10 *Lysobacter* sp. XL1 и др. (Biswas *et al.*, 2006; Eckert *et al.*, 2006; Цфасман *и др.*, 2007). N-ацетилглюкозаминидаза NagZ *E. coli* утилизируют дисахаридный субстрат N-ацетилглюкозамин-1,6-ангидро-N-ацетилмурамовая кислота, являющийся внутриклеточным интермедиатом в процессе обновления пептидогликана (Votsch&Templin 2000).

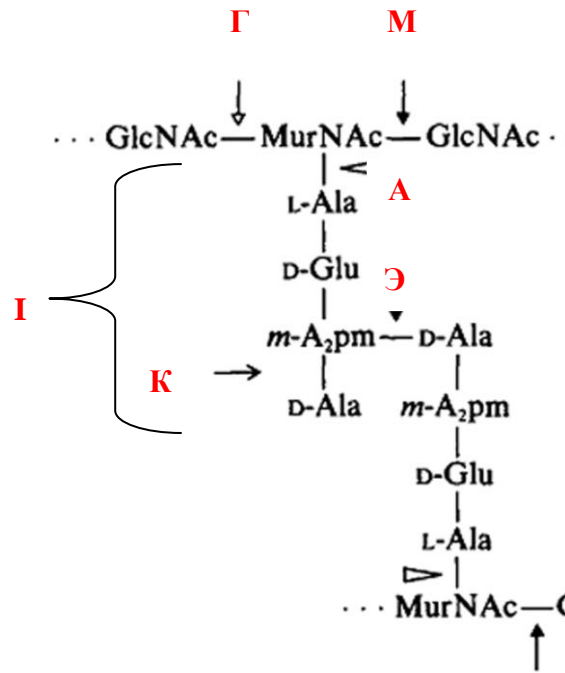


Рис. 9. Схема структурной единицы пептидогликана *E. coli* с указанием места действия фермента (Holtje&Tuomanen 1991).

I, аминокислоты пептидной цепи; GlcNAc, N-ацетилглюкозамин; MurNAc, N-ацетилмурамовая кислота; Г, разрушаемая связь гликозаминидазами; М, разрушаемая связь мурамидазами; А, разрушаемая связь амидазами; Э, разрушаемая связь эндопептидазами; К, разрушаемая связь карбоксипептидазами.

Литические трансгликозилазы напоминают по своему действию мурамидазы, но отличаются способностью катализировать внутримолекулярную перестройку N-ацетилмурамовой кислоты с образованием 1,6-ангирида: после гидролиза β -1,4-гликозидную связь в сахарном остове пептидогликана происходит перенос O-мурамоильного остатка мурамовой кислоты на ее С-6 гидроксильную группу (Fokine *et al.*, 2008, Vollmer *et al.*, 2008б). К этой группе ферментов относятся EmtA *E. coli*, MltA *N. gonorrhoeae* и др. (Kraft *et al.*, 1998; Powell *et al.*, 2006).

N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазы (амидазы) можно отнести к узко-специфичным протеазам, разрушающим связь между N-ацетилмурамовой кислотой и L-аланином (первой аминокислотой пептидной цепи) (рис.10). К этой группе относятся

автолизины AmiA, AmiB и AmiC, AmiD *E. coli*, амидаза Л2 *Lysobacter* sp. XL1 и др. (Jacobs *et al.*, 1995; Heidrich *et al.*, 2001; Степная *и др.*, 1992). Амидазной активностью могут обладать и эндопептидазы, например, бактериолитическая эндопептидаза Л1 *Lysobacter* sp. XL1, α - и β -литические протеазы *L. enzymogenes* (Tsai *et al.*, 1965; Бегунова *и др.*, 2003).

Эндопептидазы воздействуют на пептидные связи пептидогликана (Рис. 10). В качестве примера можно привести пенициллин-связывающий белок 7 *E. coli*, разрушающий межпептидную связь между D-аланином и D-мезо-диаминопимелиновой кислотой в пептидогликане *E. coli*; эндопептидазы CwlK и LytH *B. subtilis*, гидролизующие связь между L-аланином и D-глутаминовой кислотой пептидной цепи пептидогликана *B. subtilis*; литическую протеазу Л1 *Lysobacter* sp. XL1, α - и β -литические протеазы *L. enzymogenes*, лизостафин *S. simulans*, стафилолизин *P. aeruginosa*, разрушающие связь глицин-глицин в межпептидном мостике *S. aureus* и др. (Lache *et al.*, 1969; Iversen&Grosv 1973; Henderson *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998a; Бегунова *и др.*, 2003; Fukushima *et al.*, 2007). Внутри этой группы выделяют карбоксипептидазы, разрушающие связь последней аминокислоты пептидной цепи (Vollmer *et al.*, 2008б). Известно немного примеров ферментов, обладающих такой специфичностью. Например, протеаза LdcA *E. coli*, разрушающая связь между мезо-диаминопимелиновой кислотой и D-аланином в пептидной цепи, но только во фрагментах пептидогликана (тетрапептиды или тетрапептиды, связанные с сахарными единицами пептидогликана) (Templin *et al.*, 1999).

Бактериолитические протеазы способны разрушать пептидные связи не только в пептидогликане, но и белках. Белок Л1 *Lysobacter* sp. XL1 является амидазой и литической эндопептидазой, а также проявляет протеазную активность на казеине и синтетическом пептиде (Степная *и др.*, 1996; Бегунова *и др.*, 2003). Для α -литической протеазы *L. enzymogenes* показана способность гидролизовать эластин, хромогенные субстраты, такие как Ac-Ala-Pro-Ala-pNA (UniProtKB – P00778; Hunkapiller *et al.*, 1976). β -литическая протеаза *L. enzymogenes* также гидролизует синтетические субстраты, инсулин, казеин (Whitaker 1965a; 1965б; Oza 1973).

В зависимости от структуры активного центра выделяют несколько классов протеаз: сериновые протеазы, металлопротеазы, цистеиновые протеазы и аспартат протеазы. Более детальное описание с делением на кланы и семейства представлено в классификационной системе MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) (Rawlings *et al.*, 2014). В активном центре металлопротеаз содержится металл, как правило, катион Zn^{2+} , необходимый для проявления каталитической активности. В качестве Zn^{2+} координирующих аминокислот в активном центре амидазы Rv3717 (автолизин)

Mycobacterium tuberculosis выступают His11, Glu46, His101, а также три молекулы воды (Kumar *et al.*, 2013). К металлопротеазам относятся амидаза Rv3717 *M. tuberculosis*, амидазы *E.coli* AmiA, AmiB и AmiC, стафилолизин *P. aeruginosa*, β -литическая протеаза *L. enzymogenes* (Vollmer *et al.*, 2008б; Spencer *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013; Kessler 2013). В активном центре цистеиновых протеаз расположена аминокислота цистеин. Так, при замене в активном центре автолизина RipA (эндопептидаза) *M. tuberculosis* цистеина на аланин происходило супрессирование активности данного фермента (Ruggiero *et al.*, 2010). Активность цистеиновых протеаз зависит от каталитической диады, включающей цистеин и гистидин (Barett 1994). Сериновые протеазы в зависимости от субстратного предпочтения делятся на трипсиноподобные протеазы, разрушающие связь после положительно заряженных аминокислотных остатков, химотрипсиноподобные протеазы, разрушающие связь после больших гидрофобных остатков, и подобные эластазе, разрушающие связь после небольших гидрофобных остатков (Rao *et al.*, 1998). Самым большим семейством этого класса является семейство S1 субклана PA(S) (Rawlings&Barrett 2013; Rawlings *et al.*, 2014). Сериновые протеазы PA(S) представляют собой класс протеаз, каталитическая активность которых осуществляется за счет триады Ser/His/Asp, где серин выступает в качестве нуклеофила (Schonbaum *et al.*, 1961; Ekici *et al.*, 2008). Каталитическая реакция протекает в два этапа: на первом этапе формируется ацил-фермент вследствие сериновой атаки карбонильного атома углерода пептидной связи субстрата. В ходе дальнейшей реакции последовательно формируются два интермедиата, последний из которых за счет протонирования серина гистидином распадается, и происходит высвобождение карбоксильного участка субстрата (Hedstrom 2002; Ekici *et al.*, 2008; Blankenship *et al.*, 2014; Laskar *et al.*, 2012). Наиболее изученным бактериолитическим ферментом этого семейства является α -литическая протеаза *L. enzymogenes*.

1.4.4 Структурно-функциональные особенности литических ферментов

Как видно из приведенной выше классификации, литические ферменты разнообразны по механизму действия на пептидогликан. Кроме того, различны они по спектру и силе литического действия. Например, автолизин LytC *S. pneumoniae* и эндолизин Cpl-1 фага Cp-1, несмотря на принадлежность к одному семейству ферментов GH-25 (Glycoside hydrolases, гликозидгидролазы семейства 25), отличаются друг от друга по спектру литического действия (Perez-Dorado *et al.*, 2010). Все это обусловлено особенностью их трехмерного строения: именно структура фермента определяет его функциональные особенности. Так, более узкая специфичность действия фермента LytC *S. pneumoniae* по сравнению с эндолизином Cpl-1 связана с тем, что его активный сайт

расположен близко к субстрат–связывающему домену под углом (крюкоподобная форма фермента), что накладывает ограничение на литическую активность фермента. В силу своей структуры автолизин не может расщеплять пептидогликан, имеющий поперечные сшивки между пептидными субъединицами. Поэтому необходимы дополнительные операции с помощью других ферментов, чтобы предоставить LytC доступный субстрат, который он окончательно расщепит. Активный центр эндолизина Cpl-1 и его субстрат–связывающий домен разобщены, что и не вызывает ограничений по отношению к субстрату (Perez–Dorado *et al.*, 2007).

Среди сериновых бактериальных протеаз наиболее изученной является α -литическая протеаза *L. enzymogenes*. Известна пространственная структура этого фермента (разрешение 0,83 Å) (Fuhrmann *et al.*, 2004). Установлено, что полипептидная цепь формирует два домена, состоящие из шести антипараллельных β -цепей (двойной β -баррель), что является общим признаком представителей семейства S1 (Rawlings&Barrett 2013). Для α -литической протеазы установлено влияние на энергию перехода из свернутого в развернутое состояние структуры C-концевого участка (плотная упаковка за счет высокого процента содержания остатков глицина и искажающее влияние Phe 228). При этом кинетическая стабильность фермента обуславливает максимизацию его времени жизни в условиях окружающей среды. Для α -литической протеазы изучена также структура в комплексе с необратимым ингибитором сериновых протеаз PMSF методом ЯМР (Vachovchin 1986), а также с сильным обратимым ингибитором пептид–производным борной кислоты методом кристаллографии (разрешение 2,0 Å) (Bone *et al.*, 1987) и с про–частью (разрешение 2,4 Å) (Sauter *et al.*, 1998). Стоит также отметить, что, несмотря на общий принцип структурной организации, в отличие от сериновых протеаз млекопитающих, сериновые протеазы бактерий имеют бóльшую субстратную специфичность, что связано с более пластичным активным центром последних (Perona&Craink 1997). В то же время для сериновых протеаз млекопитающих установлено влияние поверхностных петель (их подвижность, размер, а также аминокислотный состав) в структуре на различия в проявлении ими функциональных особенностей (DiBella&Schraga 1996; Perona&Craink 1997; Hedstrom 2002; Ma *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007).

Особый интерес представляет сокристаллизация/вымачивание ферментов с их субстратами или ингибиторами, что позволяет более детально разобраться в механизме катализа ферментов. Так, благодаря решению структуры каталитического домена амидазы AmiA *S. aureus* в комплексе с пептидогликан–производным лигандом N–ацетилмурамовая кислота–L–аланин–D–изоглутамин–ацелированный L–лизин (вместо глицинового

остатка, который является первой аминокислотой в межпептидном мостике) – D-аланин (разрешение 1,55 Å) исследователям удалось предложить механизм взаимодействия фермента с пептидогликаном *S. aureus*, а также прийти к пониманию, почему фермент не способен разрушать пептидогликан *B. subtilis* (Büttner *et al.*, 2014). Исследователи предположили, что связано это со структурой пептидогликана *B. subtilis*, который в отличие от пептидогликана *S. aureus* не имеет межпептидного мостика (рис. 10). В результате его боковые цепи более громоздки, а сам пептидогликан имеет более ригидную конформацию, что и приводит к тому, что активный центр амидазы AmiA не может «подстроиться» под этот субстрат.

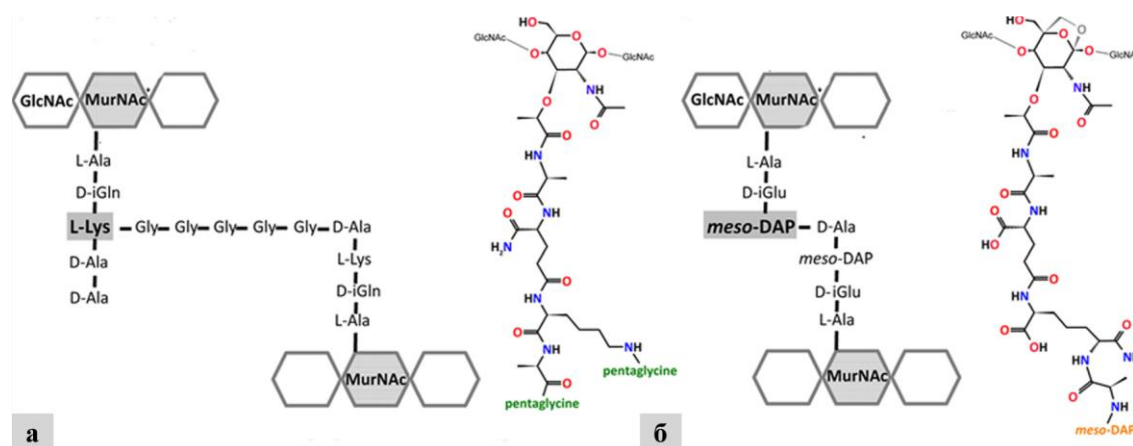


Рис. 10. Схематическое изображение структуры пептидогликанов (Büttner *et al.*, 2014).
а – Пептидогликан *S. aureus*. **б** – Пептидогликан *B. subtilis*.

Однако невозможно прийти к пониманию механизма катализа нативного пептидогликана литическими ферментами, основываясь лишь на результатах гидролиза небольших синтетических фрагментов этого полимера. Во взаимодействии фермент–субстрат роль также играет и конформация субстрата. Например, сокристаллизация пептидогликан–распознающего белка PGRP-Ia (C-домен белка PGRP-Ia человека) и синтетического фрагмента мурамил–пентапептид (L-Ala–D-isoGln–L-Lys–D-Ala–D-Ala) и этого же белка с мурамил–трипептидом (L-Ala–D-isoGln–L-Lys) выявила различия во взаимодействии белка с этими субстратами. В первом случае были обнаружены структурные перестройки в пенициллин–связывающем центре (изменение положения Tyr266 на 110°), которых не наблюдалось во втором случае (Guan *et al.*, 2006). И эти субстраты отличались только по структуре пептидной цепи. Вероятно, в дальнейшем, с развитием новых методов и подходов, когда архитектура пептидогликана будет понята и будет возможна работа с интактными клеточными стенками, мы будем иметь достоверные представления об этих механизмах.

Для эндолизинов и автолизинов распространенной является двухдоменная структура ферментов: один из доменов выполняет каталитическую функцию, другой – субстрат–связывающую. Двухдоменное строение принято называть модульной структурой, а однодоменное, характеризующееся наличием только каталитической субъединицы, – глобулярной (Low *et al.*, 2005; Fokine *et al.*, 2008; Walmagh *et al.*, 2012; 2013; Farris&Steinberg 2014). Хотя субстрат–распознающая субъединица в двухдоменных ферментах не выполняет каталитической функции, она вносит существенный вклад в проявлении бактериолитической активности. Так, было показано, что при удалении субстрат–связывающей субъединицы эндолизин ОВРgp279 фага ОВР сохранил лишь 62 % активности (Walmagh *et al.*, 2012). Исследователи объясняют это тем, что некаталитический домен обуславливает временное связывание фермента с клеточной стенкой бактерии, при этом, с одной стороны, каталитический центр подводится ближе к пептидогликану, с другой, ускоряется процесс за счет множественного расщепления связей в пределах пептидогликана за один цикл до диссоциации (Korndorfer *et al.*, 2006; Schmelcher *et al.*, 2012). Для эндолизина LysAB2 фага ФАВ2 характерно специфичное строение субстрат–связывающего домена, который обогащен основными аминокислотами, что, предположительно, обуславливает нарушение целостности внешней мембраны (при взаимодействии положительно заряженной субъединицы и анионов ЛПС внешней мембраны), а, следовательно, и проникновение фермента в периплазматическое пространство и достижение пептидогликана (Orito *et al.*, 2004, Lai *et al.*, 2011). Предполагается, что аналогичным образом действуют и однодоменные автолизины, т.е. за счет положительно заряженных аминокислот. Например, было установлено, что изменение общего заряда каталитической субъединицы XlyA *B. subtilis* с минус 3 до плюс 3 превращает статус домена из неактивного в активный (Low *et al.*, 2011). Общий заряд однодоменного автолизина Rv3717 *M. tuberculosis*, обладающего широким спектром литической активности, равен плюс шесть, что подтверждает выдвинутую гипотезу (Kumar *et al.*, 2013).

1.4.5 Биомедицинское направление изучения литических ферментов

Изучение функционирования литических ферментов важно не только для решения фундаментальных проблем биохимии, но и для биомедицины. Связано это с поиском новых средств борьбы с множественноустойчивыми патогенными микроорганизмами. Литические ферменты могут стать альтернативой антибиотикам, т.к. лизируют патогенные бактерии и не провоцируют развитие механизмов защиты у них. Одним из направлений исследований по созданию эффективных антимикробных препаратов являются литические ферменты бактериофагов (Sulakvelidze *et al.*, 2001; O'Flaherty *et al.*,

2009; Rodriguez–Rubio *et al.*, 2013, 2016). Получены значимые результаты в контроле пневмококковых инфекций (пневмония, эндокардит, менингит) (Entenza *et al.*, 2005; Grandgirard *et al.*, 2008; Doehn *et al.*, 2013). Также инъекции стафилококковых эндолизинов P–27/HP фага P–27/HP и SAL–1 фага SAP–1 приводили к снижению количества клеток *S. aureus* MRSA в организме инфицированных мышей (Gupta&Prasad 2011a; Jun *et al.*, 2013).

Другим перспективным направлением исследований для создания антимикробных препаратов являются литические ферменты бактерий, обладающие большей субстратной специфичностью по сравнению с эндолизинами бактериофагов. Установлено, что ферментный комплекс *L. gummosus* эффективно разрушает *in vitro* биопленку *S. epidermidis* (Gokcen *et al.*, 2014). Эндопептидаза RipA *M. tuberculosis* рассматривается исследователями как новый перспективный класс антитуберкулезных агентов (Ruggiero *et al.*, 2010). Антимикробный комплекс лизоамидаза, полученный на основе бактериолитических ферментов *Lysobacter* sp. XL1 в ИБФМ РАН, обладает широким спектром литического действия в отношении живых патогенных грамположительных бактерий, в том числе в отношении множественноустойчивых штаммов, а также является единственным препаратом, который разрушает споры бацилл, в том числе споры сибирской язвы *B. anthracis* (Кулаев *и др.*, 2002). Лизоамидаза рассматривается как перспективный антимикробный препарат наружного применения в различных областях медицины. Отдельные литические ферменты лизоамидазы могут стать основой высокоэффективных препаратов для внутреннего применения.

Везикулы, содержащие бактериолитические ферменты, могут стать моделью для разработки эффективных антимикробных средств нового поколения. Так, уже есть примеры разработки вакцин на основе везикул, а также использование модифицированных везикул в качестве наноконтейнеров для доставки лекарственных средств (Holst *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011б; Acevedo *et al.*, 2014; Gujrati *et al.*, 2014). В близком будущем возможно создание подобных препаратов.

Подводя итог, следует выделить основные нерешенные вопросы в области биогенеза везикул грамотрицательных бактерий и функционирования литических ферментов.

1. О способности представителей рода *Lysobacter* образовывать везикулы в доступной литературе информации нет. Основные вопросы биогенеза везикул грамотрицательных бактерий связаны с установлением факторов, влияющих на этот процесс и механизмом их действия. До настоящего времени данных о влиянии

секретируемых белков на биогенез везикул не было. О роли фосфолипидов в везикулообразовании имеются лишь косвенные данные

2. Информации о литических агентах, продуцируемых *Lysobacter* spp. незначительное количество. К настоящему моменту выделены и охарактеризованы лишь α -и β -литические протеазы, эндопептидаза LysC *L. enzymogenes* и пять литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1

3. Для большинства известных бактериолитических ферментов не определены пространственные структуры. Наиболее изученной в структурном и в функциональном аспектах является α -литическая протеаза *L. enzymogenes*. Понимание механизмов взаимодействия бактериолитических ферментов с пептидогликаном остаются на гипотетическом уровне, поскольку современные методы не позволяют выделить интактный пептидогликан из клеток бактерий.

4. Рост множественной устойчивости патогенных бактерий к существующим антимикробным препаратам заставляет искать подходы к созданию лекарств нового поколения. Бактериолитические ферменты являются перспективными для создания на их основе лекарственных средств, эффективных в отношении множественноустойчивых микроорганизмов.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ И УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В работе был использован штамм *Lysobacter* sp. XL1 ВКМ В-1576. Культивирование проводили на модифицированной жидкой среде LB (рН 7,5), содержащей 5 г л⁻¹ пептона, 5 г л⁻¹ дрожжевого экстракта, 5 г л⁻¹ NaCl, при 29°C с аэрацией.

Рекомбинантный штамм *P. fluorescens* Q2-87/B, продуцирующий литическую протеазу Л5 *Lysobacter* sp. XL1, получен ранее (Lapteva *et al.*, 2012). В работе был использован также родительский штамм *P. fluorescens* Q2-87. Культуры выращивали в жидкой среде (рН 7,5), содержащей 10 г л⁻¹ пептона, 5 г л⁻¹ дрожжевого экстракта, 5 г л⁻¹ NaCl, 20 мкг мл⁻¹ тетрациклина. Культивирование проводили в колбах, содержащих 150 мл среды, при 29°C с аэрацией. При достижении культуры поглощения равного 1,0 при 540 нм продукцию рекомбинантного белка Л5 индуцировали 1мМ IPTG и продолжали культивирование в течение 20 ч. Для сравниваемых штаммов Q2-87 и Q2-87/B поглощение культуры при 540 нм составило 5,2 и 4,2 о.е./мл соответственно.

Рекомбинантные штаммы на основе *E. coli* BL21(DE3)/pLysE для белков Л1 и Л5 были получены ранее (Грановский *и др.*, 2010, 2011). Штаммы трансформировали плазмидами pArgoZ и pVrgoZ, содержащими гены пробелков Л1 и Л5 соответственно с 6 His на N-конце. Культуры выращивали на среде LB, содержащей 0,02 мг мл⁻¹ хлорамфеникола и 0,10 мг мл⁻¹ ампициллина при 37°C с аэрацией. При достижении культуры поглощения равного 0,70 при 590 нм продукцию рекомбинантных белков Л1 и Л5 индуцировали 1 мМ IPTG и продолжали культивирование в течение 6 ч.

Штамм *S. aureus* 209P культивировали на дрожже-пептонной среде (рН 7,2), содержащей 3 г л⁻¹ дрожжевого экстракта, 10 г л⁻¹ пептона в течение 18 ч при 37°C с аэрацией.

В качестве тест-культур использовали штаммы *B. subtilis* W23, *B. cereus* 217, *M. roseus* В 1236, *M. luteus* В1819, *Corynebacterium xerosis*, *S. aureus* 209P, *Rathayibacter tritici*, *P. fluorescens* 1472, *P. putida*, *Proteus vulgaris* Н-19, *P. mirabilis* N2, *E. coli* K12, *E. caratovora* В15, *Alcaligenes faecalis*. Штаммы выращивали на агаризованной среде (рН 7,2), содержащей 1 г л⁻¹ дрожжевого экстракта, 30 г л⁻¹ соевого экстракта, 5 г л⁻¹ триптона и 60 г л⁻¹ аминокислоты, 1,5% агара при 29°C. В качестве тест-культур использовали также патогенные штаммы *B. anthracis* 71/12, *S. aureus* 55 MRSA, *S. aureus* 538 ПАТИ, *B. cereus* 771, которые растили на агаризованной среде LB при 37°C. Работы, связанные с исследованиями литического действия сконструированных препаратов в отношении

патогенных бактерий, проводились совместно с к.б.н. Шишковой Н.А. (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск) (Vasilyeva *et al.*, 2013; Kudryakova *et al.*, 2016; Кудрякова *и др.*, 2017).

2.2 ПОЛУЧЕНИЕ ВЕЗИКУЛ

2.2.1 Получение везикул методом дифференциального центрифугирования

Препараты везикул *Lysobacter* sp. XL1 и *P. fluorescens* Q2–87 и Q2–87/B получали методом дифференциального центрифугирования. Везикулы из 0,3 л культуры *Lysobacter* sp. XL1 удаляли центрифугированием при 7 500 g в течение 20 мин, из культуры штаммов Q2–87 и Q2–87/B при 12 500 g в течение 35 мин при 4°C. Из полученных культуральных жидкостей везикулы осаждали центрифугированием при 113 000 g в течение 2 ч при 4°C. Осадок везикул промывали 50 mM Трис–HCl (pH 8,0) с последующим центрифугированием при той же скорости в течение 1 ч. Полученные осадки везикул ресуспендировали в равных объемах 50 mM Трис–HCl (pH 8,0) и хранили при минус 20°C.

2.2.2 Получение везикул методом осаждения (NH₄)₂SO₄

Препараты везикул Q2–87 и Q2–87/B также получали согласно методу Грениера и Майранда (Grenier&Mayrand 1987) с модификацией. Клетки из 1 л культуры удаляли центрифугированием при 12 500 g в течение 35 мин при 4°C. Из полученной культуральной жидкости везикулы осаждали (NH₄)₂SO₄ (65 % насыщения) в течение 2 ч при 4°C с перемешиванием. Затем центрифугировали при 26 000 g в течение 50 мин при 4°C. Полученный осадок везикул ресуспендировали в 50 mM Трис–HCl (pH 8,0). Препарат диализовали в течение ночи против того же буфера с последующим ультрацентрифугированием при 113 000 g в течение 2 ч. Осадок везикул промывали 50 mM Трис–HCl (pH 8,0) при той же скорости в течение 1 ч. Полученный осадок ресуспендировали в 50 mM Трис–HCl (pH 8,0) и хранили при минус 20°C.

2.3 ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТА ВЕЗИКУЛ *LYSOBACTER* SP. XL1 В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ САХАРОЗЫ

Клетки из 1 л культуры удаляли центрифугированием при 7 500 g в течение 20 мин. Из полученной культуральной жидкости везикулы осаждали центрифугированием при 115 000 g в течение 2 ч. Осадок везикул промывали 50 mM Трис–HCl (pH 8,0) с последующим центрифугированием при той же скорости и растворяли в 2 мл 25 % сахарозы в 10 mM Трис–HCl (pH 8,0), 5 mM ЭДТА. Полученный препарат везикул наслаивали на ступенчатый градиент плотности сахарозы (30 – 55 % сахарозы в 10 mM Трис–HCl (pH 8,0), 5 mM ЭДТА) с шагом 5% сахарозы. Центрифугирование проводили при 106 500 g в

течение 12 ч. Фракции отбирали в равном объеме, начиная от мениска, с учетом концентрации сахарозы. В результате были отобраны следующие фракции: фракция везикул, находящихся в 30 % сахарозе, в 35 % сахарозе, в 40 % сахарозе и в 45 % сахарозе. Полученные фракции разбавляли до объема 30 мл 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0) и центрифугировали при 113 000 г в течение 2 ч. Полученные осадки промывали в 50 мМ Трис–НСl (рН 8,0) центрифугированием при той же скорости в течение 1 ч. Осадки ресуспендировали в равных объемах 50 мМ Трис–НСl (рН 8,0).

2.4 ПОЛУЧЕНИЕ ВНЕШНИХ МЕМБРАН *LYSOBACTER SP. XL1*

Клетки из 0,6 л культуры осаждали центрифугированием при 7 500 г в течение 20 мин. Полученные осадки дважды промывали 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0), содержащим 0,14 М NaCl, при 6 000 г в течение 20 мин. Клетки разрушали посредством ультразвуковой дезинтеграции или на френч–прессе. К гомогенату добавляли ДНКазу в конечной концентрации 0,02 мг мл⁻¹ и 4 мМ кристаллогидрата сульфата магния на теплой водяной бане. Неразрушенные клетки удаляли центрифугированием при 4 500 г в течение 5 мин. Суммарные мембраны осаждали при 15 500 г в течение 1 ч. Полученный осадок промывали дважды 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0) при той же скорости и растворяли в 2 мл 25 % сахарозы, 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0), 5 мМ ЭДТА. Препарат суммарных мембран фракционировали методом Осборна (Osborn *et al.*, 1972) с модификацией. Препарат наслаивали на градиент плотности сахарозы (30 – 55 % сахарозы, 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0), 5 мМ ЭДТА) с шагом 5% сахарозы и центрифугировали при 106 500 г в течение 14 ч. В результате было получено несколько фракций, которые отбирали, начиная от мениска. Полученные фракции разбавляли до объема 30 мл 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0) и центрифугировали при 113 000 г в течение 1 ч. Осадки промывали в 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0) центрифугированием при такой же скорости, ресуспендировали в 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0). Для идентификации фракций, содержащих внешние мембраны, измеряли основной компонент липополисахарида внешних мембран – КДО, а также проводили сравнительную характеристику белкового состава полученных фракций методом электрофореза в денатурирующих условиях.

2.5 ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПРЕПАРАТОВ ВЕЗИКУЛ И ВНЕШНИХ МЕМБРАН *LYSOBACTER SP. XL1*

Экстракцию фосфолипидов из препаратов внешних мембран и везикул *Lysobacter sp. XL1* проводили смесью хлороформ:метанол по методу Эймса (Ames 1968). К 0,08 мл препаратов добавляли 0,3 мл хлороформ:метанол (1:2 по объему) и интенсивно

встряхивали с использованием термомиксера (Eppendorf, Германия) при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем центрифугировали на настольной центрифуге 5417C (Eppendorf, Германия) при 15 300 g в течение 10 мин для удаления нефосфолипидных составляющих. К надосадочной жидкости добавляли 0,10 мл бидистиллированной воды и встряхивали на термомиксере в течение 1 мин. Затем центрифугировали при 15 300 g в течение 10 мин для полного расслоения фаз. Отбирали нижнюю хлороформенную фазу, в которой и находились фосфолипиды.

Индивидуальные фосфолипиды разделяли с помощью двумерной хроматографии на пластине с силикагелем 60 F254 (HPTLC, Merck, Германия). Использовали хлороформ:метанол:вода (65:25:4 по объему) в качестве первой разделительной системы и хлороформ:метанол:уксусная кислота:вода (40:7,5:6:1,8 по объему) в качестве второй разделительной системы. Для обнаружения фосфосодержащих и аминокислотсодержащих фосфолипидов использовали проявляющие реактивы: молибденовый голубой и раствор нингидрина в ацетоне соответственно.

2.6 СТРУКТУРНО–ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ Л1 И Л5 *LYSOBACTER SP. XL1*

2.6.1 Очистка рекомбинантных белков

Очистку белков Л1 и Л5 осуществляли из рекомбинантной системы *E. coli* BL21(DE3)/pLysE (Грановский *и др.*, 2010, 2011).

Тельца включения, содержащие пробелки Л1 или Л5, получали посредством ультразвуковой дезинтеграции клеток на ледяной бане. Очистку пробелков проводили на колонке His Trap FF 5 мл (GE Healthcare, США) с помощью системы FPLC АСТА (General Electric, США). Буфером для уравнивания колонки служил 50 мМ Na–фосфатный буфер (рН 7,8), содержащий 8 М мочевины, 1 М NaCl, 20 мМ имидазола. Белок элюировали 50 мМ Na–фосфатным буфером (рН 7,8), содержащим 8 М мочевины, 0,5 М NaCl, 0,3 М имидазола. Ренатурацию пробелков осуществляли посредством диализа против 50мМ Трис–HCl (рН 8,0), содержащего 0,4 М сахарозы, 0,25 М NaCl, 5 мМ 2–меркаптоэтанола, 1 мМ ЭДТА. Про–часть отщепляется автокаталитически, и для удаления ее из системы добавляли трипсин в соотношении 1:500 (трипсин:белок). Белки Л1 и Л5 очищали посредством ионообменной хроматографии на колонках MonoS (Amersham Biosciences, Швеция) или ENrichS (Bio–Rad, США), уравновешенных 50 мМ Трис–HCl (рН 8,0), в линейном градиенте 0 – 1 М NaCl в том же буфере с помощью системы FPLC АСТА (General Electric, США) или хроматографической системы NGCTM (Bio Rad, США).

Бактериолитическую активность полученных фракций измеряли турбидиметрическим методом. Гомогенность очищенных белков проверяли методом электрофореза в денатурирующих условиях. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение при 280 нм, а также методом Бредфорд. Концентрировали белки на центриконах Vivaspin 6, 5 кДа (Sartorius, Германия) при 9 750 g.

2.6.2 Кристаллизация белков Л1 и Л5 *Lysobacter sp. XL1*

Эксперименты, связанные с кристаллизацией, рентгеноструктурными исследованиями белков Л1 и Л5 *Lysobacter sp. XL1*, проводились совместно с д.б.н. Тищенко С.В. (лаборатория структурных исследований аппарата трансляции ИБ РАН, г. Пущино), а также с к.ф.-м.н. Габдулхаковым А.Г. (группа структурных исследований рибосомных белков ИБ РАН, г. Пущино) (Tishchenko *et al.*, 2016; Кудрякова *и др.*, 2016).

Для кристаллизации 3 мкл белка Л1 (8 мг мл⁻¹) в 50 мМ Трис–HCl (pH 8,0), содержащем 0,15 М NaCl, смешивали с 2 мкл №42 набора NR–LBD extension (0,01 М Bis–Tris propane (pH 6,5), 1,4 М сульфата лития). В качестве противораствора использовали 300 мкл условий раствора №42 NR–LBD extension. Кристаллизация проводилась при 24°C. Были получены палочковидные кристаллы с размером 0,05×0,05×0,6 мм.

Для кристаллизации 2 мкл белка Л5 (20 мг мл⁻¹) в 50 мМ Трис–HCl (pH 8,0), содержащем 0,15 М NaCl, смешивали с 1 мкл раствора № 47 набора NR–LBD (0,1 М PIPES (pH 7,00), содержащего 0,2 М ацетата аммония и 2,7 М формиата натрия) и с добавками: 0,5 мкл натриевой соли полиакриловой кислоты 5100 и 0,5 мкл 50 мМ ДТТ. В качестве противораствора использовали 300 мкл условий №47 NR–LBD. Кристаллизация проводилась при 18°C. Были получены крупные кристаллы ромбовидной формы с размерами 0,2×0,3×0,5 мм.

2.6.3 Изучение ингибирующего действия синтезированных пептидов на белок Л5 *Lysobacter sp. XL1*

Пептиды (1) VTVNYGTLGTVSG; (2) VNYGTLGTV; (3) TVNYGTLGTVS, соответствующие фрагментам разной длины петли белка Л5 (на рис. 27 петля соответствует а.о. 127 – 133), были синтезированы ИБХ РАН (г. Москва). Смешивали белок Л5 и синтезированные пептиды в разных соотношениях с превышающей концентрацией пептидов в 1000 раз – и инкубировали при комнатной температуре 20 – 60 мин. Затем проводили измерение остаточной активности белка Л5 на автоклавированных клетках *S. aureus* 209P турбидиметрическим методом при 37°C.

2.6.4 Эксклюзионная хроматография

Очищенную фракцию белка Л5 наносили на колонку HiLoad™16/60 (Superdex 75) (Amersham Biosciences, Швеция), уравновешенную 50 mM Трис–HCl (pH 8,0), содержащим 0,15 M NaCl. В ходе гель–филтрации были получены фракции объемом 0,500 мл. Бактериолитическую активность фракций измеряли турбидиметрическим методом. Активные фракции объединяли. Гомогенность препарата подтверждали с помощью электрофореза в Ds–Na – ПААГ. Определение молекулярной массы белка осуществляли по графику зависимости объема элюции, деленного на мертвый объем колонки, от логарифма молекулярных масс калибровочных маркеров. В качестве маркеров использовали стандарты (Sigma, США): цитохром С (12,3 кДа), миоглобин (17,8 кДа), химотрипсиноген А (25,6 кДа), овальбумин (44,0 кДа), БСА (67,0 кДа).

2.6.5 Электрофорез белков в нативных условиях

Для электрофоретической характеристики в нативных условиях щелочного белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1 использовали катодную систему Рейсфельда (Reisfeld *et al.*, 1962). Состав концентрирующего геля (pH 6,8): 4% ПААГ, 0,06 M KOH, 0,33% ТЕМЕД, 0,162% ПСА (титрование до заданного pH CH₃COOH). Состав разделяющего геля (pH 4,3): 12,5 % ПААГ, 0,06 M KOH, 0,33% ТЕМЕД, 0,162% ПСА (титрование до заданного pH CH₃COOH). В составе буфера образца (pH 6,8) следующие компоненты: 0,07 M KOH, 12 % глицерин, 0,001% фуксин. Буфер образца добавляли в препараты на льду. Электрофорез в концентрирующем геле проводили при 90 В, в разделяющем геле при 180 В на холоде. В качестве маркеров использовали щелочные белки: трипсин (pI 10,1–10,5), химотрипсиноген А (pI 8,97) и протеиназа К (pI 8,9). Белковые полосы в геле выявляли окрашиванием раствором Кумасси бриллиантового синего R–250 (Serva, Германия) при 29°C.

2.6.6 Получение литической протеазы Л5 из везикул *Lysobacter* sp. XL1

Препарат везикул из 1 л культуры *Lysobacter* sp. XL1, полученный методом дифференциального центрифугирования, лизировали RIPA буфером (50 mM Трис–HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1% неионного детергента Nonidet P–40, 0,25% дезоксихолата натрия, 0,1% Ds–Na, 0,01% азида натрия) по методике Купманна с коллегами (Коорманн *et al.*, 2012). Для уменьшения вязкости в смесь добавляли РНКазу и ДНКазу в конечной концентрации 0,02 мг мл⁻¹ и 4 mM кристаллогидрата сульфата магния и инкубировали в течение ночи при 4°C. Получали содержимое везикул посредством центрифугирования при 113 000 g в течение 1 ч. Для подтверждения наличия в осадке литической протеазы Л5 проводили иммуноблоттинг с поликлональными антителами к

нему. Осадок анализировали на способность белка Л5 принимать амилоидоподобную конформацию методами электронной микроскопии, а также дифракции рентгеновских лучей с использованием системы Proteum X8 (Bruker, США) совместно с д.б.н. Тищенко С.В. (лаборатория структурных исследований аппарата трансляции ИБ РАН, г. Пущино) и к.ф.-м.н. Габдулхаковым А.Г. (группа структурных исследований рибосомных белков ИБ РАН, г. Пущино) (Кудрякова *и др.*, 2016).

2.7 ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ БЕЛКА Л5 *LYSOBACTER SP. XL1*

2.7.1 Получение пептидогликана *S. aureus* 209P

Пептидогликан *S. aureus* 209P получали методом Шарона в модификации Шоу (Shaw *et al.*, 1970). Культуру автоклавировали в режиме 2 атм. в течение 1 ч. Автоклавированные клетки 3 раза промывали 0,1 М Na-фосфатным буфером (рН 6,8) при 6 000 g в течение 15 мин. Замороженные клетки разрушали на френч-прессе. К гомогенату добавляли ДНКазу и РНКазу в конечной концентрации 0,02 мг мл⁻¹, а также 3 мМ кристаллогидрата сульфата магния с последующей инкубацией смеси при 37°C в течение 1,5 ч. Неразрушенные клетки удаляли центрифугированием при 4 500 g в течение 5 мин (два последовательных центрифугирования). Клеточные стенки отмывали 4 раза холодным 0,1 М Трис-НСl (рН 7,2) при 15 500 g в течение 15 мин. Осадок растворяли в бидистиллированной воде и кипятили на водяной бане при 100°C в течение 15 мин для инактивации автолитических ферментов. Клеточные стенки осаждали при 15 500 g в течение 15 мин и растворяли в 0,1 М Трис-НСl (рН 8,0) с последующим добавлением трипсина (Sigma, США) в конечной концентрации 0,1 мг мл⁻¹. Смесь инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Полученный препарат клеточных стенок трижды промывали холодной водой при 15 500 g в течение 15 мин. Осадок растворяли в смеси хлороформ:метанол (2:1 по объему) и инкубировали в ледяной бане в течение 30 мин с перемешиванием для экстракции фосфолипидов из клеточных стенок. Пептидогликан осаждали при 7 000 g в течение 15 мин. Препарат трижды отмывали на настольной центрифуге 5417C (Eppendorf, Германия) при 15 300 g течение 15 мин. Полученный пептидогликан растворяли в 0,01 М Трис-НСl (рН 8,0) и использовали его в качестве субстрата для белка Л5.

2.7.2 Изучение специфичности действия белка Л5 по отношению к пептидогликану *S. aureus* 209P

Для определения специфичности действия белка Л5 к 0,60 мл суспензии пептидогликана с поглощением 0,5 при 540 нм добавляли 0,15 мл белка Л5 (0,183 мг мл⁻¹) и инкубировали смесь при 40°C в течение 24 ч. Затем добавляли еще 0,05 мл белка Л5 (0,183 мг мл⁻¹) и инкубировали при 40°C в течение 24 ч. В качестве контроля к

пептидогликану добавляли 50 мМ Трис–HCl (pH 8,0). После инкубации регистрировали падение оптической плотности суспензии в опытных образцах при 540 нм. В процессе гидролиза пептидной части пептидогликана освобождаются NH₂–группы аминокислот. Присутствие в гидролизате свободных NH₂–групп определяли методом динитрофенилирования Гюзена и Строминджера (Ghuysen *et al.*, 1966). Суспензии после ферментативного гидролиза трижды промывали 10 мМ Трис–HCl (pH 8,0) на настольной центрифуге MicroCL 17R (Thermo Scientific, США) при 13 300 g в течение 15 мин. Растворяли осадок в 0,8 мл того же буфера и добавляли 0,16 мл раствора 2,4–динитрофторбензола (Sigma, США) (13 мкл в 1 мл абсолютного этанола). Смесь выдерживали при 60°C 30 мин. По окончании инкубации реакцию смесь вновь центрифугировали и осадок промывали четыре раза абсолютным этанолом при 13 300 g в течение 15 мин. Затем проводили кислотный гидролиз пептидогликана 6 н HCl в течение 15 ч при 110°C. Динитрофторбензольные производные аминокислот экстрагировали хлороформом, а оставшиеся аминокислоты анализировали на аминокислотном анализаторе LC 2000 (Biotronik, Германия) по стандартной методике. Анализ образцов на аминокислотном анализаторе был проведен совместно с Лысанской В.Я. (отдел «Всероссийская коллекция микроорганизмов» ИБФМ РАН, г. Пущино) (Кудрякова *и др.*, 2016).

2.7.3 Определение типа гидролизуемой связи белком Л5 в синтетическом субстрате Abz–Ala–Ala–Phe–pNA

В работе использовали синтетический субстрат Abz–Ala–Ala–Phe–pNA, синтезированный в лаборатории химии белка МГУ (Филиппова *и др.*, 1988). К 0,15 мл раствора субстрата Abz–Ala–Ala–Phe–pNA в ДМСО (0,1 мг) добавляли 0,35 мл 20 мМ MES (pH 6,5) и 0,10 мл белка Л5 (18 мкг). В контрольный образец добавляли 50 мМ Трис–HCl (pH 8,0). Образцы инкубировали при 37°C в течение 18 ч. Продукты реакции разделяли методом одномерной тонкослойной хроматографии на пластине 60 F254 (HPTLC, Merck, Германия) с использованием системы бутанол:уксусная кислота:вода (3:1:1). В качестве маркера на пластину наносили также раствор паранитроанилина. Обнаружение пятен производили посредством УФ–облучения и визуально.

2.8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

2.8.1 Определение концентрации ЭПС

Концентрацию ЭПС измеряли антроновым методом (Захарова&Косенко 1982). В ледяной бане к 1,60 мл 0,2% раствора антрона (Диаэм, Россия) в H₂SO₄ (конц.) добавляли 0,40 мл препарата. Смесь кипятили в течение 16 мин. Измеряли поглощение при 625 нм на

спектрофотометре DU^R730 (Beckman, США). В качестве контроля к 0,2% раствору антрона добавляли 50 мМ Трис–HCl (pH 8,0). Количество ЭПС определяли по калибровочной кривой зависимости концентрации от поглощения, построенной для водного раствора глюкозы (Panreac, Испания) в диапазоне 4 – 80 мкг в образце.

2.8.2 Определение концентрации белка методом Бредфорда

Концентрацию белка во фракциях в процессе очистки определяли методом Бредфорд (Bradford 1976). Для постановки реакции использовали протокол для микропланшетов, предложенный для фирменного реагента Кумасси (Thermo scientific, США). Измеряли поглощение при 594 нм на иммуноферментном планшетном фотометре ЭФОС 9305 (Сапфир Московский завод, Россия). Концентрацию белка определяли по калибровочной кривой зависимости концентрации от поглощения, построенной для водного раствора BSA (Sigma, США) в диапазоне 1 – 25 мкг мл⁻¹.

2.8.3 Определение концентрации общего белка методом Лоури

Концентрацию общего белка в препаратах определяли методом Лоури (Lowry *et al.*, 1951). Для этого к 45 мкл препарата добавляли 5 мкл 10% Ds–Na и инкубировали при 42°C в течение 10 мин. Затем добавляли 150 мкл реактива, содержащего 2% Na₂CO₃, 0,1 N NaOH, 0,01% CuSO₄·5H₂O, 0,02 % цитрата натрия, и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. После чего добавляли 15 мкл 1 N реагента Фолина–Чикольте, смесь перемешивали и инкубировали при 42°C в течение 30 мин. В качестве контроля добавляли 45 мкл буфера образца. Измеряли поглощение при 620 нм на иммуноферментном планшетном фотометре ЭФОС 9305. Концентрацию белка определяли по калибровочной кривой зависимости концентрации от поглощения, построенной для водного раствора BSA (Sigma, США) в диапазоне 0,5 – 8 мкг в образце и 2 – 20 мкг в образце.

2.8.4 Измерение активности щелочной фосфатазы

Активность щелочной фосфатазы определяли по скорости гидролиза п–нитрофенилфосфата (Toggiani 1960). Образцы и необходимые реактивы прогревали до начала реакции при 37°C. К 0,10 мл препаратов добавляли 0,10 мл 0,2% п–нитрофенилфосфат (Serva, Германия) в 0,1 М Трис–HCl (pH 8,5), содержащем 10 мМ MgCl₂, и инкубировали смесь при 37°C в течение 30 мин. В качестве контроля использовали 0,10 мл анализируемых препаратов, в 0,1 М Трис–HCl (pH 8,5). Измеряли поглощения при 405 нм на иммуноферментном планшетном фотометре ЭФОС 9305. За единицу фосфатазной активности (у.е.) принимали количество фермента, которое освобождало 1 мкМ п–нитрофенола за 1 мин при 37°C.

2.8.5 Определение концентрации КДО

Концентрацию КДО определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (Karkhanis *et al.*, 1978). Механизм реакции: при окислении КДО периодатом образуется формилпировиноградная кислота, которая, реагируя с тиобарбитуровой кислотой, образует хромофор с максимумом поглощения при 532 – 550 нм. К липополисахаридсодержащему материалу (фракции мембран и везикулы) добавляли H_2SO_4 до конечной концентрации 0,2 N в 0,5 мл раствора, суспендировали и проводили гидролиз при 100°C в течение 30 мин. Гидролизаты охлаждали и центрифугировали на настольной центрифуге 5417C (Eppendorf, Германия) при 2 700 g в течение 5 мин. Отбирали по 0,050 – 0,250 мл гидролизата и добавляли 0,125 мл 40 mM раствора периодной кислоты в 0,125 N H_2SO_4 , встряхивали и выдерживали 20 мин при комнатной температуре. Окисление останавливали добавлением 0,125 мл 2.6% раствора $NaAsO_2$ в 0,5 N HCl, который удаляет непрореагировавшую периодную кислоту. После этого добавляли 0,250 мл 0.6% водного раствора тиобарбитуровой кислоты, встряхивали и кипятили в течение 15 мин. В горячую смесь добавляли диметилсульфоксид, охлаждали при комнатной температуре и измеряли поглощение при 548 нм на спектрофотометре DU^R730. В качестве контроля использовали соответствующий буфер образцов. КДО рассчитывали из условия, что концентрация, равная 0,1 mM КДО, при измерении соответствует 0,18 единиц поглощения.

2.9 ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Электронно–микроскопические исследования проводились совместно с к.б.н. Сузиной Н.Е. (лаборатория цитологии микроорганизмов ИБФМ РАН, г. Пущино) (Vasilyeva *et al.*, 2013; Tsfasman *et al.*, 2015; Kudryakova *et al.*, 2015; Кудрякова *и др.*, 2017).

2.9.1 Негативное контрастирование

Для негативного контрастирования образцы наносили на поверхность формваровой пленки–подложки и контрастировали 0,2 % раствором уранилацетата в воде.

2.9.2 Электронно–микроскопическая иммуноцитохимия

Иммуноцитохимическую реакцию для выявления фермента Л5 осуществляли на ультратонких срезах культуры клеток *Lysobacter* sp. XL1, выращенных на агаризованной среде в течение 20 ч при 29°C. Клетки фиксировали в 4 %-ном растворе параформальдегида в PBS буфере в течение 1 ч при 4°C. Материал после обезвоживания в серии спиртов возрастающей концентрации заключали в смолу LR White в соответствии с рекомендацией фирмы–производителя. Иммуноцитохимическую реакцию проводили на

ультратонких срезах с использованием кроличьих поликлональных антител к бактериолитическому ферменту Л5 (разведение 1:200) с последующей обработкой белком А, меченным Au размером 10 нм (разведение: 1:100). В качестве контроля использовали срезы клеток *Lysobacter* sp. XL1, обработанные белком А, меченным Au (размер 10 нм), без предварительной инкубации с поликлональными антителами к ферменту Л5. После завершения иммуноцитохимической реакции ультратонкие срезы контрастировали в течение 30 мин в 3 % растворе уранилацетата в 70 % спирте и дополнительно в течение 4 мин цитратом свинца по Рейнолдсу (Reynolds 1963).

Ультратонкие срезы и негативноокрашенные препараты просматривали в электронном микроскопе JEM-1200 EX (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

2.10 ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ В ДЕНАТУРИРУЮЩИХ УСЛОВИЯХ

Электрофорез белков проводили в 12,5% ПААГ в присутствии Ds-Na по методу Лэммли (Laemmli 1970). В качестве маркеров использовали смесь белковых стандартов (Bio Rad, США): фосфорилаза b – 94,6 кДа; БСА – 66,2 кДа; овальбумин – 45,0 кДа; карбоангидраза – 31,0 кДа; ингибитор трипсина – 21,5 кДа; лизоцим – 14,4 кДа. А также смесь белковых стандартов (Fermentas, США): β-галактозидаза – 116,0 кДа; БСА – 66,2 кДа; овальбумин – 45,0 кДа; лактат дегидрогеназа – 35,0 кДа; рестрикционная эндонуклеаза Bsp981 – 25,0 кДа; β-лактоглобулин – 18,4 кДа; лизоцим – 14,4 кДа. Электрофорез в концентрирующем геле проводили при 90 В, в разделяющем геле при 180 В. Белковые полосы в геле выявляли окрашиванием раствором Кумасси бриллиантового синего R-250 (Serva, Германия).

2.11 ИММУНОБЛОТТИНГ БЕЛКОВ

Иммуноанализ проводили после электрофоретического переноса белков с ПААГ на мембрану PVDF (Bio Rad, США). Перенос вели в течение 2 ч в 50 мМ боратном буфере (рН 8,0) при 250 мА с охлаждением. Мембрану обрабатывали кроличьими поликлональными антителами к ферменту Л5 (разведение 1:1000), а затем конъюгатом белка А с пероксидазой хрена с разведением 1:10000 (Bio Rad, США). Детекцию проводили при помощи хемилюминесцентного субстрата (Pierce, США).

2.12 КОНСТРУИРОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БЕЛКА Л5 *LYSOBACTER* SP. XL1

2.12.1 Конструирование липосомальных препаратов на основе фосфолипидов везикул и белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1

Фосфолипиды из везикул экстрагировали методом Эймса, как описано в п. 2.5. Липосомальный препарат на основе экстрагированных липидов везикул и очищенного белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1 получали методом гидратации липидных пленок (Weissmann *et al.*, 1976). Тонкие липидные пленки получали на ротационном испарителе ИР–1М2 (Химлаборприбор, Россия) и высушивали их с помощью вакуумного насоса в течение 2 ч. Загрузку очищенного белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1 производили пассивным способом при добавлении его к высушенным липидным пленкам и последующим их «набуханием» при комнатной температуре в течение 2 ч с периодическим встряхиванием. Чтобы липосомы были однородными, проводили серию процедур «замораживания/оттаивания» при минус 70°С (не менее пяти раз). Изучение литической активности препарата производилось методом спот–теста на живых клетках *S. aureus* 209Р.

2.12.2 Конструирование препарата на основе ЭПС и белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1

Препарат ЭПС *Lysobacter* sp. XL1 был получен сотрудниками лаборатории ранее (Кулаев *и др.*, 2002) при концентрировании культуральной жидкости на разделительном ультрафильтрационном аппарате с полыми волокнами с пределом задерживания 100 кДа, а затем лиофильно высушен. Для удаления оставшихся бактериолитических ферментов использовали метод обработки ТХУ (Feng *et al.*, 2010). Растворяли ЭПС в 50 мМ Трис–НСl (рН 8,0) и добавляли ТХУ до конечной концентрации 20%. Инкубировали смесь в течение 4 ч на ледяной бане. Затем центрифугировали при 12 000 g в течение 6 мин, освобождаясь таким образом от преципитированных белков. Образец диализовали против 50 мМ Трис–НСl (рН 8,0). Полученный препарат концентрировали с помощью центриконов Vivaspin 20, 10 кДа (Sartorius, Германия) при 7 500 g. Концентрацию ЭПС измеряли антроновым методом. Антимикробный препарат состоял из очищенного белка Л5 и ЭПС в соотношении белок:ЭПС (1:4 по концентрации). Определение литической активности полученного препарата проводили методом спот–теста и турбидиметрическим методом на живых бактериях, в т.ч. и на патогенных штаммах.

2.13 ИЗМЕРЕНИЕ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ

Для определения бактериолитической активности белка Л5 использовали турбидиметрический метод. К 0,975 мл суспензии автоклавированного *S. aureus* 209P в 10 mM Трис–HCl (pH 8,0) с поглощением 0,5 при 540 нм добавляли 0,025 мл ферментного препарата Л5 (0,032 – 0,440 мг мл⁻¹). Смесь инкубировали при 37°C (а также при 80°C для дополнительной характеристики литической активности белка в температурном оптимуме) в течение 5 мин. В качестве контроля использовали 50 mM Трис–HCl (pH 8,0). Реакцию останавливали помещением пробирок в лед. Уменьшение поглощения суспензии фиксировали в образцах при 540 нм на спектрофотометре DU^R730.

Для определения бактериолитической активности препарата, содержащего ЭПС и белок Л5, использовали суспензию живых клеток *S. aureus* 209P. К 0,92 мл суспензии в 10 mM Трис–HCl (pH 8,0), предварительно дважды отмытых тем же буфером от среды, добавляли 0,08 мл смеси ЭПС – белок Л5 и инкубировали при 37°C в течение 3ч, 5ч. В качестве контроля использовали 10 mM Трис–HCl (pH 8,0). Уменьшение поглощения суспензии фиксировали в образцах при 540 нм на спектрофотометре DU^R730.

За единицу бактериолитической активности (ЛЕ) принимали такое количество фермента, которое приводило к уменьшению поглощения суспензии автоклавированных или живых клеток *S. aureus* 209 P на 0,01 за 1 мин.

2.14 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДОМ СПОТ–ТЕСТА

Литическое действие препаратов везикулы Q2–87/B, антимикробных липосомальных препаратов и препаратов на основе смеси ЭПС – белок Л5 определяли методом спот–теста в отношении живых бактерий, включая патогенные штаммы. На подросший газон клеток–мишеней наносили 25 мкл препарата везикул (0,76 мг мл⁻¹ общего белка), 7 мкл препарата ЭПС – белок Л5 (0,04 мг мл⁻¹ белка Л5) и 7 мкл липосомального препарата (0,32 мг мл⁻¹ белка Л5). Чашки подсушивали 30 мин и инкубировали при 29°C (37°C) в течение ночи. О наличии литического действия на выбранные тест–культуры судили по появлению зон лизиса в месте нанесения образца. Сильный литический эффект проявляется в виде формирования четкой видимой зоны лизиса в месте нанесения препарата. Слабое литическое действие – в виде малопрозрачной зоны лизиса в месте нанесения препарата.

В качестве контроля использовали стерильный 50 mM Трис–HCl (pH 8,0) и гомогенный белок Л5.

Также изучали бактериолитическое действие препаратов *P. fluorescens* Q2–87/B (везикулы, культуральная жидкость) в отношении автоклавированных клеток *S. aureus* 209P в концентрации 1 мг мл^{-1} в 10 мМ Трис–HCl (pH 8,0), вплавленного в 1% агарозный гель. В геле делали лунки, в которые вносили по 30 мкл каждого образца и инкубировали при 29°C и 42°C до появления зон лизиса.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ БИОГЕНЕЗА ВЕЗИКУЛ *LYSOBACTER* SP. XL1

3.1.1 Изучение роли белка Л5 в биогенезе везикул

Установление гетерогенности везикул

Ранее было установлено, что в условиях секреции литических ферментов клетки *Lysobacter* sp. XL1 формируют везикулы разного размера, от 50 до 160 нм, в то время как в условиях блокировки секреции формируются везикулы одного размера, 20 нм (Васильева и др., 2009). Этот результат позволил сделать предположение о том, что бактерия *Lysobacter* sp. XL1 образует гетерогенные везикулы не только по размеру, но и по составу.

В настоящей работе для доказательства этого препарат везикул был разделен в градиенте плотности сахарозы от 30% до 50%. В результате получено 4 фракции везикул: везикулы, находящиеся во фракции 30% сахарозы (фракция везикул 1), везикулы, находящиеся во фракции 35% сахарозы (фракция везикул 2), везикулы, находящиеся во фракции 40% сахарозы (фракция везикул 3), и везикулы, находящиеся во фракции 45% сахарозы (фракция везикул 4). Все фракции были охарактеризованы методом электронной микроскопии с использованием негативного контрастирования. Во всех фракциях были выявлены везикулы (рис. 11).

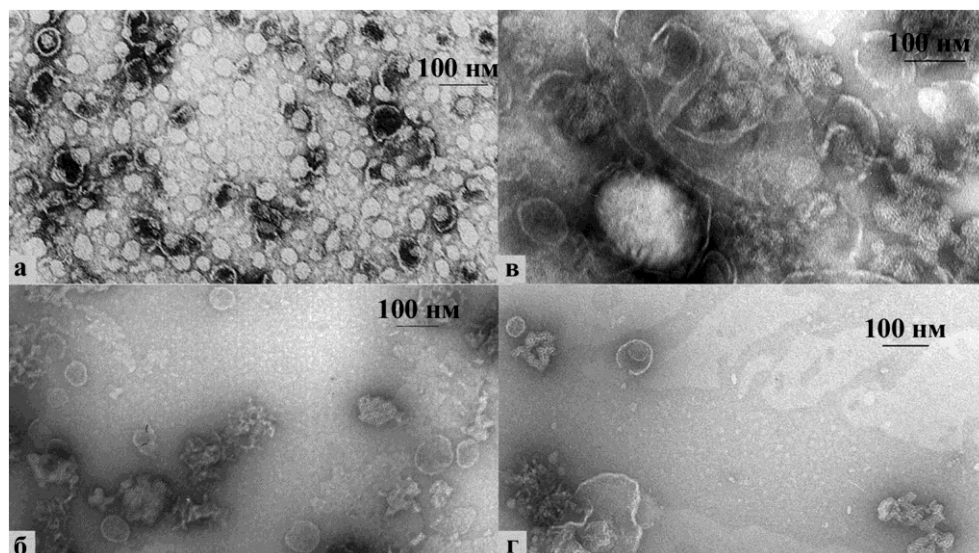


Рис. 11. Электронная микроскопия с использованием негативного контрастирования.
а – Фракция везикул 1. **б** – Фракция везикул 2. **в** – Фракция везикул 3. **г** – Фракция везикул 4.

Фракция 1 содержит везикулы диаметром от 30 до 65 нм и единичные везикулы размером 70 – 80 нм (рис. 11а). Видно, что основная часть везикул заполнена электронно–

плотным содержимым. Во фракции 2 преобладают более крупные везикулы диаметром 65 – 100 нм наряду с незначительным количеством везикул размером 40 – 50 нм (рис. 11б). Фракции 3 и 4 содержат лишь единичные целостные везикулы диаметром 65 – 100 нм наряду с крупными фрагментами мембран, преобладающими во фракции 3 (рис. 11в и 11г соответственно).

Таким образом, результаты фракционирования подтвердили гетерогенность везикул *Lysobacter* sp. XL1 как по размеру, так и по плотности. Большая часть везикул сконцентрирована во фракциях 1 и 2.

Характеристика фракций везикул *Lysobacter* sp. XL1

Фракции везикул 1 и 2 были охарактеризованы: установлена концентрация белка и КДО, измерена активность щелочной фосфатазы, проведен электрофоретический анализ белков везикул и иммуноблоттинг.

Измерение концентрации белка и КДО показало, что их содержание в везикулах фракции 2 в 2 раза больше по сравнению с везикулами фракции 1 (табл. 1). Это может быть связано с большим диаметром везикул фракции 2, что согласуется с результатами электронной микроскопии. А также с большим содержанием этих компонентов на единицу площади везикул, что и делает их более тяжелыми (табл. 1). Целостность везикул анализируемых фракций была подтверждена наличием активности периплазматической щелочной фосфатазы (табл. 1).

Таблица 1. Концентрации белка и КДО, а также активность щелочной фосфатазы в препаратах везикул

Фракции	Концентрация белка ^a (мг мл ⁻¹)	Концентрация КДО ^a (мМ)	Активность щелочной фосфатазы (у.е. мл ⁻¹)
Фракция везикул 1	0,06±0,01	0,41±0,10	0,21
Фракция везикул 2	0,17±0,04	0,78±0,11	0,36

^a Среднее значение±стандартное отклонение

Сравнительный анализ белкового состава показывает, что полученные фракции везикул практически не отличаются по основным мажорным белкам от исходного препарата везикул (рис. 12). Обращает на себя внимание фракция везикул 1. В ней

обнаружены дополнительные мажорные белки с молекулярными массами 26,6 кДа, 27,6 кДа и 28,3 кДа, которые отсутствуют в остальных фракциях везикул. Вместе с тем белок с молекулярной массой 53,0 кДа присутствует в данной фракции в большем количестве.

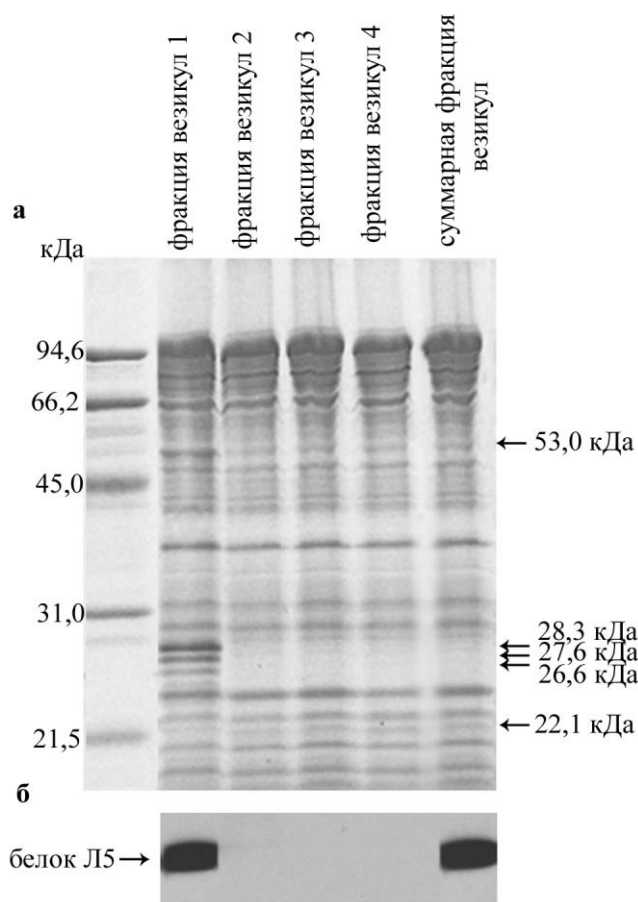


Рис. 12. а – Ds–Na – ПААГ. Электрофореграмма белкового состава фракций везикул. Образцы содержали по 0,04 мг общего белка. Стрелками обозначены белковые полосы, характерные для фракции везикул 1. **б** – Иммуноблоттинг белков с использованием поликлональных антител к бактериолитическому ферменту Л5 *Lysobacter* sp. XL1.

Таким образом, везикулы фракции 1 отличны от везикул всех остальных фракций не только по размеру и плотности, но и по белковому составу.

Ранее было показано, что бактериолитическая протеаза Л5 *Lysobacter* sp. XL1 секретируется в культуральную жидкость посредством внешне-мембранных везикул (Vasilyeva *et al.*, 2008). Для того чтобы выяснить в какой фракции везикул присутствует белок Л5, был проведен иммуноблоттинг с антителами к нему (рис. 12б). Анализ показал, что белок Л5 содержится лишь в везикулах, находящихся во фракции 1.

Таким образом, секреция белка Л5 осуществляется только посредством везикул, находящихся во фракции 1, что свидетельствует об его избирательной сортировке в определенную группу секреторных везикул.

Выявление секреторных везикул для белка Л5

Для подтверждения избирательной сортировки белка Л5 в определенную субпопуляцию секреторных везикул была проведена электронно-микроскопическая иммуноцитохимия ультратонких срезов клеток *Lysobacter* sp. XL1 (рис. 13).

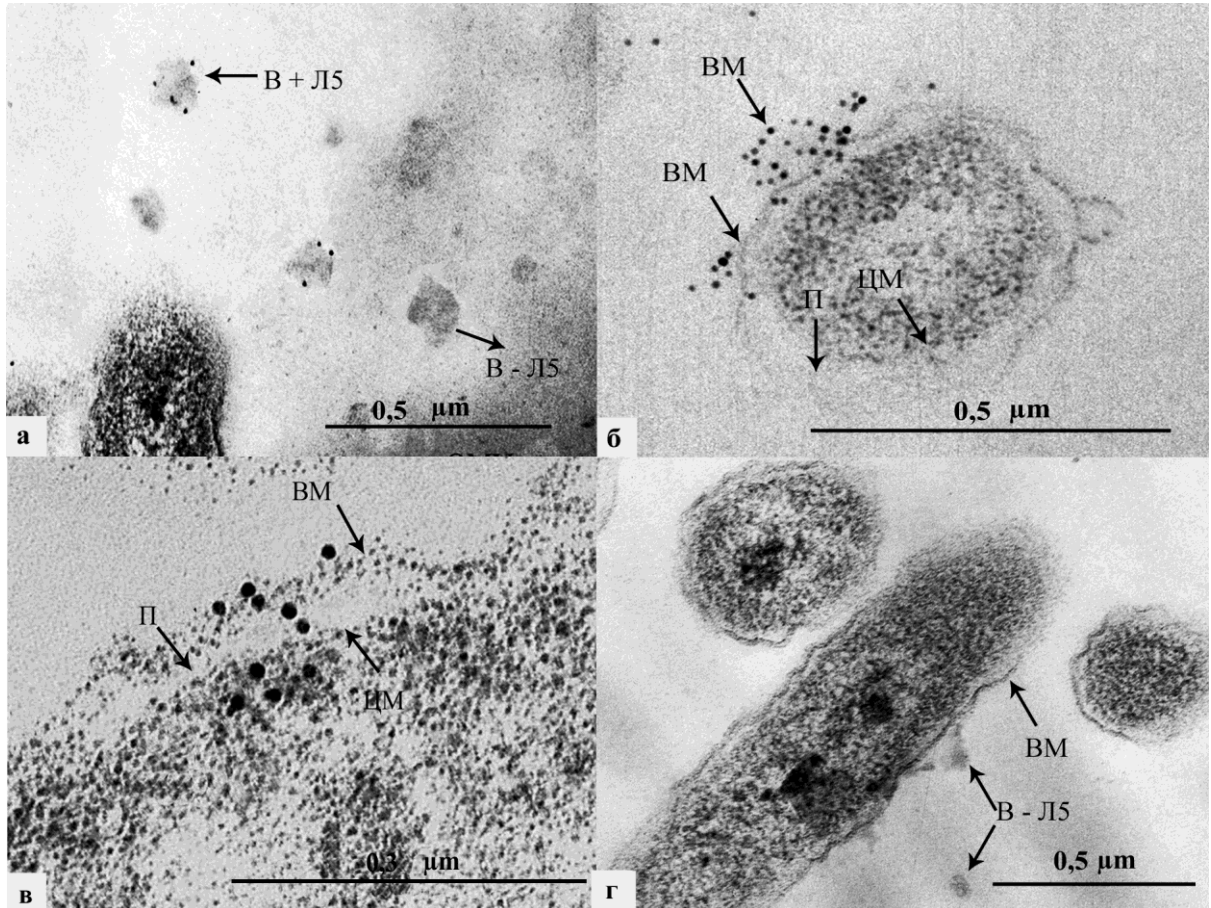


Рис. 13. Электронно-микроскопическая иммуноцитохимия ультратонких срезов клеток *Lysobacter* sp. XL1. **а** – В межклеточном пространстве видны как везикулы, содержащие белок Л5, так и везикулы, его не содержащие. **б** – Формирование гетерогенных везикул происходит в пределах одной бактериальной клетки. **в** – Белок Л5 концентрируется в определенных локусах периплазмы, прилегающих к внутренней стороне внешней мембраны. **г** – В контрольных образцах связывания антител обнаружено не было. ВМ, внешняя мембрана; П, периплазма; ЦМ, цитоплазматическая мембрана; В + Л5, везикулы, содержащие белок Л5; В – Л5, везикулы, не содержащие белок Л5.

Было установлено, что в межклеточном пространстве находятся везикулы двух типов: везикулы, содержащие белок Л5, и везикулы, не содержащие его (рис. 13а). Образование этих групп везикул происходит в пределах одной бактериальной клетки (рис. 13б). Интересным результатом оказалось то, что в периплазматическом пространстве белок Л5 концентрируется в определенных участках/локусах с внутренней стороны внешней мембраны (рис. 13в), из которых в последующем формируются везикулы,

содержащие его в своем составе (рис. 13б). Кроме того, белок Л5 плотно прилегает к внутренней стороне внешней мембраны, что может свидетельствовать об его взаимодействии с ней.

Таким образом, результаты иммуноцитохимического исследования показывают, что клетки *Lysobacter* sp. XL1 образуют везикулы как содержащие белок Л5, так и его не содержащие. Вероятно, в качестве фактора, обуславливающего формирование субпопуляции секреторных везикул, может выступать сам белок Л5.

Установление роли рекомбинантного белка Л5 в образовании везикул у *P. fluorescens* Q2-87/V

Ранее была разработана экспрессионная система для бактериолитического фермента Л5 *Lysobacter* sp. XL1 на основе *P. fluorescens* Q2-87/V (Lapteva *et al.*, 2012). Поскольку и для бактерий рода *Pseudomonas* характерно образование везикул, то мы предположили, что успешная экспрессия белка Л5 была связана с их образованием. Возможно, что и в рекомбинантной системе белок Л5 является участником биогенеза везикул.

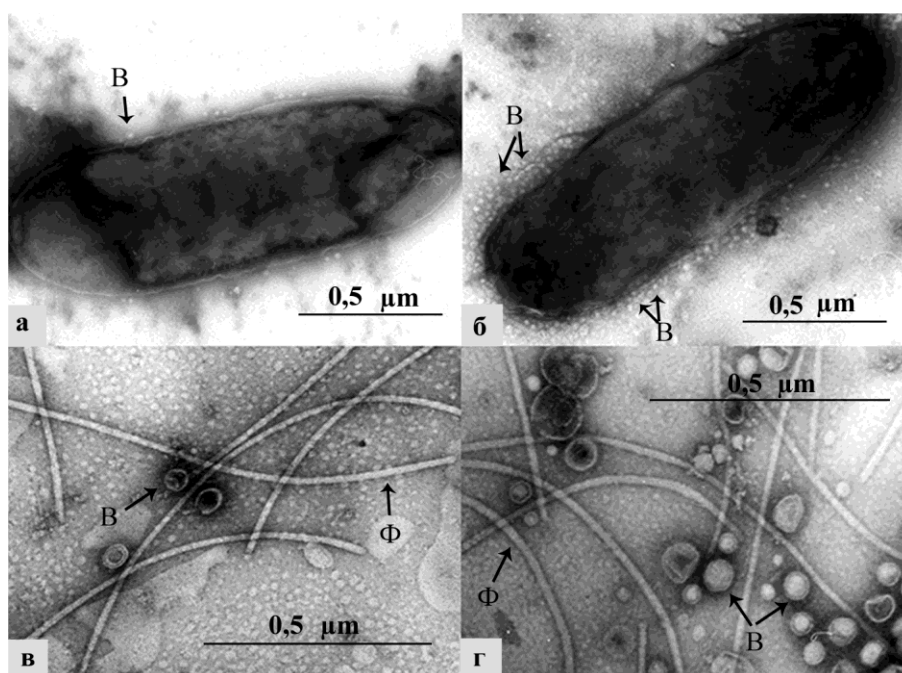


Рис. 14. Электронная микроскопия с использованием негативного контрастирования. **а** – Препарат культуральной жидкости *P. fluorescens* Q2-87. **б** – Препарат культуральной жидкости *P. fluorescens* Q2-87/V. **в** – Препарат везикул Q2-87. **г** – Препарат везикул Q2-87/V. В, внешнемембранные везикулы; Ф, фимбриеподобные структуры.

В настоящей работе методом электронной микроскопии (негативное контрастирование) установлено, что родительский штамм *P. fluorescens* Q2-87 и

рекомбинантный штамм *P. fluorescens* Q2–87/V формируют внешнемембранные везикулы (рис. 14). Однако штамм, продуцирующий литический фермент Л5, образует большее количество везикул, чем родительский (рис. 14б).

Везикулы обоих штаммов были выделены и частично охарактеризованы. На рисунке 14 в, г представлена электронная микроскопия полученных препаратов. Видно, что в препарате везикул штамма Q2–87/V содержится много везикул диаметром от 30 до 125 нм, в то время как везикулы Q2–87 имеют более однородный размер, не превышающий 100 нм. На микрофотографиях также можно видеть структуры, обозначенные нами как фимбриеподобные. Анализ всех полей съемки показал, что препараты везикул обоих штаммов содержат одинаковое количество этих структур.

В полученных препаратах была измерена концентрация белка (табл. 2). Как видно из таблицы, в препарате везикул Q2–87/V содержится большее количество белка по сравнению с препаратом везикул Q2–87. Этот результат согласуется с данными электронной микроскопии о большем количестве везикул, образуемых рекомбинантным штаммом.

Таблица 2. Содержание белка в препаратах везикул Q2–87 и Q2–87/V

Препараты	Концентрация белка, мг мл ⁻¹
везикулы Q2–87	0,014±0,003
везикулы Q2–87/V	0,048±0,004

Приведены средние значения ± стандартное отклонение

Сравнительная электрофореграмма показала, что спектр мажорных белков в препаратах везикул существенно различается (рис. 15). Наряду с мажорными белками, присутствующими в препаратах везикул обоих штаммов, в препарате везикул Q2–87/V мажорными также являются белки с молекулярными массами 19,0 кДа и 20,0 кДа, 27,0 кДа. Известно, что основной вклад в протеом везикул грамотрицательных бактерий вносят внешнемембранные белки (Choi *et al.*, 2011). Поэтому неполная идентичность белкового состава может указывать на дополнительные локусы во внешней мембране Q2–87/V, из которых происходит формирование везикул. Фактором, обуславливающим этот процесс, может быть рекомбинантный белок Л5, который может использовать везикулы в качестве транспортного средства, как и у *Lysobacter* sp. XL1.

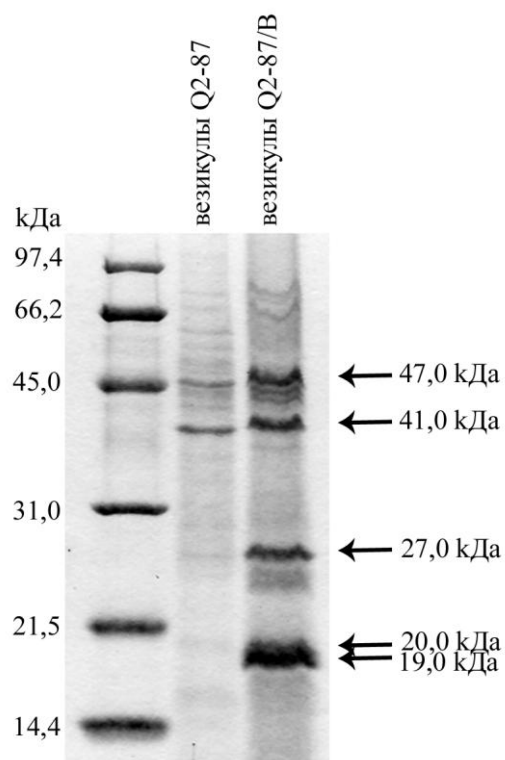


Рис. 15. Ds–Na – ПААГ. Электрофореграмма белков из препаратов везикул Q2–87 и Q2–87/V. Образцы выровнены по объему.

Белок Л15 в везикулах рекомбинантного штамма обнаруживали по наличию литической активности относительно тест–культур и иммуноблоттингом.

Для выявления бактериолитической активности в везикулах использовали высокочувствительный тест на чашке с вплавленными в агарозный гель автоклавированными клетками *S. aureus* 209P (рис. 16).

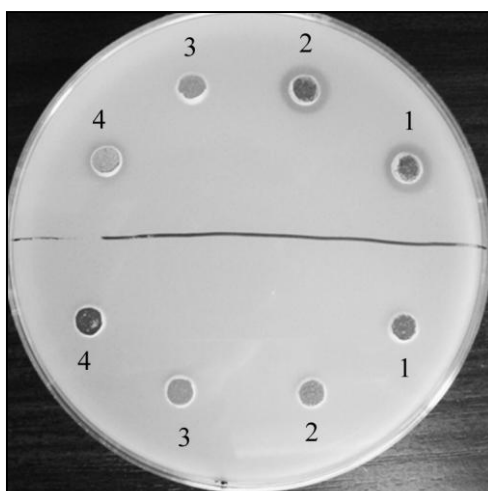


Рис. 16. Бактериолитический эффект культуральной жидкости и везикул *P. fluorescens* Q2–87/V (верхняя половина тест чашки) и *P. fluorescens* Q2–87 (нижняя половина тест–чашки). **1** – Культуральная жидкость до осаждения везикул. **2** – Культуральная жидкость после осаждения везикул. **3** – Промывка везикул. **4** – Везикулы. В каждую лунку вносили по 30 мкл образца.

Зоны лизиса клеток *S. aureus* 209P образовывались в месте нанесения препаратов везикул и культуральной жидкости штамма *P. fluorescens* Q2–87/B.

Литическое действие препарата везикул Q2–87/B изучали также в отношении живых грамотрицательных и грамположительных бактерий методом спот-теста (табл. 3).

Таблица 3. Литический эффект препарата везикул Q2–87/B

Бактерии	Литический эффект везикул
Грамположительные бактерии	
<i>Bacillus subtilis</i> W23	++*
<i>Bacillus cereus</i> 217	++
<i>Micrococcus roseus</i> B 1236	++
<i>Micrococcus luteus</i> B1819	++
<i>Corynebacterium xerosis</i>	++
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	++
<i>Rathayibacter tritici</i>	++
Грамотрицательные бактерии	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1472	++
<i>Pseudomonas putida</i>	+**
<i>Proteus vulgaris</i> H–19	+
<i>Proteus mirabilis</i> N2	+
<i>Escherichia coli</i> K12	++
<i>Erwinia caratovora</i> B15	++
<i>Alcaliganes faecalis</i>	+

* сильный литический эффект; ** слабый литический эффект

Как видно из таблицы, препарат везикул обладает сильным литическим действием в отношении грамположительных бактерий и более слабым в отношении грамотрицательных бактерий.

Также было установлено литическое действие препарата везикул Q2–87/B в отношении живых патогенных бактерий: метициллинустойчивого штамма *S. aureus* 55 (MRSA) и *B. anthracis* 71/12 (рис. 17а, б).

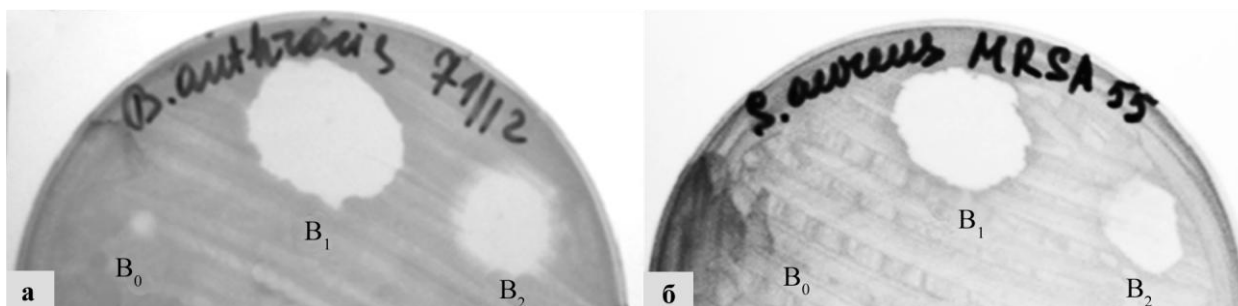


Рис. 17. Литический эффект препаратов везикул по отношению к живым патогенным бактериям методом спот–теста. **а** – Штамм *B. anthracis* 71/12. **б** – Штамм *S. aureus* 55 MRSA. B₀ – Везикулы Q2–87. B₁ – Везикулы *Lysobacter* sp. XL1. B₂ – Везикулы Q2–87/B.

На рисунке также можно видеть, что действие везикул Q2–87/В (В₂) сопоставимо с действием везикул *Lysobacter* sp. XL1 (В₁). Некоторое литическое действие везикул контрольного штамма Q2–87 в отношении сибирезвездного микроба может быть связано с возможным присутствием в них автолитических ферментов.

Иммуноблоттинг с антителами к ферменту Л5 показал, что этот белок достоверно выявляется в везикулах штамма Q2–87/В (рис. 18).

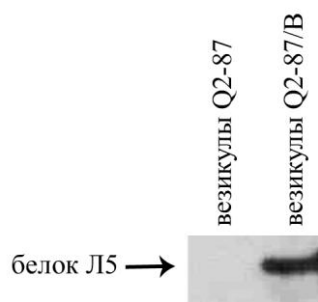


Рис. 18. Иммуноблоттинг препаратов везикул Q2–87 и Q2–87/В с использованием поликлональных антител к белку Л5.

Таким образом, можно заключить, что рекомбинантный белок Л5 секретируется в окружающую среду посредством везикул *P. fluorescens* Q2–87/В. Совокупность данных подтверждает способность этого белка провоцировать везикулообразование.

3.1.2 Изучение роли фосфолипидов в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1

Очевидно, что белок Л5 не единственный фактор, обуславливающий процесс формирования везикул у *Lysobacter* sp. XL1. Это подтверждается данными об их гетерогенности и предполагает наличие других факторов биогенеза. Особого внимания заслуживает изучение роли фосфолипидов в этом процессе, которые являются одним из основных компонентов внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Для установления роли фосфолипидов в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1 была проведена сравнительная характеристика фосфолипидного состава препаратов внешних мембран и везикул.

Препарат внешних мембран был получен посредством фракционирования суммарных мембран *Lysobacter* sp. XL1 в градиенте плотности сахарозы 30% – 50%. Идентификация фракций, содержащих внешние мембраны, проводилась измерением в них основного компонента липополисахарида внешних мембран – КДО, а также определением спектра белков.

Установлено, что наибольшее количество КДО (3,94 мМ) выявляется во фракциях, соответствующих 40–45% сахарозы, минимальное (0,48 мМ) – во фракции, соответствующей 30% сахарозы.

Сравнительная характеристика белкового состава полученных фракций показала, что фракция 30% сахарозы содержит спектр белков, среди которых мажорным является белок с молекулярной массой около 23,5 кДа (рис. 19). Из рисунка также видно, что фракции 40 и 45% сахарозы содержат мажорные белки с молекулярными массами около 23,0 кДа, 26,0 кДа, 41,0 кДа и 42,0 кДа, которые, как было показано ранее, являются внешнемембранными белками (Васильева *и др.*, 2009). Вероятно, фракция 30% сахарозы содержит цитоплазматические мембраны. Фракция 35% является переходной между 30% и 40–45% сахарозы. Внешние мембраны распределились во фракциях 40 и 45% сахарозы, которые были отобраны для изучения фосфолипидного состава.

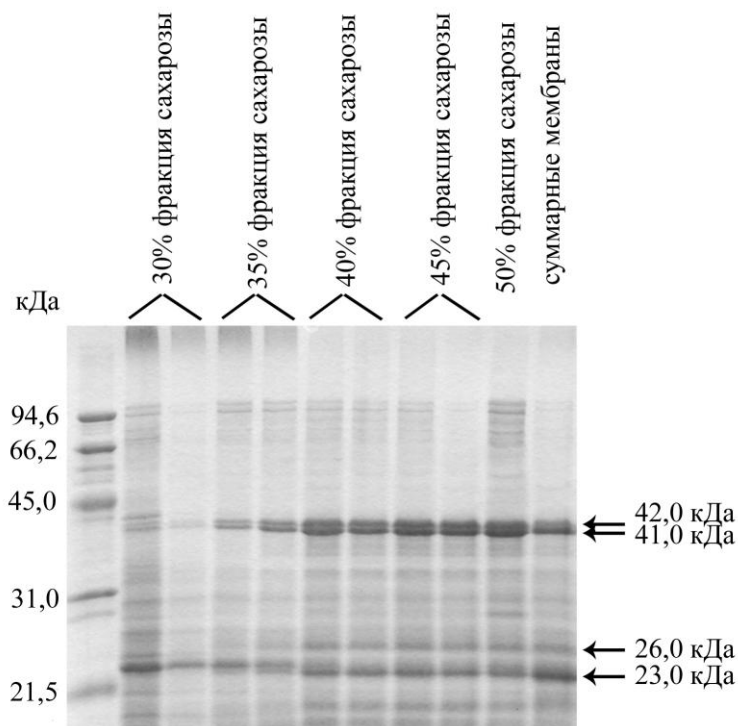


Рис. 19. Ds–Na – ПААГ. Сравнительная электрофореграмма белкового состава фракций. Стрелки указывают на белковые полосы, характерные для внешних мембран *Lysobacter* sp. XL1.

Сравнительный фосфолипидный анализ препаратов внешних мембран и везикул методом двумерной тонкослойной хроматографии показал, что внешние мембраны содержат целый спектр фосфолипидов: мажорными среди них являются кардиолипин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерол и неидентифицированный фосфолипид ФЛ2; в минорном количестве присутствуют фосфатидилмонометилэтаноламин и группа неидентифицированных фосфолипидов (рис. 20а).

Стоит отметить, что ранее фосфолипидный состав мембран представителей рода *Lysobacter* не был изучен. Однако имеются данные о фосфолипидном составе клеток (Singh *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016). Фосфолипидный состав внешних мембран *Lysobacter* sp. XL1 соответствует им.

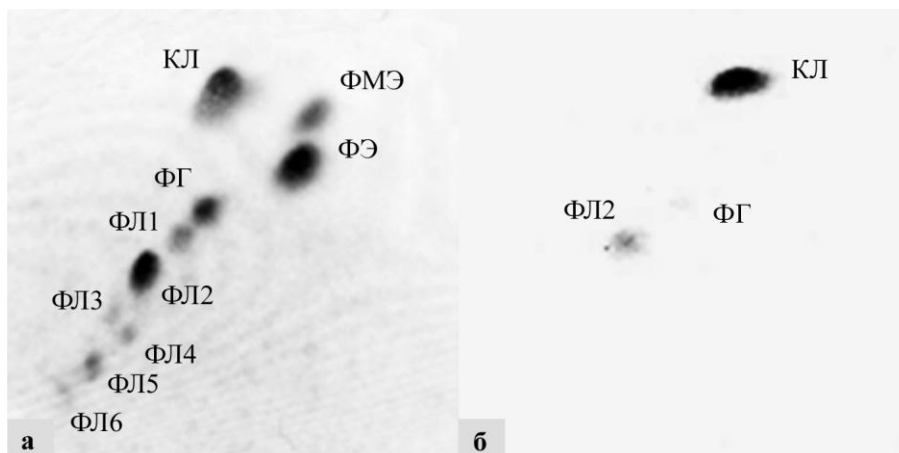


Рис. 20. Двумерная тонкослойная хроматография фосфолипидов внешних мембран и везикул *Lysobacter* sp. XL1. **а** – Спектр фосфолипидного состава внешних мембран. **б** – Фосфолипиды везикул. КЛ, кардиолипин; ФМЭ, фосфатидилмонометилэтаноламин; ФЭ, фосфатидилэтаноламин; ФГ, фосфатидилглицерол; ФЛ1, ФЛ2, ФЛ3, ФЛ4, ФЛ5, ФЛ6, неидентифицированные фосфолипиды.

В препарате везикул *Lysobacter* sp. XL1 обнаружен лишь один мажорный фосфолипид кардиолипин и небольшое разнообразие минорных фосфолипидов: фосфатидилглицерол и неидентифицированный фосфолипид ФЛ2 (рис. 20б). Полученный результат свидетельствует в пользу того, что везикулы образуются преимущественно из участков внешней мембраны, обогащенной кардиолипином.

Таким образом, установлено два фактора, обуславливающих биогенез везикул *Lysobacter* sp. XL1: литический фермент Л5 и кислый фосфолипид кардиолипин. Участие рекомбинантного белка Л5 в образовании везикул *P. fluorescence* Q2–87/В подтверждает его особые свойства, определяющие способность влиять на этот процесс.

3.2 СТРУКТУРНО–ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ Л1 И Л5 *LYSOBACTER* SP. XL1

Ранее было установлено, что гомологичный белку Л5, белок Л1 *Lysobacter* sp. XL1, использует другой путь секреции (не везикулярный) во внеклеточное пространство: вероятно, секретруется посредством секреторного аппарата II типа, как и α -литическая протеаза *L. enzymogenes* (Васильева 2010). Поэтому мы предположили, что различия в топогенезе этих белков может быть обусловлено их структурными особенностями.

3.2.1 Получение рекомбинантных белков Л1 и Л5 для кристаллизации

Для кристаллизации использовали рекомбинантные белки Л1 и Л5, полученные из тельца включения *E. coli* BL21(DE3)/pLysE. Рекомбинантный штамм трансформировали плазмидой pArgoZ, несущей ген пробелка Л1, и pVproZ, несущей ген пробелка Л5 с 6 His на N-конце (Грановский *и др.*, 2010, 2011). Очистку белков проводили, как описано в главе «Материалы и методы». Гомогенность полученных препаратов была подтверждена электрофоретическим анализом (рис. 21). Активность препаратов подтверждалась турбидиметрическим методом на автоклавированных клетках *S. aureus* 209Р.

В результате были получены активные, электрофоретически гомогенные белки Л1 и Л5, которые использовали для структурного анализа.

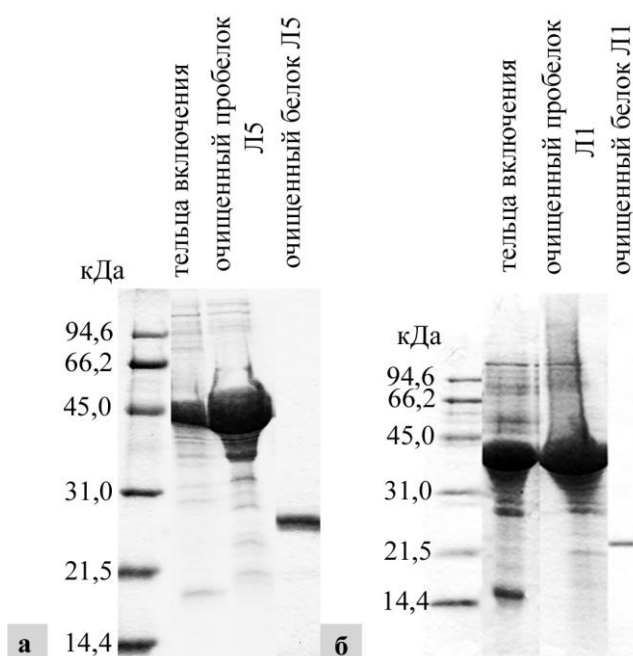


Рис. 21. Ds–Na – ПААГ. **а** – Стадии очистки белка Л5. Концентрации пробелка Л5 и белка Л5 равны 20 мкг и 3,5 мкг соответственно. **б** – Стадии очистки белка Л1. Концентрации пробелка Л1 и белка Л1 равны 20 мкг и 0,5 мкг соответственно.

3.2.2 Сравнительная структурная характеристика белков Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1

Совместно с Институтом белка РАН (г. Пущино) были выращены крупные кристаллы белков Л1 и Л5 размером 0,05×0,05×0,6 мм и 0,2×0,3×0,5 мм соответственно (рис. 22).

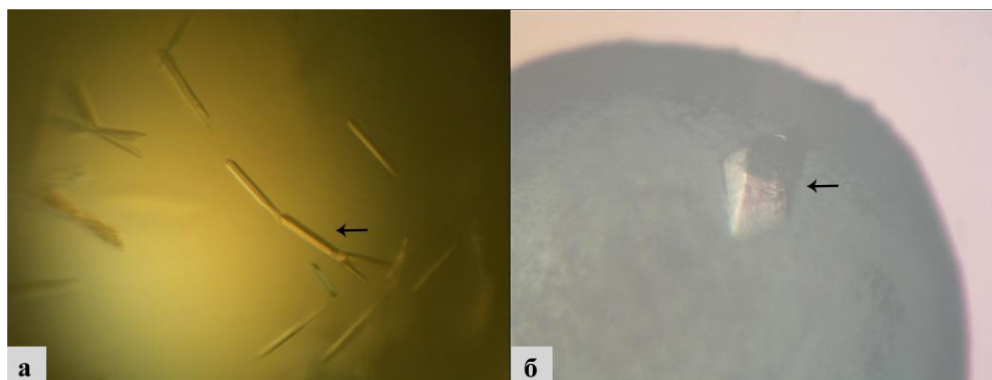


Рис. 22. Кристаллы белков Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1. **а** – Кристалл белка Л1. **б** – Кристалл белка Л5. Стрелкой указаны кристаллы.

С полученных кристаллов собраны рентгенодифракционные данные и определены структуры с разрешением 1,35 Å для белка Л1 и 1,60 Å для белка Л5 (рис. 23).

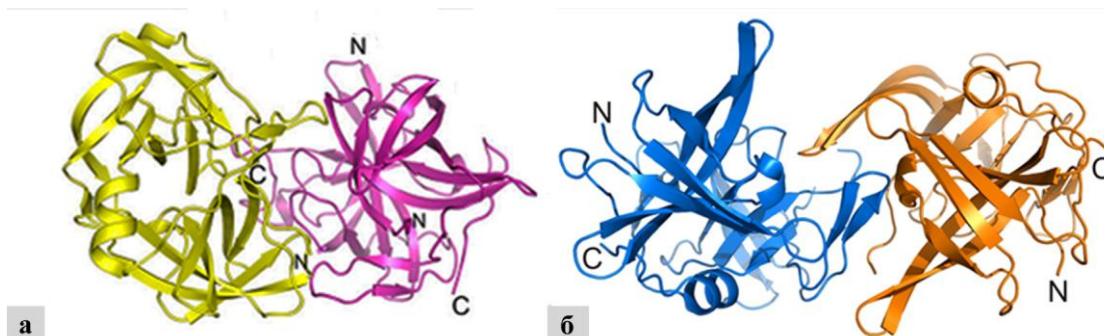


Рис. 23. Структуры белков Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1. **а** – Две молекулы белка Л1 в ассиметричной части ячейки. **б** – Две молекулы белка Л5 в ассиметричной части ячейки.

Установлено, что полипептидная цепь каждой молекулы обоих белков формирует два гидрофобных домена, которые состоят из шести антипараллельных β -цепей, между которыми расположен активный центр, представленный триадой аминокислот Ser/His/Asp. Эта структура представляет собой так называемый двойной β -баррель, характерный для всех представителей семейства сериновых протеаз S1 субкласа PA(S) (Rawlings&Barrett 2013).

Для белка Л5 были выявлены интересные особенности. Так, в ассиметричной части ячейки кристалла были обнаружены две молекулы белка Л5 с большим количеством контактов на мономер–мономер интерфейсе (рис. 24). Это вызвало предположение о димеризации белка.

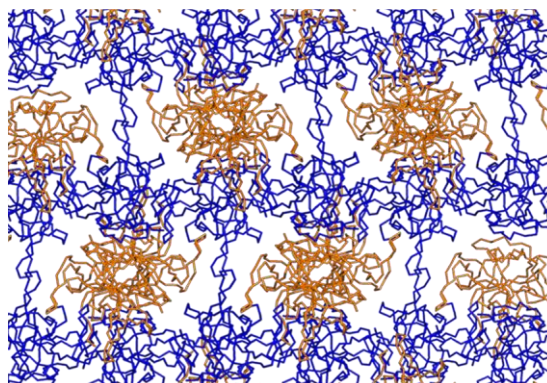


Рис.24. Кристаллическая упаковка белка Л5.

Для выяснения, является ли белок Л5 димером, была проведена гель-фильтрация и электрофорез в нативных условиях.

В качестве маркеров для гель-фильтрации были использованы стандарты (Sigma, США): цитохром С (12,3 кДа), миоглобин (17,8 кДа), химотрипсиноген А (25,6 кДа), овальбумин (44,0 кДа), БСА (67,0 кДа). Объемы элюции приведены в таблице 4.

Таблица 4. Объемы элюции белков, нанесенных на колонку HiLoad™16/60

Маркеры	М, кДа	Объем элюции, мл
цитохром С	12,3	83,18
миоглобин	17,8	78,24
химотрипсиноген А	25,6	73,12
овальбумин	44,0	61,86
БСА	67,0	55,79
Л5	16,6	79,08

На основании полученных результатов был построен график зависимости объема элюции, отнесенного к мертвому объему колонки, от десятичного логарифма молекулярной массы маркеров, по которому и была определена молекулярная масса белка Л5, составившая 16,6 кДа (рис. 25). Из электрофоретической подвижности в денатурирующих условиях следует, что масса этого белка составляет около 24 кДа. Меньшее значение молекулярной массы, полученное методом гель-фильтрации, может быть связано с плотной упаковкой белка, что делает молекулы более компактными.

Таким образом, полученный результат свидетельствует в пользу того, что белок Л5 является мономером.

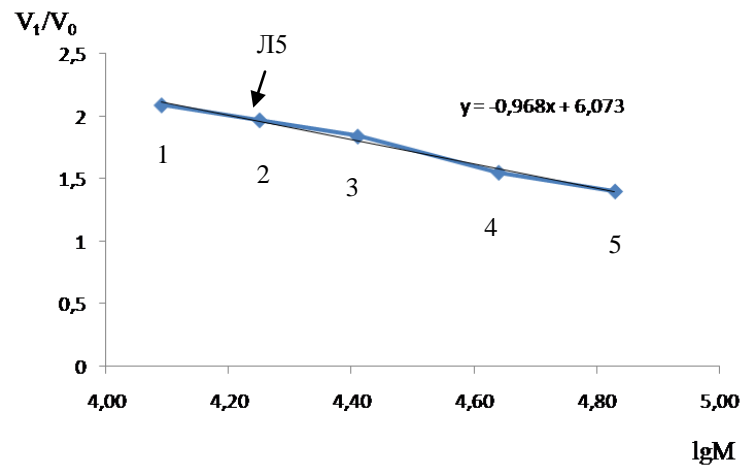


Рис. 25. График зависимости отношения объема элюции к мертвому объему колонки от десятичного логарифма M . 1, цитохром С; 2, миоглобин; 3, химотрипсиноген А; 4, овальбумин; 5, БСА. V_t , объем элюции; V_0 , мертвый объем колонки; M , молекулярная масса маркеров. На графике проведена линия тренда и показано уравнение к ней.

Также был проведен электрофоретический анализ белка Л5 в нативных условиях. Была выбрана катодная система Рейсфельда, в силу того что расчетная pI белка 9,44 (Vector NTI 10.3.0). В качестве маркеров были использованы щелочные белки: трипсин (pI 10,1–10,5), химотрипсиноген А (pI 8,97) и протеиназа К (pI 8,9) (рис. 26).

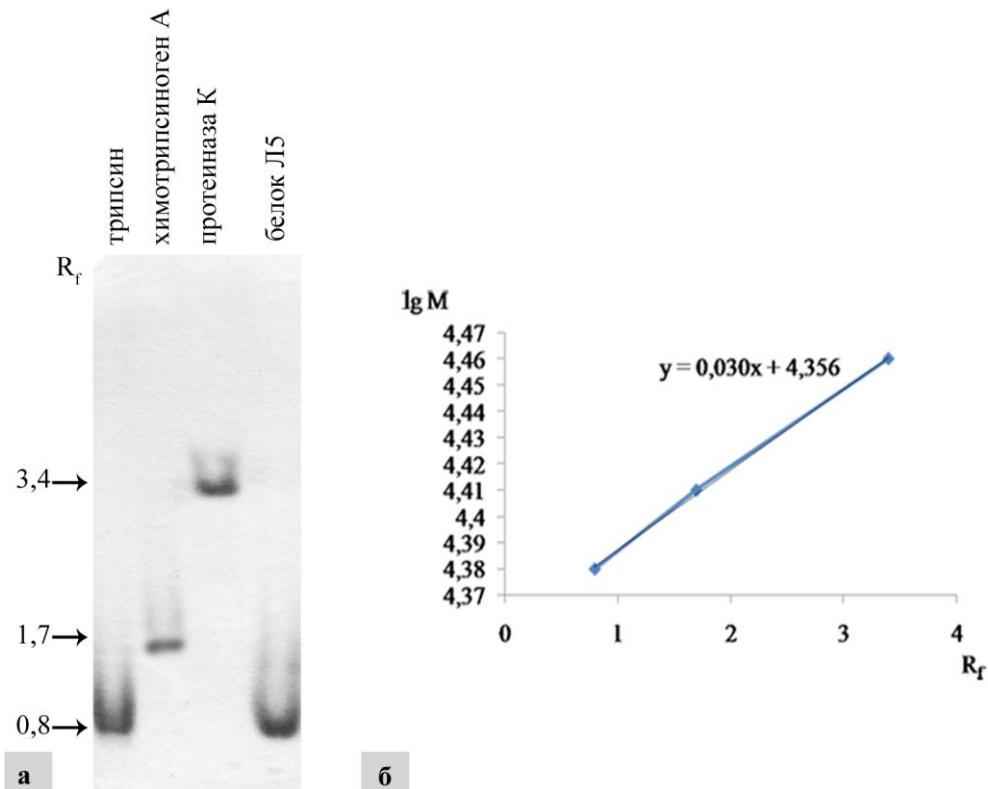


Рис. 26. Электрофорез в нативных условиях (катодная система Рейсфельда).

а — Электрофореграмма маркеров и белка Л5. **б** — График зависимости десятичного логарифма M от R_f . R_f , относительная электрофоретическая подвижность; M , молекулярная масса маркеров. Концентрации белков, используемые для исследования, были равны 3 – 4 мкг.

На основании относительных электрофоретических подвижностей маркеров (рис. 26а) получено уравнение зависимости десятичного логарифма молекулярных масс от электрофоретической подвижности белков (рис. 26б). Как видно из рисунка, относительная электрофоретическая подвижность белка Л5 равна 0,8, что при пересчете соответствует молекулярной массе 24 кДа (рис. 26а). Это дополнительное доказательство того, что белок Л5 является мономером.

Анализ кристаллической упаковки выявил еще одну интересную особенность белка Л5. Обнаружено, что две молекулы в асимметричной части ячейки кристалла не идентичны (рис. 27). В одной из молекул (показана темно-оранжевым цветом) для участка 172 – 181 отсутствует электронная плотность, при этом аминокислотные остатки 171 (Ala) и 182 (Gln) разнесены на расстояние в 32 Å, что возможно только в том случае, если петля разорвана. Во второй молекуле (обозначена синим цветом) также отсутствует электронная плотность для участка 172 – 182, но расстояние между этими остатками составляет 9 Å, что свидетельствует в пользу целостности петли. Разрыв в петле может быть обусловлен высокой ее подвижностью, что и привело к тому, что ее не удалось зафиксировать в электронной плотности. При обнаруженной кристаллической упаковке 50% молекул являются целостными, а вторая, чередующаяся с ними половина, имеет разорванную петлю.

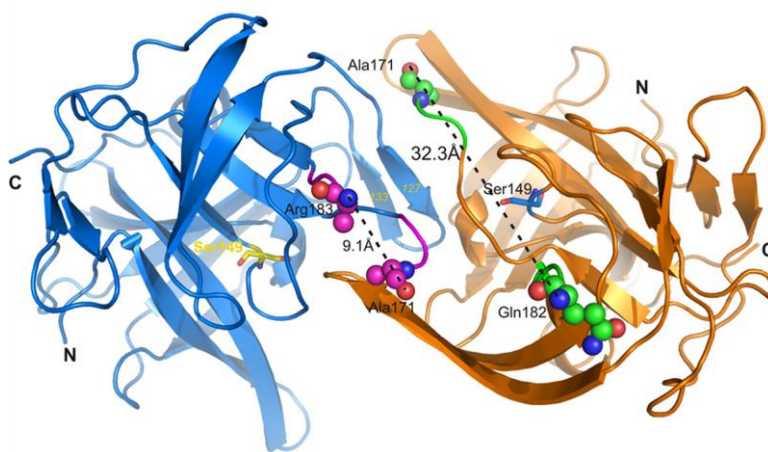


Рис. 27. Структура молекул белка Л5 в асимметричной части ячейки.

Кроме того, петля, соответствующая участку 127 – 133 целостной молекулы белка Л5, находится вблизи от активного центра соседней молекулы в области разрыва. Было определено, что непосредственно в активном центре лежит аминокислотная последовательность YGTLG этой петли. В связи с этим, было сделано предположение об ее ингибирующем эффекте.

Для проверки этого были синтезированы три пептида, соответствующие а.о. петли с разной длиной: VTVNYGTLGTVSG, VNYGTLGTV, TVNYGTLGTVS и проведен

ингибиторный анализ белка Л5 указанными пептидами. Однако зафиксировать ингибирующего действия при выбранных условиях не удалось.

Сравнительная характеристика белков Л1 и Л5 выявила их структурную идентичность с α -литической протеазой *L. enzymogenes*, которая составила 84% для белка Л1 и 60% для белка Л5 (рис. 28). Между собой белки Л1 и Л5 идентичны на 63%.

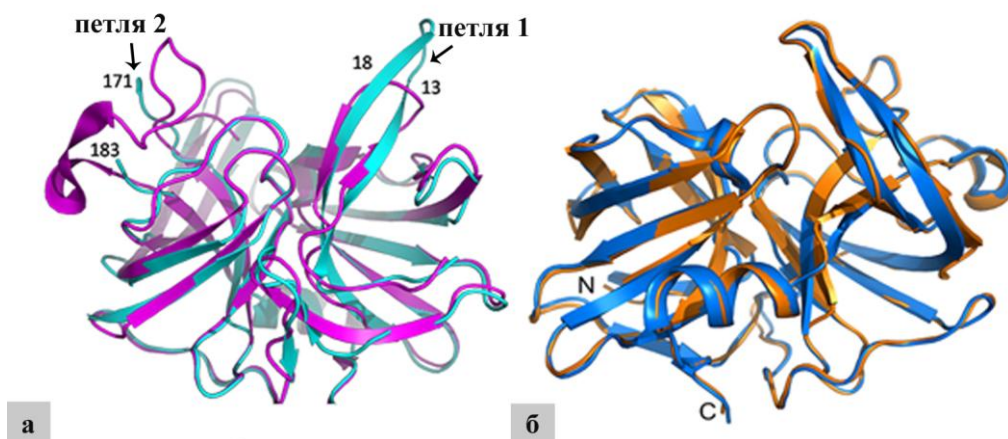


Рис. 28. Сравнение трехмерных структур литической протеазы Л5 и Л1 *Lysobacter* sp. XL1 с α -литической протеазой *L. enzymogenes*. **а** – Наложение структуры белка Л5 на структуру α -литической протеазы (pdb – 2ALP). Розовым цветом представлена структура α -литической протеазы, голубым – структура белка Л5. **б** – Наложение структуры белка Л1 на структуру α -литической протеазы (pdb – 2ALP). Голубым цветом представлена структура α -литической протеазы, желтым – структура белка Л1.

В белке Л5 обращают на себя внимание две петли (рис. 28а). Первая петля соответствует участку 5 – 28 а.о. (на рис. 28а обозначены номера а.о. 13..18) и вторая петля соответствует участку 161 – 190 а.о. (на рис. 28а обозначены номера а.о. 171..183). Петля 1 отличается от эквивалентных петель гомологов: она длиннее на 4 а.о. Для петли 2 не удалось зафиксировать электронную плотность. Как говорилось выше, связано это с тем, что петля подвижная. Эквивалентные петли гомологов являются более стабильными.

Таким образом, в пространственной структуре белка Л5 выявлены домены, отличающиеся от эквивалентных доменов гомологичных белков. Эти отличия могут иметь значение для понимания особенностей функционирования этого белка.

Кроме того, плотная кристаллическая упаковка белка Л5, а также полученные результаты о его накоплении в периплазматическом пространстве клеток *Lysobacter* sp. XL1 позволили сделать предположение о его способности формировать амилоидоподобные структуры. Вероятно, в везикулах этот белок находится в амилоидоподобном состоянии.

3.2.3 Изучение способности литической протеазы Л5 *Lysobacter* sp. XL1 агрегировать в амилоидоподобные фибриллы

Для доказательства этого белок Л5, полученный из препарата везикул *Lysobacter* sp. XL1, был проанализирован методами электронной микроскопии и дифракции рентгеновских лучей.

На микрофотографии видно, что белок Л5 агрегирует в образования, по ультраструктуре напоминающие амилоидные фибриллы (рис. 29а).

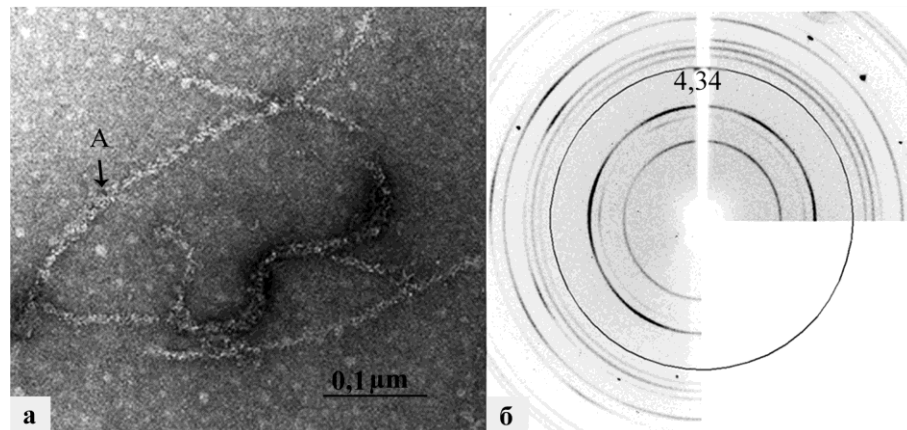


Рис. 29. Амилоидоподобная конформация белка Л5, выделенного из препарата везикул *Lysobacter* sp. XL1. **а** – Электронная микроскопия с использованием негативного контрастирования. А, амилоидоподобные фибриллы. **б** – Рентгенограмма препарата. Рефлекс, равный 4,34 Å, свидетельствует о наличии кросс-β-структуры.

Совместно с Институтом белка РАН был проведен анализ белка Л5 методом дифракции рентгеновских лучей с помощью комплекса Proteum X8. В результате получены рефлексы 4,34 Å (рис. 29б) и 8 Å, которые свидетельствуют о наличии кросс-β-структуры, характерной для амилоидов. Также был получен рефлекс, равный 4,1 Å, который можно отнести к остаткам мембраны от везикул. Установлено, что для фосфолипидов характерно такое значение отражения (Maji *et al.*, 2009).

Таким образом, литическая протеаза Л5 *Lysobacter* sp. XL1 способна агрегировать в виде амилоидов.

3.2.4 Изучение специфичности белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1

Ранее было установлено, что белок Л5 проявляет активность на простых белковых субстратах, а также на сложном полимере – пептидогликане *S. aureus* 209P (Vasilyeva *et al.*, 2014), но не был установлен тип гидролизуемых связей. Одной из задач данной работы было установить специфичность действия фермента Л5 по отношению к пептидогликану стафилококка.

По классификации Шлейфера и Кандлера пептидогликан *S. aureus* 209P принадлежит к группе А3α (Schleifer&Kandler 1972). Для этой группы характерно, что к L–лизину в положении 3 одной пептидной цепи присоединяется D–аланин в положение 4 другой пептидной цепи посредством пентапептидного глицинового мостика (рис. 30). Химические связи, формирующие пептидогликан: гликозидная связь между сахарными единицами, пептидные связи между аминокислотами в цепи и в межпептидном мостике, а также амидная связь между N–ацетилмурамовой кислотой (производное моносахарида) и первой аминокислотой пептидной цепи L–аланином.

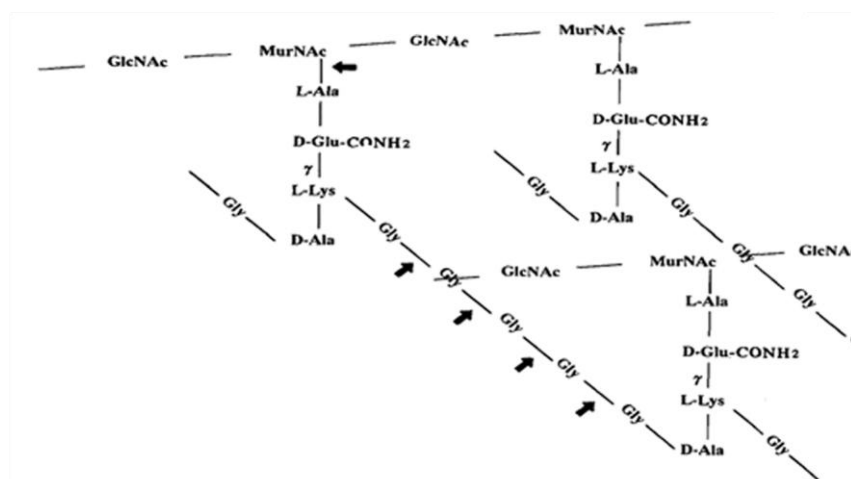


Рис. 30. Схема пептидогликана *S. aureus* (Li et al., 1997). MurNAc, N–ацетилмурамовая кислота; GlcNAc; N–ацетилглюкозамин; L–лизин и D–аланин соседних пептидных цепей соединены посредством пентапептидного глицинового мостика. Стрелками указаны гидролизуемые белком Л5 связи.

Поскольку белок Л5 является протеазой, то очевидно, что он гидролизует пептидную часть пептидогликана. Ранее было показано, что при добавлении в реакционную смесь ЭПС *Lysobacter* sp. XL1 происходит усиление каталитической активности некоторых литических ферментов этой бактерии (Степная и др., 2001). Поэтому в данной работе мы использовали два варианта опыта по установлению типа гидролизуемой в пептидогликане стафилококка связи белком Л5: с ЭПС и без него.

При гидролизе пептидной части пептидогликана происходит высвобождение NH₂–групп аминокислот. Присутствие в гидролизате свободных NH₂–групп было определено методом динитрофенилирования Гюзена и Строминджера. По разнице в аминокислотном составе контрольных и опытных образцов судили о расщепляемой связи в пептидогликане *S. aureus* 209P (табл. 5).

Таблица 5. Аминокислотный состав пептидогликана *S. aureus* 209P до и после гидролиза белком Л5

Аминокислоты в пептидогликане <i>S. aureus</i> 209P	Контрольный образец, нмоль	Опытный образец, нмоль	Разница между опытными и контрольными образцами, нмоль
Glu	1,00	1,00	0,00
Gly	4,46	3,85	0,61
Ala	2,25	2,01	0,24
Lys	1,04	1,11	0,00
	Контрольный образец (реакция с ЭПС), нмоль	Опытный образец (реакция с ЭПС), нмоль	
Glu	1,00	1,00	0,00
Gly	4,46	4,02	0,44
Ala	2,11	1,96	0,15
Lys	1,07	1,00	0,07

Приведены средние значения двух биологических повторов.

Как видно из таблицы, 0,61 нмоль глицина и 0,24 нмоль аланина, отнесенных к 1 нмолю глутаминовой кислоты, становятся доступными для 2,4–динитрофторбензола после реакции белка Л5 с пептидогликаном *S. aureus* 209P. То же наблюдается при действии на пептидогликан белка Л5 с ЭПС: происходит освобождение 0,44 нмоль глицина и 0,15 нмоль аланина, отнесенных на 1 нмоль глутаминовой кислоты. Полученный результат свидетельствует о гидролизе белком Л5 пептидных связей в межпептидном мостике (Gly-Gly эндопептидазная активность), а также амидной связи между N–ацетилмурамовой кислотой и первым L–Ala (N–ацетилмурамоил–L–Ala амидазная активность) (рис. 30). Отмечено, что ЭПС не усиливал каталитических свойств фермента на этом субстрате.

Таким образом, белок Л5 *Lysobacter* sp. XL1, как и белок Л1 (Бегунова и др., 2003), является не только протеазой, но и пептидогликангидролазой, проявляя эндопептидазную и амидазную активности по отношению к пептидогликану *S. aureus* 209P. Однако интенсивность гидролиза пептидогликана белком Л5 по сравнению с литической протеазой Л1 ниже.

Ранее было показано, что фермент Л5 гидролизует флюорогенный синтетический субстрат Abz-Ala-Ala-Phe-pNA (Vasilyeva *et al.*, 2014). В результате гидролиза развивалось желтое окрашивание, что указывало на расщепление паранитроанилидной связи между фенилаланином и п-нитроанилином. Было предположено, что белок Л5 гидролизует и другие связи в этом субстрате. Для установления этого в настоящей работе была проведена одномерная тонкослойная хроматография продуктов гидролиза синтетического субстрата белком Л5.

Как видно из рисунка 31, гидролизат представлен продуктами, распределившимися в двух полосах: одна полоса желтого цвета и совпадает по R_f с п-нитроанилином, другая полоса флюоресцирует при длине волны 280 нм. Кроме того, окрашивание пластинки нингидриновым реактивом выявило окрашивание лишь во второй полосе. Из полученных результатов можно заключить, что белок Л5 расщепляет синтетический субстрат только по связи Phe-pNA. Способность гидролизовать флюорогенные синтетические субстраты по п-нитроанилидной связи известна для α -литической протеазы *L. enzymogenes* (Hunkapiller *et al.*, 1976).

В целом, полученный результат подтверждает способность белка Л5 гидролизовать амидные связи, что было установлено на пептидогликане стафилококка.

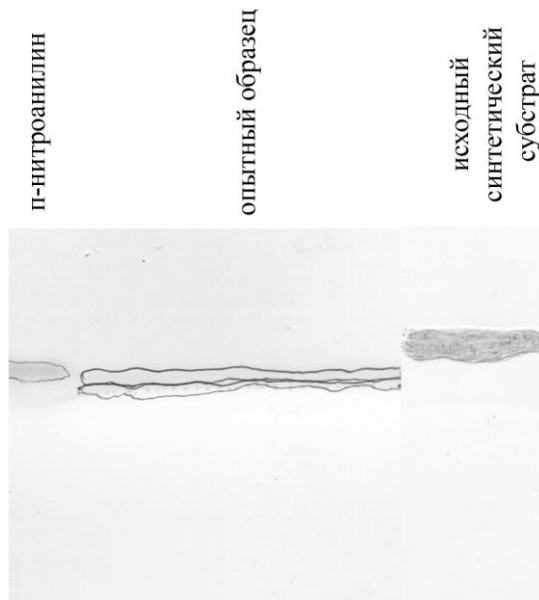


Рис. 31. Одномерная тонкослойная хроматография продуктов гидролиза синтетического субстрата Abz-Ala-Ala-Phe-pNA белком Л5.

Таким образом, установлено, что белок Л5 по отношению к пептидогликану стафилококка проявляет Gly-Gly эндопептидазную и N-ацетилмурамоил-L-Ala амидазную активности.

3.3 КОНСТРУИРОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЛИТИЧЕСКОГО БЕЛКА Л5 *LYSOBACTER SP. XL1*

Ранее было показано, что везикулы *Lysobacter sp. XL1*, содержащие литический фермент Л5, эффективно лизируют грамположительные микроорганизмы, включая патогенные штаммы и множественноустойчивые формы. Растворимый белок Л5 таким действием не обладает (Vasilyeva *et al.*, 2014). Однако использование естественных везикул в качестве антимикробного препарата невозможно из-за многокомпонентного состава. Подобные биомедицинские препараты должны быть известного качественного и количественного состава. В связи с этим в данной работе было начато конструирование антимикробных препаратов на основе литического белка Л5. Было выбрано два направления: первое – конструирование липосомальных препаратов на основе фосфолипидов везикул и белка Л5 *Lysobacter sp. XL1*; второе – конструирование препаратов на основе ЭПС и белка Л5 *Lysobacter sp. XL1*.

3.3.1 Конструирование антимикробных препаратов на основе ЭПС и белка Л5 *Lysobacter sp. XL1*

Ранее было показано, что высокомолекулярный кислый ЭПС *Lysobacter sp. XL1* (300 кДа) может стабилизировать некоторые электростатически связанные с ним белки, усиливая их активность за счет изменений в кинетике реакций (Степная *и др.*, 2001). Так, взаимодействие белка Л1 *Lysobacter sp. XL1* с ЭПС приводило к усилению бактериолитической активности в отношении автоклавированных клеток *S. aureus* 209Р в 1,12 раза. ЭПС не влиял на активность белка Л5 на автоклавированных клетках стафилококка, но мы предположили, что такое взаимодействие может расширять возможности Л5 в отношении живых клеток.

К очищенному и растворенному в буфере ЭПС добавляли гомогенный белок Л5 в соотношении 1:4 по концентрации, как описано в разделе «Материалы и методы». В полученном препарате определяли бактериолитическую активность на живых патогенных бактериях методом спот-теста. Литический эффект определялся по зонам лизиса в месте нанесения препарата. Результаты представлены в таблице 6 и на рисунке 32.

Таблица 6. Литическая активность препаратов

Патогенные бактерии	ЭПС +белок Л5 (4:1 по концентрации)	Липосомальный препарат на основе белка Л5	Гомогенный белок Л5
<i>B. anthracis</i> 71/12	++ ^а	++	- ^б
<i>B. cereus</i> 771	++	++	-
<i>S. aureus</i> 55 MRSA	++	++	-
<i>S. aureus</i> 538 ПАТИ	++	++	-
<i>S. aureus</i> 209	++	++	-

а, хороший литический эффект; б, отсутствие литического действия

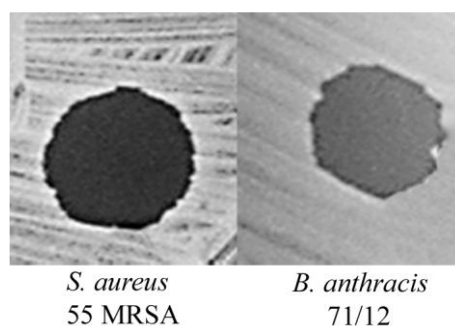


Рис. 32. Литическое действие препарата ЭПС+белок Л5 на живые клетки некоторых тест-объектов. Было выявлено сильное литическое действие препарата, которое проявлялось в виде формирования четкой видимой зоны лизиса в месте нанесения препарата диаметром 1,0–1,5 см.

Как видно, сконструированный препарат обладает хорошим литическим эффектом по отношению к выбранным тест-объектам. В то время как гомогенный белок Л5 не проявляет литического действия.

Литическое действие препарата также было определено на суспензии живых клеток *S. aureus* 209Р турбидиметрическим методом (табл. 7).

Таблица 7. Литическое действие антимикробного препарата

Время инкубации при 37°C, ч	Снижение поглощения суспензии стафилококка – разница с контролем, о.е.	
	ЭПС +белок Л5	Гомогенный белок Л5
3ч	0,04	+0,03
5ч	0,04	+0,04

Как видно из таблицы, препарат обладает достоверно значимым литическим эффектом в отношении живых клеток *S. aureus* 209P. В то время как гомогенный белок Л5 литическим действием не обладает. Механизм действия комплекса ЭПС с белком Л5 на живые клетки пока не известен.

Таким образом, выбранный подход в дальнейшем может привести к созданию высокоэффективного антимикробного лекарственного средства.

3.3.2 Конструирование антимикробных препаратов на основе фосфолипидов везикул и белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1

Липосомальный препарат конструировали, как описано в главе «Материалы и методы». Методом электронной микроскопии было обнаружено, что препарат состоит из липосом сферической формы и размером 17 ± 3 нм и 20 ± 3 нм (рис. 33). Вместе с тем в отдельных участках встречаются конгломераты несформированных липосом, а также кристаллоподобные структуры. Это указывает на необходимость доработки методики получения липосом.

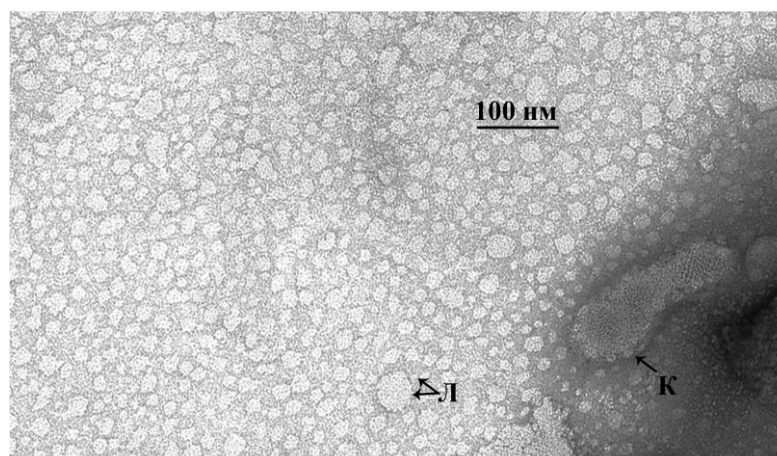


Рис. 33. Электронная микроскопия с использованием негативного контрастирования липосомального препарата. Л, липосомы; К, кристаллоподобные структуры.

Было изучено бактериолитическое действие, полученного препарата (табл. 6). Установлено, что он обладает хорошим литическим действием по сравнению с гомогенным белком Л5.

При изучении литического действия препарата на живых клетках *S. aureus* 209P турбидиметрическим методом было выявлено достоверное уменьшение поглощения суспензией клеток, которое составило 0,1 о.е. по сравнению с контролем. Гомогенный белок не проявлял литического эффекта, а напротив, приводил к повышению поглощения относительно контроля.

3.3.3 Изучение лечебного действия антимикробного препарата на основе белка Л5 и ЭПС

Полученный препарат на основе ЭПС и белка Л5 был передан в Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск). Все эксперименты с животными проводили согласно протоколу, одобренному комиссией по биоэтике Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск) и в соответствии с законодательством Российской Федерации и Директивой Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

Лечебное действие препарата изучали в отношении системного стафилококкового сепсиса, смоделированного у мышей. Мыши были разделены на 3 группы (в каждой по 4 мыши). В качестве инфицирующего агента был использован метициллинустойчивый штамм *S. aureus* 55 (MRSA). Первая группа мышей – контрольная (без лечения), вторая группа – леченая препаратом ЭПС в качестве контроля, и третья группа мышей – леченая антимикробным препаратом на основе белка Л5 с экзополисахаром. Лечение осуществлялось через 3ч, 24ч, 48ч после заражения (3 инъекции): препараты вводили внутривенно. На 5, 9, 13 и 15 дни после заражения производилась оценка внешнего и внутреннего состояния мышей: вес, состояние внутренних органов (обсемененность селезенки, печени и почек культурой *S. aureus* 55).

Результаты по обсемененности селезенки и печени не приведены, т.к. картина для всех экспериментальных животных одинаковая: высевается небольшое количество колоний или происходит полная элиминация культуры из этих органов. Наибольшему воздействию при моделировании стафилококкового сепсиса подвергаются почки. В таблице 8 приведены значения веса животных и обсемененности почек на 5, 9 и 15 сутки после заражения.

Было установлено, что сконструированный препарат не привел к полному излечению от инфекции, но по сравнению с контрольными нелечеными мышами способствовал снижению обсемененности почек на два порядка (табл. 8). Кроме того, мыши к 15 дню после начала лечения прибавляли в весе по сравнению с контрольными группами, что также свидетельствует о наличии лечебного эффекта испытуемого препарата.

Таблица 8. Оценка лечебного действия антимикробного препарата

Препараты	Абсолютное изменение веса мышей, г		Обсемененность почек культурой <i>S. aureus</i> 55 (MRSA)		
	Исходный вес	Изменение веса на протяжении эксперимента	5 день	9 день	15 день
1 группа мышей (контроль)	140,1	-23,6	$1,35 \times 10^6$	$0,54 \times 10^7$	$1,58 \times 10^6$
2 группа мышей (ЭПС)	99,7	-19,4	$0,75 \times 10^7$	$0,59 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
3 группа мышей (ЭПС + белок Л5)	97,0	+4,7	$0,65 \times 10^7$	$1,2 \times 10^4$	$1,85 \times 10^4$

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки антимикробных препаратов нового поколения на основе белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе были изучены некоторые особенности биогенеза везикул грамотрицательной бактерии *Lysobacter* sp. XL1. Ранее было показано, что с помощью везикул эта бактерия секретирует в окружающую среду один из внеклеточных ферментов – бактериолитическую протеазу Л5 (Vasilyeva *et al.*, 2008). Также было установлено, что в условиях секреции внеклеточных белков образуются везикулы разного размера (Васильева *и др.*, 2009). Было предположено, что везикулы *Lysobacter* sp. XL1 гетерогенны не только по размеру, но и по составу, плотности и, возможно, по выполняемым функциям. Также было предположено, что секретируемый посредством везикул белок Л5 может быть фактором, обуславливающим формирование субпопуляции секреторных везикул.

Для подтверждения гетерогенности было проведено фракционирование препарата везикул в градиенте плотности сахарозы. Было установлено, что основная часть везикул распределяется во фракциях, соответствующих 30% и 35% сахарозы. При этом обнаружено, что белок Л5 выявляется только в везикулах, находящихся во фракции 30% сахарозы (фракция везикул 1). Везикулы этой фракции имеют общебелковый состав, отличающийся от такового у везикул других фракций. Это указывает на то, что везикулы фракции 1 образуются из участков внешней мембраны (локусов), отличных от участков, из которых формируются везикулы других фракций. Таким образом, *Lysobacter* sp. XL1 образует гетерогенные везикулы по размеру, плотности и белковому составу.

Обнаружение белка Л5 исключительно в везикулах фракции 1 указывает на существование субпопуляции секреторных везикул. Иммуноцитохимия ультратонких срезов клеток *Lysobacter* sp. XL1 показала, что наряду с везикулами, не содержащими белок Л5, образуются везикулы, его содержащие. Причем было отмечено, что белок Л5 концентрируется в определенных локусах с внутренней стороны внешней мембраны, из которых затем наблюдается формирование везикулы. Эти данные подтверждают существование субпопуляции секреторных везикул, содержащих белок Л5. Результаты также позволяют предположить, что белок Л5 обладает особыми свойствами, обуславливающими везикулообразование.

Подтверждение этого было получено при изучении везикулообразования у рекомбинантного штамма *P. fluorescens* Q2–87/В, продуцирующего этот белок. Было установлено, что секреция рекомбинантного белка Л5 в окружающую среду осуществляется посредством везикул. Рекомбинантный штамм Q2–87/В в условиях продукции белка Л5 образовывал большее количество везикул, чем родительский штамм Q2–87. Сравнительная электрофореграмма показала, что спектр мажорных белков везикул

Q2–87 и Q2–87/В отличается. Наряду с мажорными белками с молекулярной массой около 41,0 кДа и 47,0 кДа, присутствующими в везикулах обоих штаммов, в везикулах Q2–87/В содержатся мажорные белки с молекулярной массой около 19,0 кДа, 20,0 кДа и 27,0 кДа. Белки с перечисленными молекулярными массами характерны для основных поринов внешних мембран представителей рода *Pseudomonas* (Bauman&Kuehn 2006; Tashiro *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011). Неполная идентичность белкового состава везикул Q2–87/В может быть связана с их образованием из дополнительных локусов внешней мембраны под влиянием белка Л5. Это согласуется с обсуждаемыми выше результатами, подтверждающими образование везикул, содержащих белок Л5, в определенных локусах внешней мембраны у *Lysobacter* sp. XL1. Предположение о локусной природе образования везикул уже неоднократно высказывалось и другими исследователями (Kadurugamuwa&Beveridge 1995; Lappann *et al.*, 2013; Roier *et al.*, 2015).

Таким образом, показано, что белок Л5 выступает в качестве фактора, обуславливающего биогенез группы секреторных везикул *Lysobacter* sp. XL1, содержащих его в своем составе. Влияние рекомбинантного белка Л5 на везикулообразование у *P. fluorescens* Q2–87/В предполагает также наличие определенных структурных особенностей, определяющих его способность провоцировать этот процесс.

Очевидно, что, помимо белка Л5, в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1 могут принимать участие и другие факторы. Так, одним из главных компонентов везикул являются фосфолипиды, которые обуславливают их сферическую форму. К настоящему моменту известно лишь несколько публикаций, косвенно свидетельствующих о роли фосфолипидов в образовании везикул. Так, для *P. syringae* Lz4W установлено, что фосфолипиды везикул обогащены ненасыщенными разветвленными жирными кислотами (Chowdhury&Jagannadham 2013). Было сделано предположение, что повышенная мембранная гибкость участков, обогащенных фосфолипидами с такими жирными кислотами, может способствовать образованию везикул (Kulkarni *et al.*, 2014). Напротив, для везикул *P. aeruginosa* было показано, что в составе фосфолипидов преобладают удлиненные и насыщенные жирные кислоты, из чего был сделан вывод о формировании везикул из более ригидных участков внешней мембраны. Кроме того, в составе этих везикул преобладающим фосфолипидом оказался фосфатидилглицерол, в то время как во внешних мембранах преобладает фосфатидилэтаноламин. Этот факт также указывает на большую ригидность участков мембран, из которых формировались данные везикулы (Tashiro *et al.*, 2011). В настоящей работе было установлено, что образование везикул у *Lysobacter* sp. XL1 происходит в участках внешней мембраны, обогащенных кардиолипином. Можно предположить, что инициация формирования везикул в этих

участках происходит благодаря биохимической структуре этого фосфолипида: гидрофильная головка кардиолипина несет два отрицательных заряда, и из-за их межмолекулярного отталкивания возможно нарушение жесткости внешней мембраны в участках, обогащенных этим фосфолипидом, что и обуславливает везикулообразование. Здесь следует отметить, что если белок L5 является фактором биогенеза определенной субпопуляции везикул, то кардиолипин, вероятнее всего, является одним из основных участников биогенеза всего пула везикул *Lysobacter* sp. XL1.

В настоящее время биогенез везикул у грамотрицательных бактерий изучается довольно интенсивно. На сегодняшний день известно три модели, описывающие этот процесс. Первая модель рассматривает влияние «сшивающих» пептидогликан с внешней мембраной молекул (например, липопротеин) (Hoekstra *et al.*, 1976; Wensink&Witholt 1981; Schwechheimer *et al.*, 2014). Вторая модель предполагает, что биогенез везикул осуществляется за счет давления периплазматических компонентов на внутреннюю сторону внешней мембраны (например, неправильно свернутые белки, фрагменты пептидогликана) (Zhou *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 2002; Schwechheimer *et al.*, 2014). Третья модель описывает участие в этом процессе молекул, искривляющих плоскость мембраны, к которым относятся липополисахарид или PQS фактор (Kadurugamuwa&Beveridge 1995; Schertzer&Whiteley 2012). Как видно, особенности биогенеза везикул, установленные для *Lysobacter* sp. XL1, не известны для других таксонов и не описаны в этих моделях. Вероятно, в будущем будут появляться новые данные об участии секретируемых белков и фосфолипидов в биогенезе везикул, что позволит создать новые модели этого процесса или расширить существующие.

Таким образом, установлено два фактора, участвующих в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1, – секретируемый белок L5 и кислый фосфолипид кардиолипин. На основании полученных результатов можно предложить модель биогенеза везикул у этой бактерии (рис. 34): секреторные везикулы формируются при участии белка L5, который, накапливаясь в периплазме, оказывает давление на внутреннюю сторону внешней мембраны; кислый фосфолипид кардиолипин может принимать участие в образовании всего пула везикул в силу своей биохимической структуры, которая приводит к нарушению жесткости внешней мембраны.

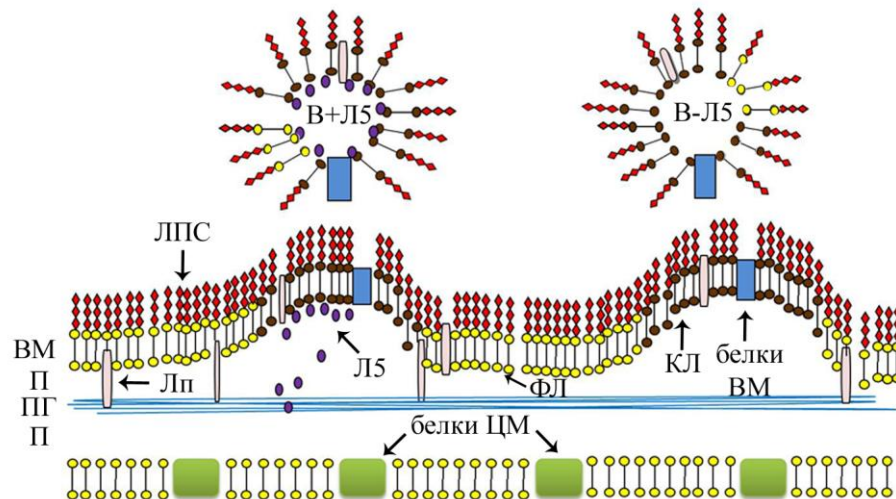


Рис. 34. Модель биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1. В+Л5, везикулы, содержащие белок Л5; В – Л5, везикулы, не содержащие белок Л5; ЛПС, липополисахарид; ВМ, внешняя мембрана; П, периплазма; ПГ, пептидогликан; Лп, липопротеин; ЦМ, цитоплазматическая мембрана; КЛ, кардиолипин.

Влияние белка Л5 на везикулообразование может быть обусловлено его структурными особенностями. Гомологичная белку Л5 литическая протеаза Л1 *Lysobacter* sp. XL1 секретируется в окружающую среду, по-видимому, вторым путем секреции (Васильева 2010), как и α -литическая протеаза *L. enzymogenes* (Silen *et al.*, 1989; Fujishige *et al.*, 1992). Несмотря на гомологию, ферменты Л1 и Л5 имеют такие особенности в своей структуре, которые определяют различия в их топогенезе. В данной работе были получены кристаллы белков Л1 и Л5, с которых собраны рентгенодифракционные данные и определены структуры с разрешением 1,35 Å и 1,60 Å соответственно.

При исследовании кристаллов белка Л5 обратила на себя внимание плотная кристаллическая упаковка молекул. В асимметричной части ячейки кристалла были обнаружены две молекулы белка Л5 с большим количеством контактов на мономер–мономер интерфейсе. Это в первую очередь вызвало предположение о димеризации белка. Однако методами эксклюзионной хроматографии и электрофорезом в нативных условиях было доказано, что белок Л5 является мономером. Также было установлено, что две молекулы в асимметричной части ячейки кристалла не идентичны. В одной из молекул для участка, соответствующего а.о. 172 – 182 отсутствует электронная плотность, при этом аминокислотные остатки 171 (Ala) и 182 (Gln) разнесены на расстояние в 32 Å, что возможно только в том случае, если петля разорвана. Во второй молекуле также отсутствует электронная плотность для участка 172 – 182 а.о., но расстояние между этими остатками составляет 9 Å, что свидетельствует в пользу целостности петли. При такой кристаллической упаковке 50% молекул являются целостными, а вторая, чередующаяся с

ними половина, имеет разорванную петлю в участке между 172 – 182 а.о. При этом одна из петель интактной молекулы (на рис. 28 а.о. 127 – 133) находится вблизи от активного центра соседней нецелостной молекулы. Полученный результат натолкнул нас на мысль об ингибирующем влиянии этой петли. В литературе известны примеры такой авторегуляции ферментов. Так, каталитическая активность цистеиновой протеазы RipA *M. tuberculosis* ингибируется петлей собственного про-домена (Ruggiero *et al.*, 2010). Металлопротеаза *M. tuberculosis* Rv3717 обладает подвижной β -шпилькой, которая частично закупоривает активный центр фермента, выполняя таким образом регуляторную функцию (Kumar *et al.*, 2013). То же наблюдается и в структуре фермента AmiB *E.coli*: блокировка активности фермента осуществляется собственным авторегуляторным доменом (Yang *et al.*, 2012). К тому же вопрос о регуляции активности фермента Л5 в периплазме *Lysobacter* sp. XL1 всегда вставал перед нами. Для поиска доказательств функциональной роли обсуждаемой петли был проведен ингибиторный анализ белка Л5 с синтезированными пептидами, соответствующими разной длине этой петли. Однако ингибирующего эффекта выявлено не было, что может быть связано с плотной упаковкой белка Л5, в результате чего довольно крупные молекулы пептидов не смогли проникнуть к активному центру.

Также мы предположили, что плотная упаковка молекул белка Л5 может быть обусловлена способностью к формированию амилоидоподобных структур. Методами электронной микроскопии и дифракции рентгеновских лучей было показано наличие таких структур в препарате белка Л5, полученном из везикул *Lysobacter* sp. XL1. Способность формировать амилоиды объясняет, почему при накоплении белка Л5 в периплазме в процессе секреции и формирования везикул не происходит гидролиза собственного пептидогликана. Это также подтверждает данные иммуноцитохимических исследований о концентрировании белка Л5 в определенных локусах с внутренней стороны внешней мембраны. И, возможно, именно формирование амилоидоподобных структур объясняет способность белка Л5 выступать в качестве фактора везикулообразования.

Сравнительная характеристика изучаемых белков подтвердила их структурную идентичность с α -литической протеазой *L. enzymogenes*, которая составила 84% для белка Л1 и 60% для белка Л5. Между собой белки Л1 и Л5 идентичны на 63%. Данные исследования выявили ряд заметных особенностей в структуре белка Л5: выделяются домены, отличные от эквивалентных доменов гомологов (рис. 28). Так, петля 1 имеет различия в качественном составе и длиннее на 4 а.о., а петля 2, о которой упоминалось выше, является более подвижной. В настоящее время известно ряд работ, посвященных

изучению роли петель в функционировании сериновых протеаз семейства S1 (DiBella&Scheraga 1996; Perona& Craik 1997; Hedstrom 2002; Ma *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007).

Таким образом, выявленные структурные отличия белка Л5 с его гомологами, белком Л1 *Lysobacter* sp. XL1 и α -литической протеазой *L. enzymogenes*, явились принципиальными для понимания особенностей его топогенеза и биогенеза везикул. Для α -литической протеазы *L. enzymogenes* установлено, что ингибирование зрелой формы фермента при периплазматической стадии секреции происходит собственной про-частью (Stroud *et al.*, 1977). Белок Л5, вероятно, находится в периплазме в виде амилоидов и неактивен. Более того, предположительно, амилоидообразование провоцирует и формирование везикул, возможно, из-за растущего давления на внутреннюю сторону внешней мембраны. Переход в активную форму, по-видимому, происходит уже при выходе содержимого из везикул. Обнаруженный феномен переноса везикулами неактивной формы белка напоминает хранение гормонов млекопитающих в секреторных гранулах (производное комплекса Гольджи). В секреторных гранулах гормоны также находятся в неактивной амилоидоподобной конформации, и, как только поступает сигнал к секреции из клетки, происходит активация гормонов за счет высвобождения мономерной активной формы из гранул (Maji *et al.*, 2009). Кроме того, для объяснения механизма заключения гормонов, имеющих амилоидоподобную структуру, в гранулы было сделано предположение, что взаимодействие с липидами является биологическим свойством упорядоченных структур (Gellermann *et al.*, 2005; Maji *et al.*, 2009). Это может объяснить причину взаимодействия белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1 с фосфолипидами внутренней поверхности внешней мембраны при накоплении его в периплазме, что было обнаружено нами методом электронной иммуноцитохимии. В целом, для бактерий известны так называемые функциональные амилоидоподобные упорядоченные структуры (Romero&Kolter 2014). Например, кюрли *E. coli*, необходимые для формирования биопленки; амилоидные пили *M. tuberculosis* для патогенеза; харпин *X. axonopodis* pV. glycines для фитопатогенеза; микроцин E492 *Klebsiella pneumoniae* RYC492 для регуляции своей токсической активности (Alteri *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2007; Lagos *et al.*, 2009). Однако способность бактериальных литических ферментов формировать амилоидоподобные структуры ранее не была показана.

Выявленные структурные особенности, возможно, обуславливают отличия в свойствах белков Л1 и Л5. Так, ранее было установлено, что протеолитическая активность белка Л5 на казеине выше, чем белка Л1. Для белка Л1 показано, что в пептидогликане стафилококка он гидролизует пептидные связи в межпептидном мостике, проявляя

пептидазную активность, и амидную связь между N–ацетилмурамовой кислотой и первой аминокислотой пептидной субъединицы, проявляя амидазную активность (Бегунова *и др.*, 2003). Данная специфичность характерна и для α –литической протеазы *L. enzymogenes*. Для белка Л5 также была показана способность гидролизовать пептидогликан стафилококка, но тип гидролизуемой в нем связи не был установлен (Vasilyeva *et al.*, 2014). В настоящей работе было установлено, что белок Л5 обладает Gly–Gly эндопептидазной и N–ацетилмурамоил–L–Ala амидазной активностями по отношению к пептидогликану стафилококка, как и белок Л1. Способность гидролизовать амидные связи, в которых принимает участие лишь одна аминокислота, была доказана и на синтетическом субстрате Abz–Ala–Ala–Phe–pNa. Здесь стоит отметить, что интенсивность гидролиза пептидогликана белком Л5 значительно ниже, чем белком Л1. Тогда как активность белка Л5 на казеине значительно выше, чем белка Л1. Т.е. белок Л5 является более мощной протеазой, нежели пептидогликангидролазой.

Таким образом, благодаря полученным в настоящей работе данным, можно утверждать, что на сегодняшний день литические ферменты Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 являются самыми охарактеризованными среди известных внеклеточных бактериолитических ферментов.

Важным направлением наших исследований являются биомедицинские исследования. На протяжении последних лет во всем мире отмечается рост устойчивости бактерий к антибиотикам. Всемирная организация здравоохранения считает резистентность микроорганизмов одной из приоритетных проблем современной медицины. Поэтому поиск альтернативных средств борьбы с множественноустойчивыми патогенными бактериями является актуальной задачей. Литические ферменты являются одним из таких перспективных средств.

Ранее было показано, что везикулы *Lysobacter* sp. XL1, содержащие фермент Л5, обладают широким спектром литического действия по отношению к различным микроорганизмам, в том числе и к множественноустойчивым к антибиотикам штаммам. Гомогенная форма белка Л5 не является такой эффективной (Vasilyeva *et al.*, 2014). Аналогичные результаты получены в настоящей работе: было выявлено литическое действие препарата везикул *P. fluorescens* Q2–87/B, содержащего рекомбинантный белок Л5, на грамположительные, грамотрицательные бактерии, в т.ч. метициллинустойчивый штамм *S. aureus* 55 (MRSA) и вакцинный штамм *B. anthracis* 71/12.

Также ранее было показано, что везикулы *Lysobacter* sp. XL1 обладают лечебным действием в отношении стафилококкового сепсиса и сибиреязвенной инфекции, смоделированных у мышей (Шишкова *и др.*, 2013). Однако везикулы, как и лизоамидазу,

нельзя использовать в качестве лекарственных средств для внутреннего применения из-за многокомпонентного состава. Поэтому мы начали разработку антимикробных препаратов нового поколения на основе отдельного литического фермента Л5 *Lysobacter* sp. XL1.

В данной работе были получены два лабораторных образца антимикробных препаратов: на основе литического фермента Л5, заключенного в липосомы, сформированные фосфолипидами везикул, и на основе фермента Л5 с ЭПС *Lysobacter* sp. XL1. Совместно с Государственным научным центром прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск) было выявлено сильное литическое действие сконструированных препаратов в отношении живых патогенных штаммов *B. anthracis* и *S. aureus* 55 (MRSA). При изучении лечебного действия препарата на основе ЭПС и белка Л5 *Lysobacter* sp. XL в отношении стафилококкового сепсиса, смоделированного у беспородных белых мышей, было показано снижение обсемененности почек на два порядка.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу высокой перспективности дальнейшей разработки антимикробных препаратов на основе литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1.

ВЫВОДЫ

1. Бактериолитическая протеаза Л5 *Lysobacter* sp. XL1 является фактором, обуславливающим биогенез секреторных везикул, содержащих его в своем составе. Установлена способность белка Л5 усиливать везикулообразование у рекомбинантного штамма *P. fluorescens* Q2-87/B, продуцирующего его. Это указывает на особые свойства белка Л5, способствующие биогенезу везикул.
2. Мажорным фосфолипидом везикул *Lysobacter* sp. XL1 является кардиолипид. Кардиолипид может участвовать в везикулообразовании за счет нарушения жесткости внешней мембраны в местах, обогащенных этим фосфолипидом.
3. Установлены пространственные структуры гомологичных белков Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 с разрешением 1,35 Å и 1,60 Å соответственно. Показана их структурная идентичность с α -литической протеазой *L. enzymogenes* на 84% и 60% соответственно и друг с другом на 63%. Белок Л5 обладает рядом структурных особенностей: имеет плотную кристаллическую упаковку и содержит домены, отличные от эквивалентных доменов гомологов.
4. Изучены новые свойства литической протеазы Л5 *Lysobacter* sp. XL1. Установлено, что белок Л5 обладает Gly–Gly эндопептидазной и N–ацетилмурамоил–L–Ala амидазной активностями в отношении пептидогликана стафилококка. Обнаружена способность белка Л5 к формированию амилоидоподных структур, что позволяет объяснить механизм его влияния на биогенез везикул.
5. Получены два лабораторных образца антимикробных препаратов: на основе литического фермента Л5, заключенного в липосомы, сформированные фосфолипидами везикул; и на основе фермента Л5 с экзополисахаридом *Lysobacter* sp. XL1. Показана эффективность действия препаратов на живые клетки тест–культур. Установлена перспективность дальнейшего изучения полученных антимикробных препаратов для создания лекарственных средств, эффективных против инфекций, вызванных множественноустойчивыми штаммами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бегунова Е.А., Степная О.А., Лысанская В.Я., Кулаев И.С. Специфичность действия препаратов лизоамидазы на клеточные стенки *Staphylococcus aureus* 209P // *Биохимия*. – 2003. – Т.68. – №7. – с.896 – 901.
2. Васильева Н.В., Цфасман И.М., Сузина Н.Е., Степная О.А., Кулаев И.С. Внешнемембранные везикулы *Lysobacter* sp // *Доклады Академии наук*. – 2009. – Т.426. – №2. – с.257 – 260.
3. Васильева Н.В. Роль внешнемембранных везикул в секреции бактериолитических ферментов *Lysobacter* sp: дисс. ... канд. биол. наук. Пушино, 2010 г. – 126с.
4. Грановский И.Э., Калинин А.Е., Лаптева Ю.С., Латыпов О.Р., Васильева Н.В., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С., Муранова Т.А., Красовская Л.А. Литический фермент AlpA бактерии *Lysobacter* sp. XLI, фрагмент ДНК, кодирующий литический фермент AlpA бактерии *Lysobacter* sp. XLI, и способ получения литического фермента AlpA бактерии *Lysobacter* sp. XLI // Патент РФ. – 2010. – №2407782.
5. Грановский И.Э., Калинин А.Е., Лаптева Ю.С., Латыпов О.Р., Васильева Н.В., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С., Муранова Т.А., Красовская Л.А. Литический фермент AlpB бактерии *Lysobacter* sp. XLI, фрагмент ДНК, кодирующий литический фермент AlpB бактерии *Lysobacter* sp. XLI, и способ получения литического фермента AlpB бактерии *Lysobacter* sp. XLI // Патент РФ. – 2011. – №2408725.
6. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. Киев: Наукова думка, 1982. 192 с.
7. Кудрякова И.В., Тищенко С.В., Габдулхаков А.Г., Цфасман И.М., Лысанская В.Я., Васильева Н.В. Структурно–функциональные особенности литических протеаз Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XLI // *III Пушинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»*. – 2016. – Пушино (Россия). – с.99 – 101.
8. Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Винокурова Н.Г., Шишкова Н.А., Васильева Н.В. Изучение факторов биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XLI // *Биохимия*. – 2017. – Т.82. – №4. – с.677 – 686.
9. Кулаев И.С., Степная О.А., Цфасман И.М., Черменская Т.С., Акименко В.К., Ледова Л.А., Зубрицкая Л.Г. Бактериолитический комплекс, способ его получения и штамм для осуществления способа // Патент РФ. – 2002. – №.2193063.

10. Муранова Т.А., Красовская Л. А., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С. Структурные исследования и идентификация внеклеточной бактериолитической эндопептидазы Л1 *Lysobacter* sp. XL1 // *Биохимия*. – 2004. – Т.69. – №5. – с.617 – 622.
11. Наумова И.Б. Тейхоевые кислоты в регуляции биохимических процессов у микроорганизмов // *Биохимия*. – 1978. – Т.43. – №2. – с.195 – 207.
12. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. М:БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. Т1. 694с.
13. Потехина Н.В. Тейхоевые кислоты актиномицетов и других грамположительных бактерий // *Успехи биол. химии*. – 2006. –Т.46. – с.225 – 278.
14. Степная О.А., Северин А.И., Кудрявцева А.И., Крупянко В.И., Козловский А.Г., Кулаев И.С. Ферменты бактериолитического препарата лизоамидаза. Некоторые свойства бактериолитической протеиназы Л2 // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1992. – Т.28. – №5. – с.666 – 672.
15. Степная О.А., Бегунова Е.А., Цфасман И.М., Кулаев И.С. Бактериолитический ферментный препарат лизоамидаза: выделение и некоторые физико–химические свойства внеклеточной мурамидазы бактерии *Xanthomonas* sp. // *Биохимия*. – 1996. Т.61. – №4. – с.648 – 655.
16. Степная О.А., Рязанова Л.П., Крупянко В.И., Кулаев И.С. Влияние кислого экзополисахарида *Xanthomonas campestris* ИБФМ В-124 на кинетические параметры внеклеточных бактериолитических ферментов // *Биохимия*. – 2001. – Т.66. – №6. – с.816 – 821.
17. Степная О.А., Цфасман И.М., Логвина И.А., Рязанова Л.П., Муранова Т.А., Кулаев И.С. Выделение и характеристика новой внеклеточной бактериолитической эндопептидазы *Lysobacter* sp. XL1 // *Биохимия*. – 2005. – Т.70. – №9. – с.1250 – 1257.
18. Филиппова И.Ю., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Трощенко Е.П., Степанов В.М. Новые флюоресцентные субстраты металлоэндопептидаз с внутренним тушением флюоресценции // *Биоорганическая химия*. – 1988. – Т.14. – №4. – с.467 – 471.
19. Цфасман И.М., Ситкин Б.В., Лысанская В.Я., Степная О.А., Кулаев И.С. Субстратная специфичность и некоторые физико-химические свойства автолитических ферментов бактерии *Lysobacter* sp. XL1 // *Биохимия*. – 2007. – Т.72 – с.760 – 765.

20. Шишкова Н.А., Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Цфасман И.М., Васильева Н.В. Лечебное и профилактическое действие внешнемембранных везикул, содержащих литический фермент Л5 *Lysobacter* sp. XL // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты*. – 2013. – Т.5. – с.538 – 547.
21. Acevedo R., Fernández S., Zayas C., Acosta A., Sarmiento M.E., Ferro V.A., Rosenqvist E., Campa C., Cardoso D., Garcia L., Perez J.L. Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications // *Front Immunol*. – 2014. – V.5. – p.121.
22. Ahmed K., Chohnan S., Ohashi H., Hirata T., Masaki T., Sakiyama F. Purification, bacteriolytic activity, and specificity of beta-lytic protease from *Lysobacter* sp. IB-9374 // *J Biosci Bioeng*. – 2003. – V.95. – №1. – p.27 – 34.
23. Ahn V.E., Lo E.I., Engel C.K., Chen L., Hwang P.M., Kay L.E., Bishop R.E., Privé G.G. A hydrocarbon ruler measures palmitate in the enzymatic acylation of endotoxin // *EMBO J*. – 2004. – V.23. – №15. – p.2931 – 2941.
24. Alteri C.J., Xicohténcatl-Cortes J., Hess S., Caballero-Olín G., Girón J.A., Friedman R.L. *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2007. – V.104. – №12. – p.5145 – 5150.
25. Alvarez-Martinez C.E., Christie P.J. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems // *Microbiol Mol Biol Rev*. – 2009. – V.73. – №4. – p.775 – 808.
26. Amano A., Takeuchi H., Furuta N. Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions // *Microbes Infect*. – 2010. – V.12. – №11. – p.791 – 798.
27. Ames G.F. Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structure and metabolism // *J Bacteriol*. – 1968. – V.95. – №3. – p.833 – 843.
28. Ames G.F., Spudich E.N., Nikaido H. Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccharide mutations // *J Bacteriol*. – 1974. – V.117. – №2. – p.406 – 416.
29. Anderson J. S., Matsushashi M., Haskin M. A., Strominger J. L. Lipid-phosphoacetylmuramylpentapeptide and lipid-phosphodisaccharide-pentapeptide: presumed membrane transport intermediates in cell wall synthesis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1965. – V.53. – p.881 – 889.
30. Archibald A.R., Hancock I.C., Harwood C.R. (1993) Cell wall structure, synthesis, and turnover. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics (Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R., eds.). ASM Press: Washington, DC, USA. – p.381 – 410.

31. Avila–Calderón E.D., Araiza–Villanueva M.G., Cancino–Diaz J.C., Lopez–Villegas E.O., Sriranganathan N., Boyle S.M., Contreras–Rodríguez A. Roles of bacterial membrane vesicles // *Arch Microbiol.* – 2015. – V.197. – №1. – p.1 – 10.
32. Bachovchin W.W. 15N NMR spectroscopy of hydrogen–bonding interactions in the active site of serine proteases: evidence for a moving histidine mechanism // *Biochemistry.* – 1986. – V.25. – №23. – p.7751 – 7759.
33. Balsalobre C., Silvan J.M., Berglund S., Mizunoe Y., Uhlin B.E., Wai S.N. Release of the type I secreted α –haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli* // *Mol Microbiol.* – 2006. – V.59. – №1. – p.99 – 112.
34. Barrett A. J. Classification of peptidases // *Methods Enzymol.* – 1994. – V.244. – p.1 – 15.
35. Bauman S.J., Kuehn M.J. Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL–8 response // *Microbes Infect.* – 2006. – V.8. – №9–10. – p.2400 – 2408.
36. Baumgarten T., Sperling S., Seifert J., von Bergen M., Steiniger F., Wick L.Y., Heipieper H.J. Membrane vesicle formation as a multiple–stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT–T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation // *Appl Environ Microbiol.* – 2012. – V.78. – №17. – p.6217 – 6224.
37. Beveridge T.J., Murray R.G. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis* // *J Bacteriol.* – 1980. – V.141. – №2. – p.876 – 887.
38. Beveridge T.J. Structures of gram–negative cell walls and their derived membrane vesicles // *J Bacteriol.* – 1999. – V.181. – №16. – p.4725 – 4733.
39. Biswas R., Voggu L., Simon U.K., Hentschel P., Thumm G., Gotz F. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl // *FEMS Microbiol Lett.* – 2006. – V.259. – №2. – p.260 – 268.
40. Black P.N., Said B., Ghosn C.R., Beach J.V., Nunn W.D. Purification and characterization of an outer membrane–bound protein involved in long–chain fatty acid transport in *Escherichia coli* // *J Biol Chem.* – 1987. – V.262. – №3. – p.1412 – 1419.
41. Blanco L.P., Evans M.L., Smith D.R., Badtke M.P., Chapman M.R. Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids // *Trends Microbiol.* – 2012. – V.20. – №2. – p.66 – 73.
42. Blankenship E., Vukoti K., Miyagi M., Lodowski D.T. Conformational flexibility in the catalytic triad revealed by the high–resolution crystal structure of *Streptomyces erythraeus* trypsin in an unliganded state // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2014. – V.70. – №Pt 3. – p.833 – 840.

43. Bone R., Shenvi A.B., Kettner C.A., Agard D.A. Serine protease mechanism: structure of an inhibitory complex of alpha-lytic protease and a tightly bound peptide boronic acid // *Biochemistry*. – 1987. – V.26. – №24. – p.7609 – 7614.
44. Bone R., Frank D., Kettner C.A., Agard D.A. Structural analysis of specificity: alpha-lytic protease complexes with analogues of reaction intermediates // *Biochemistry*. – 1989. – V.28. – №19. – p.7600 – 7609.
45. Bonnington K.E., Kuehn M.J. Protein selection and export via outer membrane vesicles // *Biochim Biophys Acta*. – 2014. – V.1843. – №8. – p.1612 – 1619.
46. Bos M.P., Robert V., Tommassen J. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane // *Annu Rev Microbiol*. – 2007. – V.61. – p.191 – 214.
47. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem*. – 1976. – V.72. – p.248 – 254.
48. Braun V., Bosch V. Sequence of the murein-lipoprotein and the attachment site of the lipid // *Eur J Biochem*. – 1972. – V.28. – №1. – p.51 – 69.
49. Brown S., Santa Maria JP. Jr., Walker S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria // *Annu Rev Microbiol*. – 2013. – V.67. – p.313 – 336.
50. Brown L., Wolf J.M., Prados-Rosales R., Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi // *Nat Rev Microbiol*. – 2015. – V.13. – №10. – p.620 – 630.
51. Brüser T., Sanders C. An alternative model of the twin arginine translocation system // *Microbiol Res*. – 2003. – V.158. – №1. – p.7 – 17.
52. Burge R.E., Fowler A.G., Reaveley D.A. Structure of the peptidoglycan of bacterial cell walls // *J Mol Biol*. – 1977. – V.117 – №4. – p.927 – 953.
53. Büttner F.M., Zoll S., Nega M., Götz F., Stehle T. Structure-function analysis of *Staphylococcus aureus* amidase reveals the determinants of peptidoglycan recognition and cleavage // *J Biol Chem*. – 2014. – V.289. – №16. – p.11083 – 11094.
54. Callewaert L., Michiels C.W. Lysozymes in the animal kingdom // *J Biosci*. – 2010. – V.35. – №1. – p.127 – 160.
55. Calmettes C., Judd A., Moraes T.F. Structural Aspects of Bacterial Outer Membrane Protein Assembly // *Adv Exp Med Biol*. – 2015. – V.883. – p.255 – 270.
56. Carlos J.L., Paetzel M., Brubaker G., Karla A., Ashwell C.M., Lively M.O., Cao G., Bullinger P., Dalbey R.E. The role of the membrane-spanning domain of type I signal peptidases in substrate cleavage site selection // *J Biol Chem*. – 2000. – V.275. – №49. – p.38813 – 38822.

57. Carrasco-López C., Rojas-Altuve A., Zhang W., Heseck D., Lee M., Barbe S., André I., Ferrer P., Silva-Martin N., Castro G.R., Martínez-Ripoll M., Mobashery S., Hermoso J.A. Crystal structures of bacterial peptidoglycan amidase AmpD and an unprecedented activation mechanism // *J Biol Chem.* – 2011. – V.286. – №36. – p.31714 – 31722.
58. Cavalier-Smith T. Rooting the tree of life by transition analyses // *Biol Direct.* – 2006. – V.1. – p.19.
59. Chan L., Glaser L. Purification of N-acetylmuramic acid-L-alanine amidase from *Bacillus megaterium* // *J Biol Chem.* – 1972. – V.247. – №17. – p.5391 – 5397.
60. Chapot-Chartier M.P., Kulakauskas S. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria // *Microb Cell Fact.* – 2014. – V.13 Suppl 1. – S9.
61. Chatterjee S.N., Das J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholera* // *J Gen Microbiol.* – 1967. – V.49. – №1. – p.1 – 11.
62. Chatzi K.E., Sardis M.F., Economou A., Karamanou S. SecA-mediated targeting and translocation of secretory proteins // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – V.1843. – №8. – p.1466 – 1474.
63. Chen Y., Pan X., Tang Y., Quan S., Tai P.C., Sui S.F. Full-length *Escherichia coli* SecA dimerizes in a closed conformation in solution as determined by cryo-electron microscopy // *J Biol Chem.* – 2008. – V.283. – №43. – p.28783 – 28787.
64. Choi D.S., Kim D.K., Choi S.J., Lee J., Choi J.P., Rho S., Park S.H., Kim Y.K., Hwang D., Gho Y.S. Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* // *Proteomics.* – 2011. – V.11. – №16. – p.3424 – 3429.
65. Chowdhury C., Jagannadham M.V. Virulence factors are released in association with outer membrane vesicles of *Pseudomonas syringae* pv. Tomato T1 during normal growth // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – V.1834. – №1. – p.231 – 239.
66. Christensen P., Cook F.D. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio // *Int J Syst Bacteriol.* – 1978. – V.28. – №3. – p.367 – 393.
67. Christie PJ. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines // *Mol Microbiol.* – 2001. – V.40. – №2. – p.294 – 305.
68. Cimmino A., Puopolo G., Perazzolli M., Andolfi A., Melck D., Pertot I., Evidente A. Cyclo(L-PRO-L-TYR), the fungicide isolated from *Lysobacter capsici* AZ78: A structure-activity relationship study // *Chemistry of Heterocyclic Compounds.* – 2014. – V.50. – №2. – p.290 – 295.

69. Ciofu O., Beveridge T.J., Kadurugamuwa J., Walther-Rasmussen J., Høiby N. Chromosomal β -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa* // *J Antimicrob Chemother.* – 2000. – V.45. – №1. – p.9 – 13.
coli strain 2787 (O126–H27) // *Infect. Immun.* – 1992. – V.60. – №1. – p. 13 – 18.
70. Costa T.R., Felisberto-Rodrigues C., Meir A., Prevost M.S., Redzej A., Trokter M., Waksman G. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights // *Nat Rev Microbiol.* – 2015. – V.13. – №6. – p.343 – 359.
71. Cryz S.J. Jr., Pitt T.L., Furer E., Germanier R. Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa* // *Infect Immun.* – 1984. – V.44. – №2. – p.508 – 513.
72. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents // *Nature reviews Drug discovery.* – 2003. – V.2 – №2. – p.114 – 122.
73. Deatherage B.L., Lara J.C., Bergsbaken T., Rassouljian Barrett S.L., Lara S., Cookson B.T. Biogenesis of bacterial membrane vesicles // *Mol. Microbiol.* – 2009. – V.72. – №6. – p.1395 – 1407.
74. Deatherage B.L., Cookson B.T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life // *Infect Immun.* – 2012. – V.80. – №6. – p.1948 – 1957.
75. de Bruijn I., Cheng X., de Jager V., Expósito R.G., Watrous J., Patel N., Postma J., Dorrestein P.C., Kobayashi D., Raaijmakers J.M. Comparative genomics and metabolic profiling of the genus *Lysobacter* // *BMC Genomics.* – 2015. – V.16. – p.991.
76. de Pedro M.A., Cava F. Structural constraints and dynamics of bacterial cell wall architecture // *Front Microbiol.* – 2015. – V.6. – p.449.
77. DiBella E.E., Scheraga H.A. The role of the insertion loop around tryptophan 148 in the activity of thrombin // *Biochemistry.* – 1996. – V.35. – №14. – p.4427 – 4433.
78. Dijkstra A.J., Keck W. Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport // *J Bacteriol.* – 1996. – V.178. – №19. – p.5555 – 5562.
79. Dmitriev B.A., Toukach F.V., Schaper K.J., Holst O., Rietschel E.T., Ehlers S. Tertiary structure of bacterial murein: the scaffold model // *J Bacteriol.* – 2003. – V.185. – №11. – p.3458 – 3468.
80. Dmitriev B.A., Toukach F.V., Holst O., Rietschel E.T., Ehlers S. Tertiary structure of *Staphylococcus aureus* cell wall murein // *J Bacteriol.* – 2004. – V.186. – №21. – p.7141 – 7148.
81. Doehn J.M., Fischer K., Reppe K., Gutbier B., Tschernig T., Hocke A.C., Fischetti V.A., Löffler J., Suttorp N., Hippenstiel S., Witzenrath M. Delivery of the endolysin Cpl-1 by

- inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia // *J Antimicrob Chemother.* – 2013. – V.68. – №9. – p.2111 – 2117.
82. Dorward D.W., Garon C.F. DNA is packaged within membranederived vesicles of gram–negative but not gram–positive bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – V.56. – №6. – p.1960 – 1962.
83. Doyle R.J., Dziarski R. (2001) The bacterial cell: Peptidoglycan. In: Molecular medical microbiology (Sussman M. ed). Academic Press: London, UK. – p.137 – 153.
84. Dufresne K., Paradis–Bleau C. Biology and Assembly of the Bacterial Envelope // *Adv Exp Med Biol.* – 2015. – V.883. – p.41 – 76.
85. Durand E., Cambillau C., Cascales E., Journet L. VgrG, Tae, Tle, and beyond: the versatile arsenal of Type VI secretion effectors // *Trends Microbiol.* – 2014. – V.22. – №9. – p.498 – 507.
86. Dwyer M.A., Hellinga H.W. Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering // *Curr Opin Struct Biol.* – 2004. – V.14. – №4. – p.495 – 504.
87. Eckert C., Lecerf M., Dubost L., Arthur M., Mesnage S. Functional analysis of AtlA, the major N–acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis* // *J Bacteriol.* – 2006. – V.188. – №24. – p.8513 – 8519.
88. Ekici O.D., Paetzel M., Dalbey R.E. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration // *Protein Sci.* – 2008. – V.17. – №12. – p.2023 – 2037.
89. Ellen A.F., Albers S.V., Huibers W., Pitcher A., Hobel C.F., Schwarz H., Folea M., Schouten S., Boekema E.J., Poolman B., Driessen A.J. Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus species* reveals the presence of endosome sorting complex components // *Extremophiles.* – 2009. – V.13. – №1. – p.67 – 79.
90. Ellen A.F., Zolghadr B., Driessen A.M. Albers S.V. Shaping the archaeal cell envelope // *Archaea.* – 2010. – V.2010. – p.608243.
91. Ellermeier C.D., Hobbs E.C., Gonzalez–Pastor J.E., Losick R. A three–protein signaling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin // *Cell.* – 2006. – V.124. – №3. – p.549 – 559.
92. Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles // *Microbiol Mol Biol. Rev.* – 2010. – V.74. – №1. – p.81 – 94.
93. Entenza J.M., Loeffler J.M., Grandgirard D., Fischetti V.A., Moreillon P. Therapeutic effects of bacteriophage Cpl–1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2005. – V.49. – №11. – p.4789 – 4792.

94. Errington J. L-form bacteria, cell walls and the origins of life // *Open Biol.* – 2013. – V.3. – №1. – p.120143.
95. Evans A.G., Davey H.M., Cookson A., Currinn H., Cooke-Fox G., Stanczyk P.J., Whitworth D.E. Predatory activity of *Myxococcus xanthus* outer-membrane vesicles and properties of their hydrolase cargo // *Microbiology.* – 2012. – V.158. – №Pt11. – p.2742 – 2752.
96. Farris M.H., Steinberg A.D. Mitrecin A, an endolysin-like bacteriolytic enzyme from a newly isolated soil streptomycete // *Lett Appl Microbiol.* – 2014. – V.58. – №5. – p.493 – 502.
97. Feng L., Jia X.B., Shi F., Chen Y. Identification of two polysaccharides from *Prunella vulgaris* L. and evaluation on their anti-lung adenocarcinoma activity // *Molecules.* – 2010. – V.15. – №8. – p.5093 – 5103.
98. Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions // *Proc. R. Soc.* – 1922. – V.93. – №653. – p.306 – 317.
99. Fletcher E.L., Fleiszig S.M., Brennan N.A. Lipopolysaccharide in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the cornea and contact lenses // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1993. – V.34. – №6. – p.1930 – 1936.
100. Fokine A., Miroshnikov K.A., Shneider M.M., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. Structure of the bacteriophage phi KZ lytic transglycosylase gp144 // *J Biol Chem.* – 2008. – V.283. – №11. – p.7242 – 7250.
101. Folman L.B., Postma J., van Veen J.A. Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber // *Microbiol Res.* – 2003. – V.158. – №2. – p.107 – 115.
102. Forster B.M., Marquis H. Protein transport across the cell wall of monoderm Gram-positive bacteria // *Mol Microbiol.* – 2012. – V.84. – №3. – p.405 – 413.
103. Fuhrmann C.N., Kelch B.A., Ota N., Agard D.A. The 0.83 Å resolution crystal structure of alpha-lytic protease reveals the detailed structure of the active site and identifies a source of conformational strain // *J Mol Biol.* – 2004. – V.338. – №5. – p.999 – 1013.
104. Fujishige A., Smith K.R., Silen J.L., Agard D.A. Correct folding of alpha-lytic protease is required for its extracellular secretion from *Escherichia coli* // *J Cell Biol.* – 1992. – V.118. – №1. – p.33 – 42.
105. Fukushima T., Yamamoto H., Atrih A., Foster S.J., Sekiguchi J. A polysaccharide deacetylase gene (pdaA) is required for germination and for production of muramic delta-lactam residues in the spore cortex of *Bacillus subtilis* // *J Bacteriol.* – 2002. – V.184. – №21. – p.6007 – 6015.

106. Fukushima T., Yao Y., Kitajima T., Yamamoto H., Sekiguchi J. Characterization of new L,D–endopeptidase gene product CwlK (previous YcdD) that hydrolyzes peptidoglycan in *Bacillus subtilis* // *Mol Genet Genomics*. – 2007. – V.278. – №4. – p.371 – 383.
107. Galán J.E., Wolf–Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines // *Nature*. – 2006. – V.444. – №7119. – p.567 – 573.
108. Galán J.E, Lara–Tejero M., Marlovits T.C., Wagner S. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells // *Annu Rev Microbiol*. – 2014. – V.68. – p.415 – 438.
109. Gally D.L., Hancock I.C., Harwood C.R., Archibald A.R. Cell wall assembly in *Bacillus megaterium*: incorporation of new peptidoglycan by a monomer addition process // *J Bacteriol*. – 1991. – V.173. – №8. – p.2548 – 2555.
110. Garcia P., Gonzalez M.P., Garcia E., Lopez R., Garcia J.L. LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation // *Mol Microbiol*. – 1999a. – V.31. – №4. – p.1275 – 1281.
111. García P., González M.P., García E., García J.L., López R. The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains // *Mol. Microbiol*. – 1999b. – V.33. – №1. – p.128 – 138.
112. Gaudin M., Gaudiard E., Schouten S., Houel–Renault L., Lenormand P., Marguet E., Forterre P. Hyperthermophilic archaea produce membrane vesicles that can transfer DNA // *Environ Microbiol Rep*. – 2013. – V.5. – №1. – p.109 – 116.
113. Gellermann G.P., Appel T.R., Tannert A., Radestock A., Hortschansky P., Schroeckh V., Leisner C., Lütkepohl T., Shtrasburg S., Röcken C., Pras M., Linke R.P., Diekmann S., Fändrich M. Raft lipids as common components of human extracellular amyloid fibrils // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2005. – V.102. – №18. – p.6297 – 6302.
114. Ghuysen J.M., Tipper D.T., Strominger J.L. (1966). Enzymes that degrade bacterial cell wall. In: *Methods in Enzymology*. (Colowick S.P., Kaplan N.O. eds). Acad. Press.: New York., USA. – V.8. – p.685 – 699.
115. Ghuysen J.M. Serine beta–lactamases and penicillin–binding proteins // *Annu Rev Microbiol*. – 1991. – V.45. – p.37 – 67.
116. Gillespie D.C., Cook F.D. Extracellular enzymes from strains of *Sorangium* // *Can J Microbiol*. – 1965. – V.11. – p.109 – 118.
117. Glauner B., Höltje J.V. Growth pattern of the murein sacculus of *Escherichia coli* // *J Biol Chem*. – 1990. – V.265. – №31. – p.18988 – 18996.
118. Gökçen A., Vilcinskis A., Wiesner J. Biofilm–degrading enzymes from *Lysobacter gummosus* // *Virulence*. – 2014. – V.5. – №3. – p.378 – 387.

119. Gram H. C. Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten// *Fortschr Med.(in German)*. – 1884. – V.2. – p.185 – 189.
120. Grandgirard D., Loeffler J.M., Fischetti V.A., Leib S.L. Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis // *J Infect Dis*. – 2008. – V.197. – №11. – p.1519 – 1522.
121. Grenier D., Mayrand D. Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis* // *Infect Immun*. – 1987. – V.55. – №1. – p.111 – 117.
122. Griffiths G. Cell evolution and the problem of membrane topology // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2007. – V.8. – №12. – p.1018 – 1024.
123. Guan R., Brown P.H., Swaminathan C.P., Roychowdhury A., Boons G.J., Mariuzza R.A. Crystal structure of human peptidoglycan recognition protein I alpha bound to a muramyl pentapeptide from Gram-positive bacteria // *Protein Sci*. – 2006. – V.15. – №5. – p.1199 – 1206.
124. Guiral S., Mitchell T.J., Martin B., Claverys J.P. Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2005. – V.102. – №24. – p.8710 – 8715.
125. Gujrati V., Kim S., Kim S.H., Min J.J., Choy H.E., Kim S.C., Jon S. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy // *ACS Nano*. – 2014. – V.8. – №2. – p.1525 – 1537.
126. Gupta R.S. The natural evolutionary relationships among prokaryotes // *Crit Rev Microbiol*. – 2000. – V.26. – №2. – p.111 – 131.
127. Gupta R., Prasad Y. P-27/HP endolysin as antibacterial agent for antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* of human infections // *Curr Microbiol*. – 2011a. – V.63. – №1. – p.39 – 45.
128. Gupta R.S. Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2011b. – V.100. – №2. – p.171 – 182.
129. Gurung M., Moon D.C., Choi C.W., Lee J.H., Bae Y.C., Kim J., Lee Y.C., Seol S.Y., Cho D.T., Kim S.I., Lee J.C. *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death // *PLoS One*. – 2011. – V.6. – №11. – e27958.
130. Hancock R. E. W., Worobec E. A. (1998) Outer Membrane Proteins. In *Biotechnology Handbooks: Pseudomonas* (Montie Th.C., ed.). Plenum Press: New-York, USA. – p. 139 – 167.

131. Haurat M.F., Aduse Opoku J., Rangarajan M., Dorobantu L., Gray M.R., Curtis M.A., Feldman M.F. Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles // *J Biol Chem.* – 2011. – V.286. – №2. – p.1269 – 1276.
132. Hayashi J., Hamada N., Kuramitsu H.K. The autolysin of *Porphyromonas gingivalis* is involved in outer membrane vesicle release // *FEMS Microbiol Lett.* – 2002. – V.216. – №2. – p.217 – 222.
133. Hayhurst E.J., Kailas L., Hobbs J.K., Foster S.J. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – V.105 – №38. – p.14603 – 14608.
134. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity // *Chem Rev.* – 2002. – V.102. – №12. – p.4501 – 4524.
135. Heidrich C., Templin M.F., Ursinus A., Merdanovic M., Berger J., Schwarz H., de Pedro M.A., Höltje J.V. Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli* // *Mol Microbiol.* – 2001. – V.41. – №1. – p.167 – 178.
136. Henderson T.A., Templin M., Young K.D. Identification and cloning of the gene encoding penicillin-binding protein 7 of *Escherichia coli* // *J Bacteriol.* – 1995. – V.177. – №8. – p.2074 – 2079.
137. Heilmann C., Hussain M., Peters G., Gotz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface // *Mol Microbiol.* – 1997. – V.24. – №5. – p.1013 – 1024.
138. Hinsia S.M., Espinosa-Urgel M., Ramos J.L., O'Toole G.A. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein // *Mol Microbiol.* – 2003. – V.49. – №4. – p.905 – 918.
139. Hoekstra D., van der Laan J.W., de Leij L., Witholt B. Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli* // *Biochim Biophys Acta.* – 1976. – V.455. – №3. – p.889 – 899.
140. Holst J., Martin D., Arnold R., Huergo C.C., Oster P., O'Hallahan J., Rosenqvist E. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis* // *Vaccine.* – 2009. – V.27 Suppl 2. – B3 – 12.
141. Holtje J.V., Tomasz A. Lipoteichoic acid: a specific inhibition of autolysin in *Pneumococcus* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1975. – V.72. – №5. – p.1690 – 1694.
142. Höltje J.V., Tuomanen E.I. The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections in vivo // *J Gen Microbiol.* – 1991. – V.137. – №3. – p.441 – 454.

143. Höltje J.V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli* // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 1998. – V.62. – №1. – p.181 – 203.
144. Horstman A.L., Kuehn M.J. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles // *J Biol Chem.* – 2000. – V.275. – №17. – p.12489 – 12496.
145. Horstman A.L., Kuehn M.J. Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway // *J Biol Chem.* – 2002. – V.277. – №36. – p.32538 – 32545.
146. Hunkapiller M.W., Forgac M.D., Richards J.H. Mechanism of action of serine proteases: tetrahedral intermediate and concerted proton transfer // *Biochemistry.* – 1976. – V.15. – №25. – p.5581 – 5588.
147. Inagaki S., Onishi S., Kuramitsu H.K., Sharma A. *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by «*Tannerella forsythia*» // *Infect. Immun.* – 2006. – V.74. – №9. – p.5023 – 5028.
148. Ishikawa S., Yamane K., Sekiguchi J. Regulation and characterization of a newly deduced cell wall hydrolase gene (cwlJ) which affects germination of *Bacillus subtilis* spores // *J Bacteriol.* – 1998. – V.180. – №6. – p.1375 – 1380.
149. Iversen O.J., Grov A. Studies of lysostaphin. Separation and characterization on three enzymes // *Eur J Biochem.* – 1973. – V.38. – №2. – p.293 – 300.
150. Jacob F. Fuerst C.R. The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria // *J Gen Microbiol.* – 1958. – V.18. – №2. – p.518 – 526.
151. Jacobs C., Joris B., Jamin M., Klarsov K., Van Beeumen J., Mengin-Lecreux D., van Heijenoort J., Park J.T., Normark S., Frère J.M. AmpD, essential for both beta-lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase // *Mol Microbiol.* – 1995. – V.15. – №3. – p.553 – 559.
152. Jiang J., Daniels B.V., Fu D. Crystal structure of AqpZ tetramer reveals two distinct Arg-189 conformations associated with water permeation through the narrowest constriction of the water-conducting channel // *J Biol Chem.* – 2006. – V.281. – №1. – p.454 – 460.
153. Jun S.Y., Jung G.M., Yoon S.J., Oh M.D., Choi Y.J., Lee W.J., Kong J.C., Seol J.G., Kang S.H. Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1 // *Int J Antimicrob Agents.* – 2013. – V.41. – №2. – p.156 – 161.
154. Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to

- gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion // *J Bacteriol.* – 1995. – V.177. – №14. – p.3998–4008.
155. Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics // *J Bacteriol.* – 1996. – V.178. – №10. – p.2767 – 2774.
156. Kadurugamuwa J.L., Beveridge TJ Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release // *J Antimicrob Chemother.* – 1997. – V.40. – №5. – p.615 – 621.
157. Kadurugamuwa J.L., Mayer A., Messner P., Sára M., Sleytr U.B., Beveridge T.J. S-layered *Aneurinibacillus* and *Bacillus* spp. are susceptible to the lytic action of *Pseudomonas aeruginosa* membrane vesicles // *J Bacteriol.* – 1998. – V.180. – №9. – p.2306 – 2311.
158. Kamaguchi A., Nakayama K., Ichiyama S., Nakamura R., Watanabe T., Ohta M., Baba H., Ohyama T. Effect of *Porphyromonas gingivalis* vesicles on coaggregation of *Staphylococcus aureus* to oral microorganisms // *Curr. Microbiol.* – 2003. – V.47. – №6. – p.485 – 491.
159. Kaparakis–Liaskos M., Ferrero R.L. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles // *Nat Rev Immunol.* – 2015. – V.15. – №6. – p.375 – 387.
160. Karkhanis Y.D., Zeltner J.Y., Jackson J.J., Carlo, D.J. A new and improved microassay to determine 2–keto–3–deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram–negative bacteria // *Anal Biochem.* – 1978. – V.85. – №2. – p.595 – 601.
161. Kato A., Nakaya S., Kokubo N., Aiba Y., Ohashi Y., Hirata H., Fujii K., Harada K. A new anti–MRSA antibiotic complex, WAP–8294A. I. Taxonomy, isolation and biological activities // *J Antibiot (Tokyo).* – 1998. – V.51. – №10. – p.929 – 935.
162. Kato S., Kowashi Y., Demuth D.R. Outer membrane–like vesicles secreted by *Acinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin // *Microb Pathog.* – 2002. – V.32. – №1. – p.1 – 13.
163. Keller S., Sanderson M.P., Stoeck A., Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function // *Immunol. Lett.* – 2006. – V.107. – №2. – p.102 – 108.
164. Kessler E. (2013) β –Lytic Metalloendopeptidase. In: Handbook of Proteolytic Enzymes (Rawlings N.D., Salvesen G.S., eds). Academic Press: Oxford, UK. – p.1550 – 1553.
165. Kesty N.C., Kuehn M.J. Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles // *J Biol Chem.* – 2004. – V.279. – №3. – p.2069 – 2076.

166. Kintz E., Goldberg J.B. Regulation of lipopolysaccharide O antigen expression in *Pseudomonas aeruginosa* // *Future Microbiol.* – 2008. – V.3. – №2. – p.191 – 203.
167. Kleinschmidt J.H., Tamm L.K. Secondary and tertiary structure formation of the beta-barrel membrane protein OmpA is synchronized and depends on membrane thickness // *J Mol Biol.* – 2002. – V.324. – №2. – p.319 – 330.
168. Ko H.S., Jin R.D., Krishnan H.B., Lee S.B., Kim K.Y. Biocontrol ability of *Lysobacter antibioticus* HS124 against *Phytophthora blight* is mediated by the production of 4-hydroxyphenylacetic acid and several lytic enzymes // *Curr Microbiol.* – 2009. – V.59. – №6. – p.608 – 615.
169. Kobayashi H., Uematsu K., Hirayama H., Horikoshi K. Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism // *J Bacteriol.* – 2000. – V.182. – №22. – p.6451 – 6455.
170. Koch A.L. Orientation of the peptidoglycan chains in the sacculus of *Escherichia coli* // *Res Microbiol.* – 1998. – V.149. – №10. – p.689 – 701.
171. Koopmann R., Cupelli K., Redecke L., Nass K., Deponte D.P., White T.A., Stellato F., Rehders D., Liang M., Andreasson J., Aquila A., Bajt S., Barthelmess M., Barty A., Bogan M.J., Bostedt C., Boutet S., Bozek J.D., Caleman C., Coppola N., Davidsson J., Doak R.B., Ekeberg T., Epp S.W., Erk B., Fleckenstein H., Foucar L., Graafsma H., Gumprecht L., Hajdu J., Hampton C.Y., Hartmann A., Hartmann R., Hauser G., Hirsemann H., Holl P., Hunter M.S., Kassemeyer S., Kirian R.A., Lomb L., Maia F.R., Kimmel N., Martin A.V., Messerschmidt M., Reich C., Rolles D., Rudek B., Rudenko A., Schlichting I., Schulz J., Seibert M.M., Shoeman R.L., Sierra R.G., Soltau H., Stern S., Strüder L., Timneanu N., Ullrich J., Wang X., Weidenspointner G., Weierstall U., Williams G.J., Wunderer C.B., Fromme P., Spence J.C., Stehle T., Chapman H.N., Betzel C., Duszenko M. In vivo protein crystallization opens new routes in structural biology // *Nat Methods.* – 2012. – V.9. – №3. – p.259 – 262.
172. Koplow J., Goldfine H. Alterations in the outer membrane of the cell envelope of heptose-deficient mutants of *Escherichia coli* // *J Bacteriol.* – 1974. – V.117. – №2. – p.527 – 543.
173. Koraimann G. Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of gram-negative bacteria // *Cell Mol Life Sci.* – 2003. – V.60. – №11. – p.2371 – 2388.
174. Korndorfer I.P., Danzer J., Schmelcher M., Zimmer M., Skerra A., Loessner M.J. The crystal structure of the bacteriophage PSA endolysin reveals a unique fold responsible for specific recognition of *Listeria cell walls* // *J Mol Biol.* – 2006. – V.364. – №4. – p.678 – 689.

175. Koronakis V., Koronakis E., Hughes C. Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes // *EMBO J.* – 1989. – V.8. – №2. – p.595 – 605.
176. Kraft A.R., Templin M.F., Holtje J.V. Membrane-bound lytic endotransglycosylase in *Escherichia coli* // *J Bacteriol.* – 1998. – V.180. – №13. – p.3441 – 3447.
177. Kudryakova I.V., Suzina N.E., Vasilyeva N.V. Biogenesis of *Lysobacter* sp. XL1 vesicles // *FEMS Microbiol Lett.* – 2015. – V.362. – №18. – fmv137.
178. Kudryakova I.V., Shishkova N.A., Vasilyeva N.V. Outer membrane vesicles of *Lysobacter* sp. XL1: biogenesis, functions, and applied prospects // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2016. – V.100. – №11. – p.4791 – 4801.
179. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction // *Genes Dev.* – 2005. – V.19. – №22. – p.2645 – 2655.
180. Kulkarni H.M., Swamy Ch.V., Jagannadham M.V. Molecular characterization and functional analysis of outer membrane vesicles from the antarctic bacterium *Pseudomonas syringae* suggest a possible response to environmental conditions // *J Proteome Res.* – 2014. – V.13. – №3. – p.1345 – 1358.
181. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles // *Annu Rev Microbiol.* – 2010. – V.64. – p.163 – 184.
182. Kumar A., Kumar S., Kumar D., Mishra A., Dewangan R.P., Shrivastava P., Ramachandran S., Taneja B. The structure of Rv3717 reveals a novel amidase from *Mycobacterium tuberculosis* // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2013. – V.69. – №Pt 12. – p.2543 – 2554.
183. Kunsmann L., Rüter C., Bauwens A., Greune L., Glüder M., Kemper B., Fruth A., Wai S.N., He X., Llobes R., Schmidt M.A., Dobrindt U., Mellmann A., Karch H., Bielaszewska M. Virulence from vesicles: Novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain // *Sci Rep.* – 2015. – V.5. – p.13252.
184. Lache M., Hearn W.R., Zyskind J.W., Tipper D.J., Strominger J.L. Specificity of a bacteriolytic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* // *J Bacteriol.* – 1969. – V.100. – №1. – p. 254 – 259.
185. Ladant D., Ullmann A. *Bordatella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents // *Trends Microbiol.* – 1999. – V.7. – №4. – p.172 – 176.
186. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V.227. – №5259. – p.680 – 685.

187. Lagos R., Tello M., Mercado G., García V., Monasterio O. Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin // *Curr Pharm Biotechnol.* – 2009. – V.10. – №1. – p.74 – 85.
188. Lai M.J., Lin N.T., Hu A., Soo P.C., Chen L.K., Chen L.H., Chang K.C. Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage ϕ AB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2011. – V.90. – №2. – p.529 – 539.
189. Lake J.A. Evidence for an early prokaryotic endosymbiosis // *Nature.* – 2009. – V.460. – №7258. – p.967 – 971.
190. Lappann M., Otto A., Becher D., Vogel U. Comparative proteome analysis of spontaneous outer membrane vesicles and purified outer membranes of *Neisseria meningitidis* // *J Bacteriol.* – 2013. – V.195. – №19. – p.4425 – 4435.
191. Lapteva Y.S., Zolova O.E., Shlyapnikov M.G., Tsfasman I.M., Muranova T.A., Stepnaya O.A., Kulaev I.S., Granovsky I.E. Cloning and expression analysis of genes encoding lytic endopeptidases L1 and L5 from *Lysobacter* sp. strain XL1 // *Appl Environ Microbiol.* – 2012. – V.78. – №19. – p.7082 – 7089.
192. Laskar A., Rodger E.J., Chatterjee A., Mandal C. Modeling and structural analysis of PA clan serine proteases // *BMC Res Notes.* – 2012. – V.5. – p.256.
193. Lee E.Y., Bang J.Y., Park G.W., Choi D.S., Kang J.S., Kim H.J., Park K.S., Lee J.O., Kim Y.K., Kwon K.H., Kim K.P., Gho Y.S. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* // *Proteomics.* – 2007. – V.7. – №17. – p.3143 – 3153.
194. Lee E.Y., Choi D.S., Kim K.P., Gho Y.S. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles // *Mass Spectrom Rev.* – 2008. – V.27. – №6. – p.535 – 555.
195. Lee E.Y., Choi D.Y., Kim D.K., Kim J.W., Park J.O., Kim S., Kim S.H., Desiderio D.M., Kim Y.K., Kim K.P., Gho Y.S. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles // *Proteomics.* – 2009. – V.9. – №24. – p.5425 – 5436.
196. Lee J.C., Lee E.J., Lee J.H., Jun S.H., Choi C.W., Kim S.I., Kang S.S., Hyun S. *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2012. – V.331. – №1. – p.17 – 24.
197. Lee D., Jang J.H., Cha S., Seo T. *Lysobacter humi* sp. nov., a novel species isolated from soil in South Korea // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2016. – doi: 10.1099/ijsem.0.001722.
198. Lewis K. Programmed death in bacteria // *Microbiol. Mol Biol Rev.* – 2000. – V.64. – №3. – p.503 – 514.

199. Li Z., Clarke A.J., Beveridge T.J. A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: subcellular distribution, potential role in cell growth and division and secretion in surface membrane vesicles // *J Bacteriol.* – 1996. – V.178 – №9. – p.2479 – 2488.
200. Li S., Norioka S., Sakiyama F. Purification, staphylolytic activity, and cleavage sites of alpha-lytic protease from *Achromobacter lyticus* // *J. Biochem.* – 1997. – V.122. – №4. – p.772 – 778.
201. Li S., Norioka S., Sakiyama F. Bacteriolytic activity and specificity of *Achromobacter* beta-lytic protease // *J Biochem.* – 1998a. – V.124. – №2. – p.332 – 339.
202. Li Z., Clarke A.J., Beveridge T.J. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria // *J Bacteriol.* – 1998b. – V.180. – №20. – p.5478 – 5483.
203. Li Y., Shi F., Li Y., Wang X. Structure and function of lipopolysaccharide lipid A in bacteria // *Wei Sheng Wu Xue Bao (in Chinese)*. – 2008. – V.48. – №6. – p.844 – 849.
204. Lindsay B., Glaser L. Characterization of the N-acetylmuramic acid L-alanine amidase from *Bacillus subtilis* // *J Bacteriol.* – 1976. – V.127. – №2. – p.803 – 811.
205. Litzinger S., Mayer C. (2010) The Murein Sacculus. In: Prokaryotic Cell Wall Compounds (Konig H., Claus H., Varma A., eds). Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, Germany. – p.3 – 52.
206. Low L.Y., Yang C., Perego M., Osterman A., Liddington R.C. Structure and lytic activity of a *Bacillus anthracis* prophage endolysin // *J Biol Chem.* – 2005. – V.280. – №42. – p.35433 – 35439.
207. Low L.Y., Yang C., Perego M., Osterman A., Liddington R. Role of net charge on catalytic domain and influence of cell wall binding domain on bactericidal activity, specificity, and host range of phage lysins // *J Biol Chem.* – 2011. – V.286. – №39. – p.34391 – 34403.
208. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J Biol Chem.* – 1951. – V.193. – №1. – p.265 – 275.
209. Ma W., Tang C., Lai L. Specificity of trypsin and chymotrypsin: loop-motion-controlled dynamic correlation as a determinant // *Biophys J.* – 2005. – V.89. – №2. – p.1183 – 1193.
210. Macdonald I.A., Kuehn M.J. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Bacteriol.* – 2013. – V.195. – №13. – p.2971 – 2981.
211. Mace J.E., Agard D.A. Kinetic and structural characterization of mutations of glycine 216 in alpha-lytic protease: a new target for engineering substrate specificity // *J Mol Biol.* – 1995. – V.254. – №4. – p.720 – 736.

212. Maji S.K., Perrin M.H., Sawaya M.R., Jessberger S., Vadodaria K., Rissman R.A., Singru P.S., Nilsson K.P., Simon R., Schubert D., Eisenberg D., Rivier J., Sawchenko P., Vale W., Riek R. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules // *Science*. – 2009. – V.325. – №5938. – p.328 – 332.
213. Malanovic N., Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. – V.1858. – №5. – p.936 – 946.
214. Malinverni J.C., Silhavy T.J. An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the gram-negative outer membrane // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2009. – V.106. – №19. – p.8009 – 8014.
215. Margot P., Pagni M., Karamata D. *Bacillus subtilis* 168 gene *lytF* encodes a gamma-D-glutamate-meso-diaminopimelate muropeptidase expressed by the alternative vegetative sigma factor, sigmaD // *Microbiology*. – 1999. – V.145. – №Pt 1. – p.57 – 65.
216. Marraffini L.A., Dedent A.C., Schneewind O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria // *Microbiol Mol Biol Rev*. – 2006a. – V.70. – №1. – p.192 – 221.
217. Marraffini L.A., Schneewind O. Targeting proteins to the cell wall of sporulating *Bacillus anthracis* // *Mol Microbiol*. – 2006b. – V.62. – №5. – p.1402 – 1417.
218. Mashburn-Warren L.M., Whiteley M. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes // *Mol Microbiol*. – 2006. – V.61. – №4. – p.839 – 846.
219. Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication // *J. Proteomics*. – 2010. – V.73. – №10. – p.1907 – 1920.
220. Mauel C., Bauduret A., Chervet C., Beggah S., Karamata D. In *Bacillus subtilis* 168, teichoic acid of the cross-wall may be different from that of the cylinder: a hypothesis based on transcription analysis of tag genes // *Microbiology*. – 1995. – V.141. – №Pt 10. – p.2379 – 2389.
221. Mazmanian S.K., Skaar E.P., Gaspar A.H., Humayun M., Gornicki P., Jelenska J., Joachmiak A., Missiakas D.M., Schneewind O. Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus* // *Science*. – 2003. – V.299. – №5608. – p.906 – 909.
222. McBroom A.J., Kuehn M.J. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response // *Mol Microbiol*. – 2007. – V.63. – №2. – p.545 – 558.
223. Meroueh S.O., Bencze K.Z., Hesek D., Lee M., Fisher J.F., Stemmler T.L., Mobashery S. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. – V.103. – №12. – p.4404 – 4409.

224. Mirus O., Hahn A., Schleiff E. (2010) Outer Membrane Proteins. In: Procaryotic Cell Wall Compounds (Konig H., Varma A., Claus H., eds). Springer–Verlag: Berlin, Heidelberg, Germany. – p. 175 – 228.
225. Moon D.C., Choi C.H., Lee J.H., Choi C.W., Kim H.Y., Park J.S., Kim S.I., Lee J.C. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles // *J Microbiol.* – 2012. – V.50. – №1. – p.155 – 160.
226. Mori H., Ito K. The Sec protein–translocation pathway // *Trends Microbiol.* – 2001. – V.9. – №10. – p.494 – 500.
227. Nakae T. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: reconstitution of sucrose–permeable membrane vesicles // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1975. – V.64. – №4. – p.1224 – 1230.
228. Nikaido H., Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability // *Microbiol Rev.* – 1985. – V.49. – №1. – p.1 – 32.
229. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2003. – V.67. – №4. – p.593 – 656.
230. Odintsov S.G., Sabala I., Marcyjaniak M., Bochtler M. Latent LytM at 1.3Å resolution // *J Mol Biol.* – 2004. – V.335. – №3. – p.775 – 785.
231. O'Flaherty S., Ross R.P., Coffey A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria // *FEMS Microbiol Rev.* – 2009. – V.33. – №4. – p.801 – 819.
232. Ogura J., Toyoda A., Kurosawa T., Chong A.L., Chohnan S., Masaki T. Purification, characterization, and gene analysis of cellulase (Cel8A) from *Lysobacter* sp. IB–9374 // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2006. – V.70. – №10. – p.2420 – 2428.
233. Oh J., Kim J.G., Jeon E., Yoo C.H., Moon J.S., Rhee S., Hwang I. Amyloidogenesis of type III–dependent harpins from plant pathogenic bacteria // *J Biol Chem.* – 2007. – V.282. – №18. – p.13601 – 13609.
234. Okuda S., Tokuda H. Lipoprotein sorting in bacteria // *Annu Rev Microbiol.* – 2011. – V.65. – p.239 – 259.
235. Oliveira D.L., Nakayasu E.S., Joffe L.S., Guimarães A.J., Sobreira T.J., Nosanchuk J.D., Cordero R.J., Frases S., Casadevall A., Almeida I.C., Nimrichter L., Rodrigues M.L. Biogenesis of extracellular vesicles in yeast: many questions with few answers // *Commun. Integr. Biol.* – 2010. – V.3. – №6. – p.533 – 535.
236. Olofsson A., Vallström A., Petzold K., Tegtmeyer N., Schleucher J., Carlsson S., Haas R., Backert S., Wai S.N., Gröbner G., Arnqvist A. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles // *Mol Microbiol.* – 2010. – V.77. – №6. – p.1539 – 1555.

237. Olsen I., Amano A. Outer membrane vesicles – offensive weapons or good Samaritans? // *J Oral Microbiol.* – 2015. – V.7. – p.27468.
238. Orito Y., Morita M., Hori K., Unno H., Tanji Y. *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin can enhance permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane and induce cell lysis // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2004. – V.65. – №1. – p.105 – 109.
239. Osborn M.J., Gander J.E., Parisi E., Carson, J. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane // *J Biol Chem.* – 1972. – V.247. – №12. – p.3962 – 3972.
240. Oshida T., Sugai M., Komatsuzawa H., Hong Y.M., Suginaka H., Tomasz A. A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1995. – V.92. – №1. – p.285 – 289.
241. Oza N.B. Beta-lytic protease, a neutral sorangiopeptidase // *Int J Pept Protein Res.* – 1973. – V.5. – №6. – p.365 – 369.
242. Paetzel M., Dalbey R.E., Strynadka N.C. The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. A novel antibiotic target // *Pharmacol Ther.* – 2000. – V.87. – №1. – p.27 – 49.
243. Page M.G. The role of the outer membrane of Gram-negative bacteria in antibiotic resistance: Ajax' shield or Achilles' heel? // *Handb Exp Pharmacol.* – 2012. – №211. – p.67 – 86.
244. Palumbo J.D., Sullivan R.F., Kobayashi D.Y. Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of three beta-1,3-glucanase genes from *Lysobacter enzymogenes* strain N4-7 // *J Bacteriol.* – 2003. – V.185. – №15. – p.4362 – 4370.
245. Palumbo J.D., Yuen G.Y., Jochum C.C., Tatum K., Kobayashi D.Y. Mutagenesis of beta-1,3-Glucanase Genes in *Lysobacter enzymogenes* Strain C3 Results in Reduced Biological Control Activity Toward Bipolaris Leaf Spot of Tall Fescue and Pythium Damping-Off of Sugar Beet // *Phytopathology.* – 2005. – V.95. – №6. – p.701 – 707.
246. Park J. T., Strominger J. L. Mode of action of penicillin // *Science.* – 1957. – V.125. – №3238. – p.99 – 101.
247. Park E., Rapoport T.A. Preserving the membrane barrier for small molecules during bacterial protein translocation // *Nature.* – 2011a. – V.473. – №7346. – p.239 – 242.
248. Park S.B., Jang H.B., Nho S.W., Cha I.S., Hikima J., Ohtani M., Aoki T., Jung T.S. Outer membrane vesicles as a candidate vaccine against edwardsiellosis // *PLoS One.* – 2011b. – V.6. – №3. – e17629.

249. Patel R., Smith S.M., Robinson C. Protein transport by the bacterial Tat pathway // *Biochim Biophys Acta*. – 2014. – V.1843. – №8. – p.1620 – 1628.
250. Perez–Cruz C., Carrion O., Delgado L., Martinez G., Lopez–Iglesias C., Mercade E. New type of outer membrane vesicle produced by the Gram–negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: implications for DNA content // *Appl Environ Microbiol*. – 2013. – V.79. – №6. – p.1874 – 1881.
251. Pérez–Cruz C., Delgado L., López–Iglesias C., Mercade E. Outer–inner membrane vesicles naturally secreted by gram–negative pathogenic bacteria // *PLoS One*. – 2015. – V.10. – №1. – e0116896.
252. Pérez–Dorado I., Campillo N.E., Monterroso B., Heseck D., Lee M., Páez J.A., García P., Martínez–Ripoll M., García J.L., Mobashery S., Menéndez M., Hermoso J.A. Elucidation of the molecular recognition of bacterial cell wall by modular pneumococcal phage endolysin CPL–1 // *J Biol Chem*. – 2007. – V.282. – №34. – p. 24990 – 24999.
253. Pérez–Dorado I., González A., Morales M., Sanles R., Striker W., Vollmer W., Mobashery S., García J.L., Martínez–Ripoll M., García P., Hermoso J.A. Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC // *Nat Struct Mol Biol*. – 2010. – V.17. – №5. – p.576 – 581.
254. Perona J.J., Craik C.S. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin–like serine protease fold // *J Biol Chem*. – 1997. – V.272. – №48. – p.29987 – 29990.
255. Pidot S.J., Coyne S., Kloss F., Hertweck C. Antibiotics from neglected bacterial sources // *Int J Med Microbiol*. – 2014. – V.304. – №1. – p.14 – 22.
256. Poinso V., Carpené M.A., Couderc F. (2012) Coupled Mass Spectrometric Strategies for the Determination of Carbohydrates at Very Low Concentrations: The Case of Polysaccharides Involved in the Molecular Dialogue Between Plants and Rhizobia. In: The Complex World of Polysaccharides (Karunaratne D.N., ed.). *InTech*: Rijeka, Croatia. – p.305 – 344.
257. Powell A.J., Liu Z.J., Nicholas R.A., Davies C. Crystal structures of the lytic transglycosylase MltA from *N. gonorrhoeae* and *E. coli*: insights into interdomain movements and substrate binding // *J Mol Biol*. – 2006. – V.359. – №1. – p.122 – 136.
258. Pukatzki S., Ma A.T., Revel A.T., Sturtevant D., Mekalanos J.J. Type VI secretion system translocates a phage tail spike–like protein into target cells where it cross–links actin // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2007. – V.104. – №39. – p.15508 – 15513.
259. Puopolo G., Cimmino A., Palmieri M.C., Giovannini O., Evidente A., Pertot I. *Lyso bacter capsici* AZ78 produces cyclo(L–Pro–L–Tyr), a 2,5–diketopiperazine with

- toxic activity against sporangia of *Phytophthora infestans* and *Plasmopara viticola* // *J Appl Microbiol.* – 2014. – V.117. – №4. – p.1168 – 1180.
260. Raetz C.R. Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction // *J Bacteriol.* – 1993. – V.175. – №18. – p.5745 – 5753.
261. Raetz C.R., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins // *Annu Rev Biochem.* – 2002. – V.71. – p.635 – 700.
262. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 1998. – V.62. – №3. – p.597 – 635.
263. Rawlings N.D., Barrett A.J. (2013) Introduction: Serine Peptidases and Their Clans. In: Handbook of Proteolytic Enzymes (Rawlings N.D., Salvesen G.S., eds). Academic Press: Oxford, UK. – p.2491 – 2523.
264. Rawlings N.D., Waller M., Barrett A.J., Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V.42 (Database issue). –D503 – 509.
265. Raymond C.K., Sims E.H., Kas A., Spencer D.H., Kuttyavin T.V., Ivey R.G., Zhou Y., Kaul R., Clendenning J.B., Olson M.V. Genetic variation at the O-antigen biosynthetic locus in *Pseudomonas aeruginosa* // *J Bacteriol.* – 2002. – V.184. – №13. – p.3614 – 3622.
266. Reichenbach H. (2006). The genus *Lysobacter*. In: The prokaryotes (third edition). (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. eds.). Springer-Verlag: New York, USA. – V.6. – p.939 – 957.
267. Reichmann N.T., Gründling A. Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes // *FEMS Microbiol Lett.* – 2011. – V.319. – №2. – p.97 – 105.
268. Reisfeld R.A., Lewis U.J., Williams D.E. Disk electrophoresis of basic protein and peptides on polyacrylamide gel // *Nature.* – 1962. – V.195. – p.281 – 283.
269. Remaut H., Rose R.J., Hannan T.J., Hultgren S.J., Radford S.E., Ashcroft A.E., Waksman G. Donor-strand exchange in chaperone-assisted pilus assembly proceeds through a concerted beta strand displacement mechanism // *Mol Cell.* – 2006. – V.22. – №6. – p.831 – 842.
270. Renelli M., Matias V., Lo R.Y., Beveridge T.J. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential // *Microbiology.* – 2004. – V.150. – №Pt7. – p.2161 – 2169.

271. Renner L.D., Weibel D.B. Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2011. – V.108. – №15. – p.6264 – 6269.
272. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *J Cell Biol*. – 1963. – V.17. – p.208 – 212.
273. Ricci D.P., Hagan C.L., Kahne D., Silhavy T.J. Activation of the *Escherichia coli* β -barrel assembly machine (Bam) is required for essential components to interact properly with substrate // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – V.109. – №9. – p.3487 – 3491.
274. Rigel N.W., Ricci D.P., Silhavy T.J. Conformation-specific labeling of BamA and suppressor analysis suggest a cyclic mechanism for β -barrel assembly in *Escherichia coli* // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2013. – V.110. – №13. – p.5151 – 5156.
275. Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – V.107. – №44. – p.19002 – 19007.
276. Roach D.R., Donovan D.M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications // *Bacteriophage*. – 2015. – V.5. – №3. – e1062590.
277. Rodrigues M.L., Franzen A.J., Nimrichter L., Miranda K. Vesicular mechanisms of traffic of fungal molecules to the extracellular space // *Curr Opin Microbiol*. – 2013. – V.16. – №4. – p.414 – 420.
278. Rodríguez-Rubio L., Martínez B., Donovan D.M., Rodríguez A., García P. Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics // *Crit Rev Microbiol*. – 2013. – V.39. – №4. – p.427 – 434.
279. Rodríguez-Rubio L., Gutiérrez D., Donovan D.M., Martínez B., Rodríguez A., García P. Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials // *Crit Rev Biotechnol*. – 2016. – V.36. – №3. – p.542 – 552.
280. Roier S., Blume T., Klug L., Wagner G.E., Elhenawy W., Zangger K., Prassl R., Reidl J., Daum G., Feldman M.F., Schild S. A basis for vaccine development: Comparative characterization of *Haemophilus influenzae* outer membrane vesicles // *Int J Med Microbiol*. – 2015. – V.305. – №3. – p.298 – 309.
281. Roier S., Zingl F.G., Cakar F., Durakovic S., Kohl P., Eichmann T.O., Klug L., Gadermaier B., Weinzerl K., Prassl R., Lass A., Daum G., Reidl J., Feldman M.F., Schild S. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria // *Nat Commun*. – 2016. – V.7. – p.10515.
282. Romero D., Kolter R. Functional amyloids in bacteria // *Int Microbiol*. – 2014. – V.17. – №2. – p.65 – 73.

283. Rompikuntal P.K., Thay B., Khan M.K., Alanko J., Penttinen A.M., Asikainen S., Wai S.N., Oscarsson J. Perinuclear localization of internalized outer membrane vesicles carrying active cytolethal distending toxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* // *Infect Immun.* – 2012. – V.80. – №1. – p.31 – 42.
284. Ruggiero A., Marasco D., Squeglia F., Soldini S., Pedone E., Pedone C., Berisio R. Structure and functional regulation of RipA, a mycobacterial enzyme essential for daughter cell separation // *Structure.* – 2010. – V.18. – №9. – p.1184 – 1190.
285. Sabra W., Lünsdorf H., Zeng A.P. Alterations in the formation of lipopolysaccharide and membrane vesicles on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under oxygen stress conditions // *Microbiology.* – 2003. – V.149. – №Pt10. – p.2789 – 2795.
286. Sakiyama F., Masaki T. (2013) Lysyl Endopeptidase. In: Handbook of Proteolytic Enzymes (Rawlings N.D., Salvesen G.S., eds). Academic Press: Oxford, UK. – p.2543 – 2545.
287. Salton M.R.J. (1994). The bacterial cell envelope – a historical perspective. In: New Comprehensive Biochemistry. Bacterial cell wall (Ghuysen J.M., Hakenbeck R., eds.). Elsevier Science B.V: Amsterdam, The Netherlands. – p.1 – 22.
288. Sauter N.K., Mau T., Rader S.D., Agard D.A. Structure of alpha-lytic protease complexed with its pro region // *Nat Struct Biol.* – 1998. – V.5. – № 11. – p. 945 – 950.
289. Schäffer C., Messner P. The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together // *Microbiology.* – 2005. – V.151. – № Pt 3. – p.643 – 651.
290. Sharif S., Singh M., Kim S.J., Schaefer J. *Staphylococcus aureus* peptidoglycan tertiary structure from carbon-13 spin diffusion // *J Am Chem Soc.* – 2009. – V.131. – №20. – p. 7023 – 7030.
291. Schertzer J.W., Whiteley M. A bilayer-couple model of bacterial outer membrane vesicle biogenesis // *MBio.* – 2012. – V.3. – №2. – doi: 10.1128/mBio.00297-11.
292. Schindler C.A., Schuhardt V.T. Purification and properties of lysostaphin: A lytic agent for *Staphylococcus aureus* // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1965. – V.97. – p.242 – 250.
293. Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // *Bacteriol Rev.* – 1972. – V.36. – №4. – p.407 – 477.
294. Schmelcher M., Donovan D.M., Loessner M.J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials // *Future Microbiol.* – 2012. – V.7. – №10. – p.1147 – 1171.
295. Schonbaum G.R., Zerner B., Bender M.L. The spectrophotometric determination of the operational normality of an alpha-chymotrypsin solution // *J Biol Chem.* – 1961. – V.236. – p.2930 – 2935.

296. Schooling S.R., Beveridge T.J. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms // *J Bacteriol.* – 2006. – V.188. – №16. – p.5945 – 5957.
297. Schwechheimer C., Sullivan C.J., Kuehn M.J. Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria // *Biochemistry.* – 2013. – V.52. – №18. – p.3031 – 3040.
298. Schwechheimer C., Kulp A., Kuehn M.J. Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content // *BMC Microbiol.* – 2014. – V.14. – p. 324.
299. Schwechheimer C., Kuehn M.J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions // *Nat Rev Microbiol.* – 2015. – V.13. – №10. – p.605 – 619.
300. Seltmann G., Holst O. (2002) Periplasmic space and rigid layer. In: The bacterial cell wall (Seltmann G., Holst O., eds.). Springer: Berlin, Heidelberg, Germany. – p.103 – 132.
301. Sen K., **Nikaido** H. In vitro trimerization of OmpF porin secreted by spheroplasts of *Escherichia coli* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1990. – V.87. – №2. – p.743 – 747.
302. Shaw D., Mirelman D., Chatterjee N.N., Park J.T. Ribitol teichoic acid synthesis in bacteriophage resistant mutant of *Staphylococcus aureus* H // *J Biol Chem.* – 1970. – V.245. – №19. – p.5101 – 5106.
303. Siegrist M.S., Whiteside S., Jewett J.C., Aditham A., Cava F., Bertozzi C.R. (D)-Amino acid chemical reporters reveal peptidoglycan dynamics of an intracellular pathogen // *ACS Chem Biol.* – 2013. – V.8. – №3. – p.500 – 505.
304. Silen J.L., Frank D., Fujishige A., Bone R., Agard D.A. Analysis of prepro-alpha-lytic protease expression in *Escherichia coli* reveals that the pro region is required for activity // *J Bacteriol.* – 1989. – V.171. – №3. – p.1320 – 1325.
305. Silipo A., De Castro C., Lanzetta R., Parrilli M., Molinaro A. (2010) Lipopolysaccharides. In: Prokaryotic Cell Wall Compounds (Konig H., Claus H., Varma A., eds.). Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, Germany. – p.133 – 153.
306. Silverman J.M., Chan S.K., Robinson D.P., Dwyer D.M., Nandan D., Foster L.J., Reiner N.E. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani* // *Genome Biol.* – 2008. – V.9. – №2 – R35.
307. Silverman J.M., Clos J., de'Oliveira C.C., Shirvani O., Fang Y., Wang C., Foster L.J., Reiner N.E. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages // *J. Cell Sci.* – 2010. – V.123. – №Pt6. – p.842 – 852.
308. Singh H., Won K., Du J., Yang J.E., Akter S., Kim K.Y., Yi T.H. *Lysobacter agri* sp. nov., a bacterium isolated from soil // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2015. – V.108. – №3. – p.553 – 561.

309. Smith T.J., Blackman S.A., Foster S.J. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions // *Microbiology*. – 2000. – V.146. – №Pt 2. – p.249 – 262.
310. Spencer J., Murphy L.M., Connors R., Sessions R.B., Gamblin S.J. Crystal structure of the LasA virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*: substrate specificity and mechanism of M23 metallopeptidases // *J Mol Biol*. – 2010. – V.396. – №4. – p.908 – 923.
311. Spratt B.G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations // *Science*. – 1994. – V.264. – №5157. – p.388 – 393.
312. Stroud R.M., Kossiakoff A.A., Chambers J.L. Mechanisms of zymogen activation // *Annu Rev Biophys Bioeng*. – 1977. – V.6. – p.177 – 193.
313. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G. Bacteriophage therapy // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2001. – V.45. – №3. – p.649 – 659.
314. Taddei C.R., Oliveira F.F., Piazza R.M., Paes Leme A.F., Klitzke C.F., Serrano S.M., Martinez M.B., Elias W.P., Sant Anna O.A. A Comparative Study of the Outer Membrane Proteome from an Atypical and a Typical Enteropathogenic *Escherichia coli* // *Open Microbiol J*. – 2011. – V.5. – p.83 – 90.
315. Tashiro Y., Sakai R., Toyofuku M., Sawada I., Nakajima–Kambe T., Uchiyama H., Nomura N. Outer membrane machinery and alginate synthesis regulators control membrane vesicle production in *Pseudomonas aeruginosa* // *J Bacteriol*. – 2009. – V.191. – №24. – p.7509 – 7519.
316. Tashiro Y., Ichikawa S., Shimizu M., Toyofuku M., Takaya N., Nakajima–Kambe T., Uchiyama H., Nomura N. Variation of physiochemical properties and cell association activity of membrane vesicles with growth phase in *Pseudomonas aeruginosa* // *Appl Environ Microbiol*. – 2010. – V.76. – №11. – p.3732 – 3739.
317. Tashiro Y., Inagaki A., Shimizu M., Ichikawa S., Takaya N., Nakajima–Kambe T., Uchiyama H., Nomura N. Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* // *Biosci Biotechnol Biochem*. – 2011. – V.75. – №3. – p.605 – 607.
318. Tashiro Y., Uchiyama H., Nomura N. Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa* // *Environ Microbiol*. – 2012. – V.14. – № 6. – p.1349 – 1362.
319. Templin M.F., Ursinus A., Höltje J.V. A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli* // *EMBO J*. – 1999. – V.18. – №15. – p.4108 – 4117.
320. Thanassi D.G., Hultgren S.J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane // *Curr Opin Cell Biol*. – 2000. – V.12. – №4. – p.420 – 430.

321. Thuruthyil S.J., Zhu H., Willcox M.D. Serotype and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lens wearers // *Clin Experiment Ophthalmol.* – 2001. – V.29. – №3. – p.147 – 149.
322. Tishchenko S., Gabdulkhakov A., Melnik B., Kudryakova I., Latypov O., Vasilyeva N., Leontievsky A. Structural Studies of Component of Lysoamidase Bacteriolytic Complex from *Lysobacter* sp. XL1 // *Protein J.* – 2016. – V.35. – №1. – p.44 – 50.
323. Torriani A. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli* // *Biochim Biophys Acta.* – 1960. – V.38. – p.460 – 469.
324. Tsai C.S., Whitaker D.R., Jurásek L., Gillespie D.C. Lytic enzymes of *Sorangium* sp. Action of the alpha- and beta-lytic proteases on two bacterial mucopeptides // *Can J Biochem.* – 1965. – V.43. – №12. – p.1971 – 1983.
325. Tsfasman I.M., Lapteva Y.S., Krasovskaya L.A., Kudryakova I.V., Vasilyeva N.V., Granovsky I.E., Stepnaya O.A. Gene Expression of Lytic Endopeptidases AlpA and AlpB from *Lysobacter* sp. XL1 in *Pseudomonads* // *J Mol Microbiol Biotechnol.* – 2015. – V.25. – №4. – p. 244 – 252.
326. Tsukazaki T., Mori H., Fukai S., Ishitani R., Mori T., Dohmae N., Perederina A., Sugita Y., Vassilyev D.G., Ito K., Nureki O. Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures // *Nature.* – 2008. – V.455. – №7215. – p.988 – 991.
327. Valas R.E., Bourne P.E. Structural analysis of polarizing indels: an emerging consensus on the root of the tree of life // *Biol Direct.* – 2009. – V.4. – p.30.
328. van Heijenoort J. Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli* // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2011. – V.75. – №4. – p.636 – 663.
329. van Ulsen P., Rahman Su, Jong W.S., Daleke-Schermerhorn M.H., Luirink J. Type V secretion: From biogenesis to biotechnology // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – V.1843. – №8. – p.1592 – 1611.
330. Vasilyeva N.V., Tsfasman I.M., Suzina N.E., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles // *FEBS J.* – 2008. – V.275. – №15. – p.3827 – 3835.
331. Vasilyeva N.V., Tsfasman I.M., Kudryakova I.V., Suzina N.E., Shishkova N.A., Kulaev I.S., Stepnaya O.A. The role of membrane vesicles in secretion of *Lysobacter* sp. bacteriolytic enzymes // *J Mol Microbiol Biotechnol.* – 2013. – V.23. – № 1 – 2. – p.142 – 151.

332. Vasilyeva N.V., Shishkova N.A., Marinin L.I., Ledova L.A., Tsfasman I.M., Muranova T.A., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. Lytic peptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 with broad antimicrobial spectrum // *J Mol Microbiol Biotechnol.* – 2014. – V.24. – №1. – p.59 – 66.
333. Vassilyev D.G., Mori H., Vassilyeva M.N., Tsukazaki T., Kimura Y., Tahirov T.H., Ito K. Crystal structure of the translocation ATPase SecA from *Thermus thermophilus* reveals a parallel, head-to-head dimer // *J Mol Biol.* – 2006. – V.364. – №3. – p.248 – 258.
334. Viterbo A., Montero M., Ramot O., Friesem D., Monte E., Llobell A., Chet I. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203) // *Curr Genet.* – 2002. – V.42. – №2. – p.114 – 122.
335. Vollmer W., Höltje J.V. The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? // *J Bacteriol.* – 2004. – V.186. – №18. – p.5978 – 5987.
336. Vollmer W., Blanot D., de Pedro M.A. Peptidoglycan structure and architecture // *FEMS Microbiol Rev.* – 2008a. – V.32. – №2. – p.149 – 167.
337. Vollmer W., Joris B., Charlier P., Foster S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases // *FEMS Microbiol Rev.* – 2008b. – V.32. – №2. – p.259 – 286.
338. Vollmer W. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan // *FEMS Microbiol Rev.* – 2008b. – V.32. – №2. – p.287 – 306.
339. Vötsch W., Templin M.F. Characterization of a beta – N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and elucidation of its role in muropeptide recycling and beta – lactamase induction // *J Biol Chem.* – 2000. – V.275. – №50. – p.39032 – 39038.
340. Walmagh M., Briers Y., dos Santos S.B., Azeredo J., Lavigne R. Characterization of modular bacteriophage endolysins from *Myoviridae* phages OBP, 201φ2-1 and PVP-SE1 // *PLoS One.* – 2012. – V.7. – №5. – e36991.
341. Walther T.H., Grage S.L., Roth N., Ulrich A.S. Membrane alignment of the pore-forming component TatA(d) of the twin-arginine translocase from *Bacillus subtilis* resolved by solid-state NMR spectroscopy // *J Am Chem Soc.* – 2010. – V.132. – №45. – p.15945 – 15956.
342. Wang X., Quinn P.J. Endotoxins: lipopolysaccharides of gram-negative bacteria // *Subcell Biochem.* – 2010. – V.53. – p.3 – 25.
343. Wang W., Chanda W., Zhong M. The relationship between biofilm and outer membrane vesicles: a novel therapy overview // *FEMS Microbiol Lett.* – 2015. – V.362. – №15. – fmv117.

344. Wecke J., Perego M., Fischer W. D-alanine deprivation of *Bacillus subtilis* teichoic acids is without effect on cell growth and morphology but affects the autolytic activity // *Microb Drug Resist.* – 1996. – V.2. – №1. – p.123 – 129.
345. Weiner J.H., Rothery R.A. (2007). Bacterial cytoplasmic membrane. In: Encyclopedia of life sciences (Wiley J.&Sons). Ltd: Chichester, England. – p.1 – 10.
346. Weissmann G., Cohen C., Hoffstein S. Membrane perturbation: studies employing a calcium-sensitive dye, arsenazo III, in liposomes // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1976. – V.73. – №2. – p.510 – 514.
347. Wensink J., Witholt B. Outer membrane vesicles released by normally growing *Escherichia coli* contain very little lipoprotein // *Eur J Biochem.* – 1981. – V.116. – №2. – p.331 – 335.
348. Whitaker D.R. Lytic enzymes of *Sorangium* sp. Isolation and enzymatic properties of the alpha- and beta-lytic proteases // *Can J Biochem.* – 1965a. – V.43. – №12. – p.1935 – 1954.
349. Whitaker D.R., Roy C., Tsai C.S., Jurásek L. Lytic enzymes of *Sorangium* sp. A comparison of the proteolytic properties of the alpha- and beta-lytic proteases // *Can J Biochem.* – 1965b. – V.43. – №12. – p.1961 – 1970.
350. Wilkinson S.G. Composition and structure of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* // *Rev Infect Dis.* – 1983. – V.5 Suppl 5. – S941 – S949.
351. Winsor G.L., Van Rossum T., Lo R., Khaira B., Whiteside M.D., Hancock R.E., Brinkman F.S. *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V.37 (Database issue). – D483–8.
352. Wyckoff T.J., Raetz C.R., Jackman J.E. Antibacterial and anti-inflammatory agents that target endotoxin // *Trends Microbiol.* – 1998. – V.6. – № 4. – p.154 – 159.
353. Xie Y., Wright S., Shen Y., Du L. Bioactive natural products from *Lysobacter* // *Nat Prod Rep.* – 2012. – V.29. – №11. – p.1277 – 1287.
354. Xie H. Biogenesis and function of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles // *Future Microbiol.* – 2015. – V.10. – №9. – p.1517 – 1527.
355. Yang L., Manithody C., Rezaie A.R. The role of autolysis loop in determining the specificity of coagulation proteases // *Braz J Med Biol Res.* – 2007. – V.40. – №8. – p.1055 – 1064.
356. Yang D.C., Tan K., Joachimiak A., Bernhardt T.G. A conformational switch controls cell wall-remodelling enzymes required for bacterial cell division // *Mol Microbiol.* – 2012. – V.85. – №4. – p.768 – 781.

357. Yaron S., Kolling G.L., Simon L., Matthews K.R. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria // *Appl Environ Microbiol.* – 2000. – V.66. – №10. – p.4414 – 4420.
358. Zahrl D., Wagner M., Bischof K., Bayer M., Bayer M., Zavec B., Beranek A., Ruckstuhl C., Zarfel G.E., Koraimann G. Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems // *Microbiology.* – 2005. – V.151. – №Pt 11. – p.3455 – 3467.
359. Zhou L., Srisatjaluk R., Justus D.E., Doyle R.J. On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria // *FEMS Microbiol Lett.* – 1998. – V.163. – №2. – p.223 – 228.
360. Zielke R.A., Wierzbicki I.H., Weber J.V., Gafken P.R., Sikora A.E. Quantitative proteomics of the *Neisseria gonorrhoeae* cell envelope and membrane vesicles for the discovery of potential therapeutic targets // *Mol Cell Proteomics.* – 2014. – V.13. – №5. – p.1299 – 1317.