

На правах рукописи

КУДРЯКОВА ИРИНА ВАЛЕРЬЕВНА
БИОГЕНЕЗ ВЕЗИКУЛ *LYSOBACTER SP. XL1*

03.01.04 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2017

Работа выполнена в лаборатории биохимии клеточной поверхности микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН), г. Пущино

Научный руководитель:

Васильева Наталья Валерьевна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ РАН, г. Пущино

Официальные оппоненты:

Мулюкин Андрей Львович, доктор биологических наук, руководитель Центра коллективного пользования «Коллекция микроорганизмов UNIQEM», ведущий научный сотрудник Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва

Руденская Галина Николаевна, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры химии природных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», г. Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФМ РАН), г. Саратов

Защита диссертации состоится «22» июня 2017 г. в 10 час. 00 мин. на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при ИБФМ РАН по адресу: 142290 Московская область, г. Пущино, проспект Науки, д.5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФМ РАН.

Автореферат и диссертация размещены на сайте <http://www.ibpm.ru>

Автореферат разослан « » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

Кулаковская Т.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, липополисахарид (ЛПС), компоненты периплазмы (периплазматические белки, включая автолитические ферменты, фрагменты клеточных стенок), компоненты цитоплазмы и цитоплазматической мембраны (в том числе 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, обуславливающих везикулообразование, и изучение механизма их действия.

Грамотрицательная бактерия *Lysobacter* sp. XL1 образует внешнемембранные везикулы и секретирует с их помощью один из бактериолитических ферментов – литическую протеазу Л5 (Vasilyeva *et al.*, 2008; Васильева *и др.*, 2009). *Lysobacter* sp. XL1 единственный представитель рода, для которого установлена способность к везикулообразованию. Везикулы этой бактерии 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 секреторные везикулы, отличающиеся по составу. Фактором, обуславливающим формирование таких везикул, может быть 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 существенную роль в везикулообразовании у *Lysobacter* sp. XL1. В связи с этим важным моментом является изучение фосфолипидного состава *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 том числе 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 подхода для разработки высокоэффективных противомикробных препаратов нового поколения на основе литического фермента Л5 *Lysobacter* sp. XL1.

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; Vasilyeva *et al.*, 2014). Однако ферменты отличаются по скорости гидролиза этих субстратов. Для белка Л5 тип гидролизуемых связей в пептидогликане стафилококка не установлен в отличие от белка Л1. Несмотря на гомологию, эти ферменты существенно отличаются также 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 функционировании этих белков необходимы структурные исследования, которые ранее не проводились.

Таким образом, актуальность темы работы обоснована важностью изучения биогенеза бактериальных везикул и 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

Установлены два фактора, влияющих на биогенез везикул *Lysobacter* sp. XL1: секретлируемый белок Л5 и кислый фосфолипид кардиолипин. Для 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 и наличие доменов, существенно отличающихся от эквивалентных доменов его гомологов. Установлено, что в отношении пептидогликана 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 экзополисахарида (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 том числе множественноустойчивые штаммы. 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 о 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, подготовка образцов к электронной микроскопии, изучение специфичности действия белка Л5, препаративное получение белков для кристаллизации и для анализа методом дифракции рентгеновских лучей, конструирование антимикробных препаратов и проверка их литического действия выполнялись лично автором. Соискатель принимал непосредственное участие в интерпретации и обсуждении всех полученных результатов и в подготовке публикаций.

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., к.б.н. Мачулину А.В., к.б.н. Колосковой О.О.; 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 (государственный контракт №11418p/17126) и гранта Минобрнауки России (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 Пущинская 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 источников литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным объектом исследования являлся штамм *Lysobacter* sp. XL1 ВКМ В–1576. Культивирование проводили в модифицированной жидкой среде LB (pH 7,5) (Vasilyeva *et al.*, 2014). Рекомбинантный штамм *P. fluorescens* Q2–87/В, продуцирующий литическую протеазу Л5 *Lysobacter* sp. XL1 (Lapteva *et al.*, 2012), и родительский штамм Q2–87 выращивали в жидкой среде (pH 7,5), содержащей 10 г л⁻¹ пептона, 5 г л⁻¹ дрожжевого экстракта, 5 г л⁻¹ NaCl, 20 мкг мл⁻¹ тетрациклина 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. Рекомбинантные штаммы на основе *E. coli*

BL21(DE3)/pLysE для белков Л1 и Л5 (Грановский *и др.*, 2010, 2011) культивировали на среде LB, содержащей 0,02 мг мл⁻¹ хлорамфеникола и 0,1 мг мл⁻¹ ампициллина при 37°C с аэрацией. При достижении культуры поглощения равного 0,7 при 590 нм продукцию рекомбинантных белков Л1 и Л5 индуцировали 1мМ IPTG и продолжали культивирование в течение 6 ч. Штамм *S. aureus* 209P культивировали на дрожже–пептонной среде рН (7,2). Штаммы, используемые в работе в качестве тест–объектов, 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.

Препараты везикул *Lysobacter* sp. XL1, *P. fluorescens* Q2–87 и Q2–87/V получали методом дифференциального центрифугирования. Клетки 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/V при 12 500 g в течение 35 мин при 4°C. Из полученной культуральной жидкости везикулы осаждали центрифугированием при 113 000 g в течение 2 ч и промывали 50 мМ Трис–НСl (рН 8,0) при той же скорости в течение 1 ч. Полученные осадки везикул ресуспендировали в равных объемах 50 мМ Трис–НСl (рН 8,0). Препараты везикул Q2–87 и Q2–87/V также получали согласно методу Грениера и Майранда (Grenier&Maugrand 1987). Фракционирование препарата везикул, растворенного в 25% сахарозе в 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0), содержащем 5 мМ ЭДТА, проводили в плотностном градиенте сахарозы (30 – 55% сахарозы в 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0), содержащем 5 мМ ЭДТА) с шагом 5% сахарозы с помощью ультрацентрифугирования при 106 500 g в течение 12 ч. Фракции равного объема отбирали, начиная от мениска, концентрировали и промывали 50 мМ Трис–НСl (рН 8,0) при 113 000 g в течение 2 ч.

Суммарные мембраны *Lysobacter* sp. XL1 получали после ультразвуковой дезинтеграции клеток или на френч–прессе. Внешние мембраны выделяли фракционированием препарата суммарных мембран методом Осборна (Osborn *et al.*, 1972) с модификацией. Фракционирование проводили в плотностном градиенте сахарозы (30 – 55% сахарозы в 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0), содержащем 5 мМ ЭДТА, с шагом 5%) при 106 500 g в течение 14 ч. Полученные фракции концентрировали, а затем промывали 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0) при 113 000 g в течение 1 ч.

Экстракцию фосфолипидов из препаратов внешних мембран и везикул *Lysobacter* sp. XL1 проводили по методу Эймса (Ames 1968). Индивидуальные фосфолипиды разделяли с помощью двумерной хроматографии на пластине с силикагелем 60 F254 (HPTLC, Merck, Германия). Для обнаружения фосфорсодержащих и аминокислотсодержащих фосфолипидов использовали молибденовый голубой и раствор нингидрина в ацетоне соответственно.

Очистку белков Л1 и Л5 осуществляли из рекомбинантной системы на основе *E. coli* BL21(DE3)/pLysE (Грановский *и др.*, 2010, 2011) на колонках His Trap FF 5 мл (GE Healthcare, США), MonoS (Amersham Biosciences, Швеция), ENrichS (Bio–Rad, США) с помощью системы FPLC АСТА (General Electric, США) или хроматографической системы NGCTM (Bio Rad, США).

Для кристаллизации Л1 3 мкл белка (8 мг мл⁻¹) в 50 мМ Трис–НСl (рН 8,0), содержащем 0,15 М NaCl, смешивали с 2 мкл №42 набора NR–LBD extension (0,01 М Bis–Tris propane (рН 6,5), 1,4 М сульфата лития). В качестве противораствора

использовали 300 мкл условий раствора №42 NR–LBD extension. Кристаллизация проводилась при 24°C.

Для кристаллизации Л5 2 мкл белка (20 мг мл⁻¹) в 50 мМ Трис–НСl (рН 8,0), содержащем 0,15 М NaCl, смешивали с 1 мкл раствора № 47 набора NR–LBD (0,1 М PIPES (рН 7,0), 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.

Способность белка Л5 образовывать амилоиды устанавливали методами электронной микроскопии и дифракции рентгеновских лучей с использованием системы Proteum X8 (Bruker, США). Белок получали из препарата везикул *Lysobacter* sp XL1 после их разрушения лизирующим буфером по методике Купманна с коллегами (Koopmann *et al.*, 2012).

Гель–филтрацию проводили на колонке HiLoad™16/60 (Superdex 75) (Amersham Biosciences, Швеция) с помощью системы FPLC АСТА. В качестве маркеров использовали стандарты с молекулярными массами от 12,3 кДа – 67,0 кДа (Sigma, США).

Электрофорез белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1 в нативных условиях проводили с использованием катодной системы Рейсфельда (Reisfeld *et al.*, 1962). Белковые полосы в геле выявляли окрашиванием раствором Кумасси бриллиантового синего R–250 (Serva, Германия).

Пептидогликан *S. aureus* 209Р получали методом Шарона в модификации Шоу (Shaw *et al.*, 1970).

Для определения способности белка Л5 гидролизовать пептидогликан *S. aureus* 209Р к 0,60 мл суспензии пептидогликана в 10 мМ Трис–НСl (рН 8,0) с поглощением 0,5 при 540 нм добавляли 0,20 мл белка (0,183 мг мл⁻¹) в 50 мМ Трис–НСl (рН 8,0) и инкубировали при 40°C в течение 48 ч. Присутствие в гидролизате свободных NH₂–групп определяли методом динитрофенилирования Гюзена и Строминджера (Ghuysen *et al.*, 1966).

Для определения типа гидролизуемой связи в синтетическом субстрате Abz–Ala–Ala–Phe–pNA (Филиппова *и др.*, 1988) использовали методику, описанную ранее (Степная *и др.*, 1992). Продукты реакции разделяли методом одномерной тонкослойной хроматографии на пластине 60 F254 (HPTLC, Merck, Германия). Обнаружение пятен производили посредством УФ–облучения и визуально.

Концентрацию экзополисахарида измеряли антроновым методом (Захарова&Косенко 1982).

Концентрацию белка в очищенных препаратах Л1 и Л5 определяли методом Бредфорда (Bradford 1976).

Концентрацию общего белка в препаратах определяли методом Лоури (Lowry *et al.*, 1951).

Активность щелочной фосфатазы определяли по скорости гидролиза п–нитрофенилфосфата (Torriani 1960).

Концентрацию 2–кето–3–дезоксиктоната (КДО) определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (Karkahnish *et al.*, 1978).

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

Иммуноцитохимическую реакцию на ультратонких срезах проводили с использованием кроличьих поликлональных антител к белку Л5 (разведение 1:200) с последующей обработкой белком А, меченным Au, 10 нм (разведение: 1:100). Контрастировали срезы в течение 30 мин в 3 % растворе уранилацетата в 70 % спирте, а затем в течение 4 мин цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds 1963). Ультратонкие срезы и негативноокрашенные препараты просматривали в электронном микроскопе JEM–1200 EX (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Электрофорез белков в присутствии Ds–Na проводили в 12,5% ПААГ по методу Лэммли (Laemmli 1970). В качестве маркеров использовали смесь белковых стандартов (Bio Rad, США). Белковые полосы в геле выявляли окрашиванием раствором Кумасси бриллиантового синего R–250 (Serva, Германия).

Иммуноблоттинг проводили после электрофоретического переноса белков с ПААГ на мембрану PVDF (Bio Rad, США). Перенос вели в течение 2 ч в 50 мМ боратном буфере (pH 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 хемилюминисцентного субстрата (Pierce, США).

Липосомный препарат на основе фосфолипидов и белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1 был получен методом гидратации липидных пленок (Weissmann *et al.*, 1976).

Препарат ЭПС *Lysobacter* sp. XL1 был получен сотрудниками лаборатории ранее (Кулаев *и др.*, 2002). Для удаления оставшихся бактериолитических ферментов использовали метод обработки ТХУ (Feng *et al.*, 2010). Антимикробный препарат конструировали на основе ЭПС и белка Л5 в соотношении 4:1 по концентрации.

Бактериолитическую активность сконструированных препаратов определяли турбидиметрическим методом на суспензии живых клеток *S. aureus* 209Р. К 0,92 мл суспензии в 10 мМ Трис–НСl pH (8,0), предварительно дважды отмытых тем же буфером от среды, добавляли 0,10 мл препаратов и инкубировали при 37°C.

Литическое действие препаратов также определяли методом спот–теста (Vasilyeva *et al.*, 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1 ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ БИОГЕНЕЗА ВЕЗИКУЛ *LYSOBACTER* SP. XL1

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 штамм образует гетерогенные везикулы не только по размеру, но и по составу.

В настоящей работе для доказательства этого предположения препарат везикул был разделен в градиенте плотности сахарозы от 30% до 50%. В результате получено 4 фракции. Методом электронной микроскопии было установлено, что во всех фракциях содержатся везикулы (рис. 1).

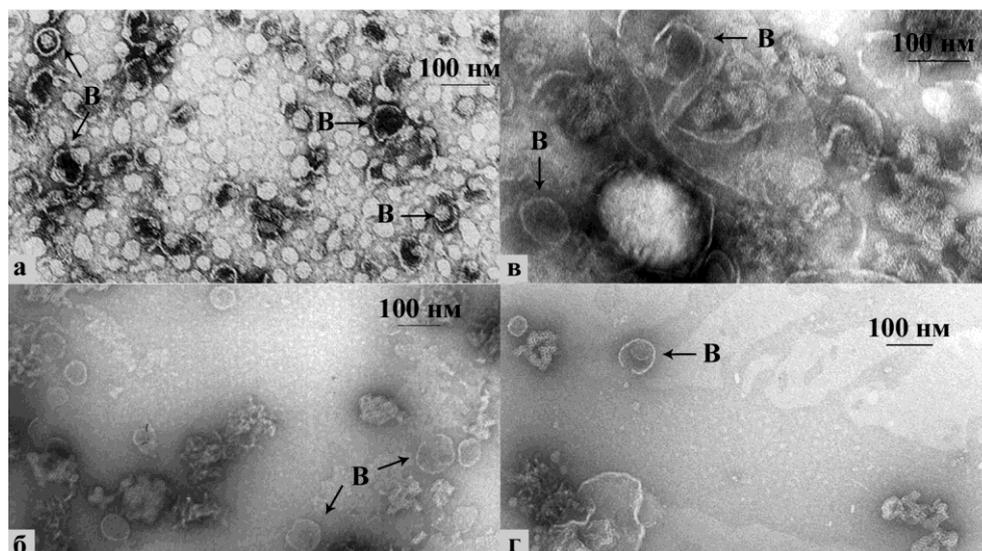


Рис. 1. Электронная микроскопия. **а** – Фракция 1 (везикулы, находящиеся в 30% сахарозе). **б** – Фракция 2 (везикулы, находящиеся в 35% сахарозе). **в** – Фракция 3 (везикулы, находящиеся в 40% сахарозе). **г** – Фракция 4 (везикулы, находящиеся в 45% сахарозе). В, везикулы.

Фракция 1 содержит везикулы преимущественно диаметром 30 – 65 нм (рис. 1а). Во фракции 2 преобладают более крупные везикулы диаметром 65 – 100 нм (рис. 1б). Фракции 3 и 4 содержат лишь единичные целостные везикулы диаметром 65 – 100 нм наряду с крупными фрагментами мембран (рис. 1в и 1г).

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. Фракции везикул 1 и 2 были охарактеризованы.

Показано, что содержание белка во фракции 2 в два раза выше, чем во фракции 1, 0,17 ($\pm 0,04$) и 0,06 ($\pm 0,01$) мг мл⁻¹ соответственно. Содержание КДО так же во фракции 2 выше, чем во фракции 1, 0,78 ($\pm 0,11$) и 0,41 ($\pm 0,10$) мМ соответственно. Электрофоретический анализ показал, что белковая картина всех полученных фракций практически одинакова (рис. 2). Вместе с тем обращает на себя внимание фракция 1, в которой обнаружены также мажорные белки с молекулярными массами 26,6 кДа, 27,6 кДа и 28,3 кДа, которые отсутствуют в остальных фракциях везикул. Белок с молекулярной массой 53,0 кДа присутствует в данной фракции в большем количестве.

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

Иммуноблоттингом показано, что белок Л5 содержится лишь во фракции 1 (рис. 2б).

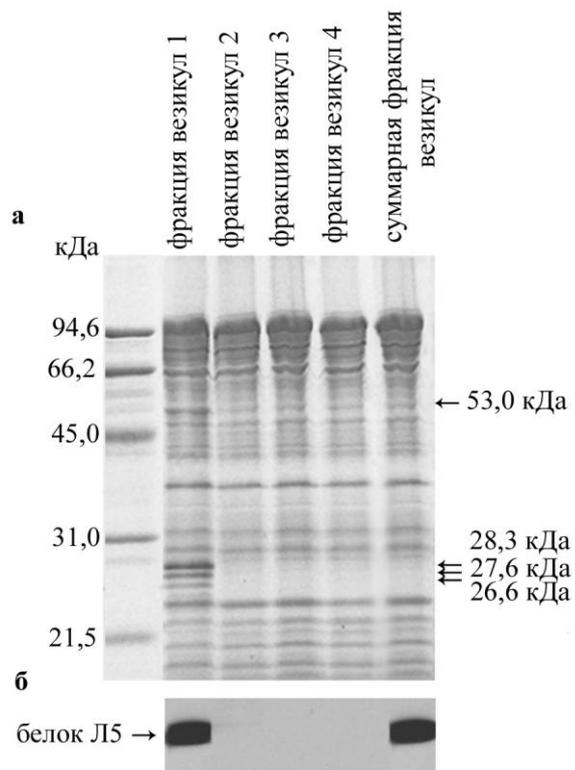


Рис. 2. а – Ds-Na – ПААГ. Электрофореграмма белкового состава фракций везикул. Образцы содержат по 0,04 мг общего белка. Стрелками обозначены белковые полосы, характерные для фракции везикул 1. **б** – Иммуноблоттинг белков с использованием поликлональных антител к бактериолитическому ферменту Л5 *Lysobacter* sp. XL1.

Таким образом, секреция белка Л5 осуществляется только посредством везикул, находящихся во фракции 1. Этот результат позволяет предположить направленную сортировку Л5 в определенную группу секреторных везикул.

Выявление секреторных везикул для белка Л5. Для подтверждения этого была проведена электронно-микроскопическая иммуноцитохимия ультратонких срезов клеток *Lysobacter* sp. XL1 (рис. 3).

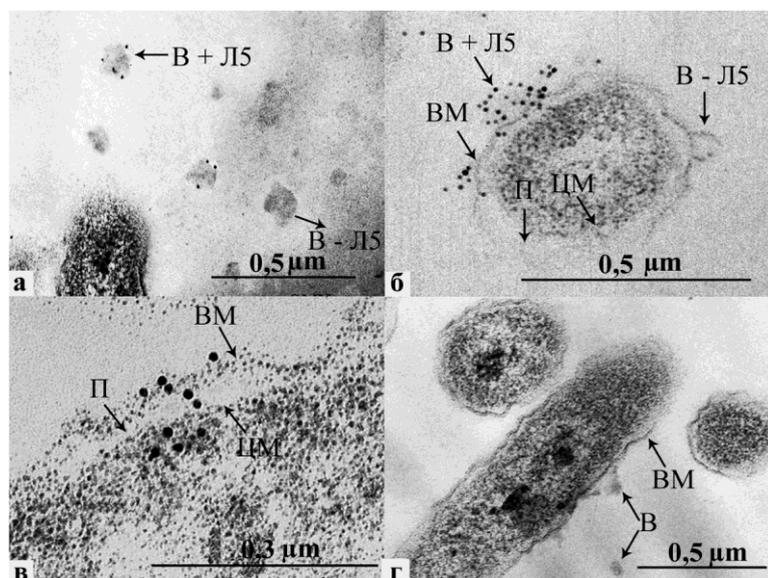


Рис. 3. Электронно-микроскопическая иммуноцитохимия.

а, б – *Lysobacter* sp. XL1 образует две субпопуляции везикул.

в – Белок Л5 концентрируется в определенных локусах периплазмы.

г – Контрольный образец.

ВМ, внешняя мембрана;

В, везикулы;

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. 3а). Образование этих групп везикул происходит в пределах одной бактериальной клетки (рис. 3б). Интересным результатом оказалось то, что в периплазматическом пространстве белок Л5 концентрируется в определенных локусах с внутренней

стороны внешней мембраны (рис. 3в), из которых в последующем формируются везикулы, содержащие его в своем составе (рис. 3б). 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 белка Л5 в образовании везикул у рекомбинантного штамма *P. fluorescens* Q2–87/В. Ранее была разработана экспрессионная система для бактериолитического фермента Л5 *Lysobacter* sp. XL1 на основе *P. fluorescens* Q2–87/В (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.

Методом электронной микроскопии было установлено, что штаммы Q2–87 (родительский) и Q2–87/В (рекомбинантный) формируют везикулы (рис. 4 а,б).

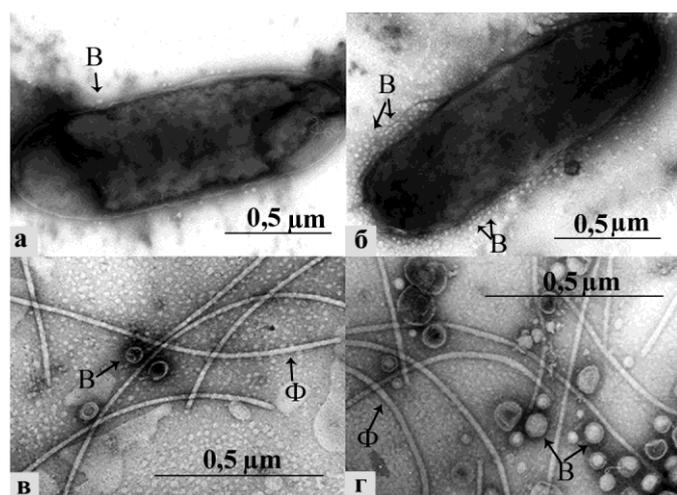


Рис. 4. Электронная микроскопия.

а – Препарат культуры *P. fluorescens* Q2-87.

б – Препарат культуры *P. fluorescens* Q2-87/В.

в – Препарат везикул Q2-87.

г – Препарат везикул Q2-87/В.

В, внешнемембранные везикулы;

Ф, фимбриеподобные структуры.

Однако штамм, продуцирующий литический фермент Л5, образует большее количество везикул, чем родительский (рис. 4б). Везикулы обоих штаммов были выделены и частично охарактеризованы.

Электронно-микроскопический анализ показал, что в препарате везикул штамма Q2–87/В содержится много везикул диаметром от 30 до 125 нм, в то время как везикулы Q2–87 имеют более однородный размер, не превышающий 100 нм.

В препарате везикул Q2–87/В содержится большее количество белка по сравнению с препаратом везикул Q2–87 (табл. 1).

Таблица 1. Содержание белка в препаратах везикул Q2–87 и Q2–87/В

Препараты	Общее содержание белка, мг мл ⁻¹
везикулы Q2–87	0,014±0,003
везикулы Q2–87/В	0,048±0,004

Приведены средние значения ± стандартное отклонение

Этот результат согласуется с данными электронной микроскопии о большем количестве везикул, образуемых рекомбинантным штаммом.

Сравнительная электрофореграмма белкового состава показала, что спектр мажорных белков в препаратах везикул различается (рис. 5а).

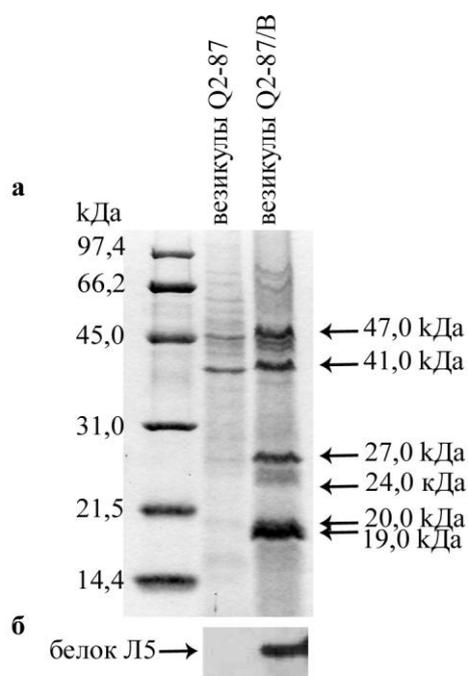


Рис. 5. а – Ds-Na – ПААГ. Электрофореграмма белкового состава везикул Q2–87 и Q2–87/В.

Образцы выравнены по объему.

б – Иммуноблоттинг препаратов везикул Q2–87 и Q2–87/В с поликлональными антителами к белку Л5.

Наряду с мажорными белками 41,0 кДа и 47,0 кДа, присутствующими в препаратах везикул обоих штаммов, в препарате везикул Q2–87/В мажорными также являются белки с молекулярными массами 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 полученными нами данными об образовании везикул, содержащих белок Л5, в определенных локусах внешней мембраны *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).

Белок Л5 в везикулах рекомбинантного штамма обнаруживали по наличию литической активности относительно тест-культур и иммуноблоттингом.

Иммуноблоттинг с антителами к ферменту Л5 показал, что этот белок достоверно выявляется в везикулах штамма Q2–87/В (рис. 5б).

Литическое действие препарата везикул Q2–87/В изучали в отношении живых бактерий методом спот–теста (табл. 2). Как видно из таблицы, препарат везикул обладает сильным литическим действием в отношении грамположительных бактерий и более слабым в отношении грамотрицательных бактерий.

Таблица 2. Литический эффект препарата везикул Q2–87/В

Бактерии	Литический эффект везикул
Грамположительные бактерии	
<i>Bacillus subtilis</i> W23	++
<i>Bacillus cereus</i> 217	++
<i>Micrococcus roseus</i> В 1236	++
<i>Micrococcus luteus</i> В1819	++
<i>Corynebacterium xerosis</i>	++
<i>Staphylococcus aureus</i> 209Р	++
<i>Rathayibacter tritici</i>	++
Грамотрицательные бактерии	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1472	++
<i>Pseudomonas putida</i>	+
<i>Proteus vulgaris</i> Н–19	+
<i>Proteus mirabilis</i> N2	+
<i>Escherichia coli</i> K12	++
<i>Erwinia caratovora</i> В15	++
<i>Alcaliganes faecalis</i>	+

++, сильный литический эффект; +, слабый литический эффект

Также было установлено литическое действие препарата везикул Q2–87/В в отношении живых патогенных бактерий: метициллинустойчивого штамма *S. aureus* 55 (MRSA) и *B. anthracis* 71/12 (рис. 6а, б).

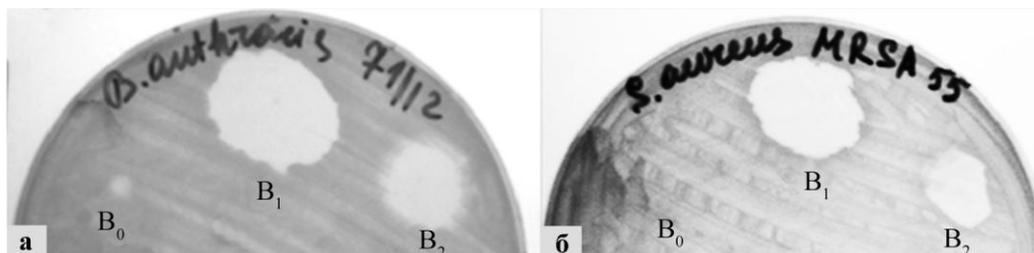


Рис. 6. Литический эффект препаратов везикул по отношению к живым патогенным бактериям методом спот–теста. **а** – Штамм *B. anthracis* 71/12. **б** – Штамм *S. aureus* 55 MRSA. В₀, везикулы Q2-87; В₁, везикулы *Lysobacter* sp. XL1; В₂, везикулы Q2-87/В.

На рисунке 6 также можно видеть, что действие везикул Q2–87/В (В₂) сопоставимо с действием везикул *Lysobacter* sp. XL1 (В₁).

Таким образом, можно заключить, что рекомбинантный штамм *P. fluorescens* Q2–87/В секретирует белок Л5 таким же путем, что и *Lysobacter* sp. XL1, то есть посредством везикул. Совокупность данных подтверждает способность этого белка влиять на везикулообразование.

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

Очевидно, что белок Л5 не единственный фактор, обуславливающий формирование 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.

Методом двумерной тонкослойной хроматографии установлено, 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. 7). 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, выявленный нами, соответствует им.

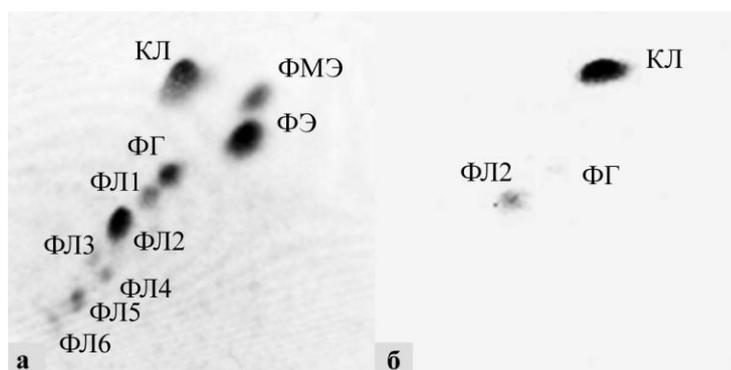


Рис. 7. Двумерная тонкослойная хроматография фосфолипидов внешних мембран и везикул *Lysobacter* sp. XL1. **а** – Спектр фосфолипидного состава внешних мембран. **б** – Фосфолипиды везикул. КЛ, кардиолипин; ФМЭ, фосфатидилмонометилэтаноламин; ФЭ, фосфатидилэтаноламин; ФГ, фосфатидилглицерол; ФЛ1, ФЛ2, ФЛ3, ФЛ4, ФЛ5, ФЛ6, неидентифицированные фосфолипиды.

В препарате везикул *Lysobacter* sp. XL1 обнаружен лишь один мажорный фосфолипид кардиолипин и небольшое количество фосфатидилглицерола и неидентифицированного фосфолипида ФЛ2 (рис. 7б). Полученный результат свидетельствует в пользу того, что везикулы образуются преимущественно из участков внешней мембраны, обогащенных кардиолипином.

Таким образом, установлено два фактора, участвующих в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1, – секретлируемый белок Л5 и кислый фосфолипид кардиолипин. Причем белок Л5 принимает участие в образовании определенной группы секреторных везикул, а кардиолипин, вероятно, участвует в биогенезе всего пула везикул *Lysobacter* sp. XL1.

В настоящее время биогенез везикул у грамотрицательных бактерий изучается довольно интенсивно. Все известные модели описывают участие в этом процессе компонентов клеточной стенки (белки, ЛПС, липопротеины) и неправильно свернутых периплазматических белков (белковый «мусор») (Kulp&Kuehn 2010). Однако факторы биогенеза везикул, установленные для *Lysobacter* sp. XL1, не описаны для других таксонов и не рассматриваются в этих моделях.

На основании полученных результатов мы предлагаем собственную модель биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1 (рис. 8): секреторные везикулы формируются при участии белка Л5, 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. Гидрофильная головка кардиолипина несет два отрицательных заряда, и из-за их межмолекулярного отталкивания возможно нарушение жесткости внешней мембраны в участках, обогащенных этим фосфолипидом, что в свою очередь может приводить к инициации формирования везикул.

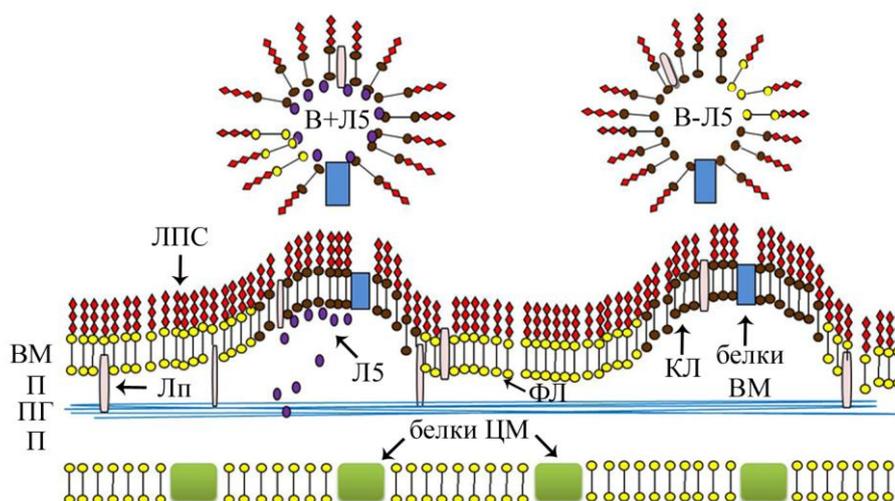


Рис. 8. Модель биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1.

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.

Из полученных данных можно предположить, что влияние белка Л5 на везикулообразование обусловлено его структурными особенностями.

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

Ранее было установлено, что гомологичный белку Л5, белок Л1 *Lysobacter* sp. XL1, использует невезикулярный путь секреции во внеклеточное пространство. Вероятно, секреция Л1 осуществляется посредством секреторного аппарата II типа (Васильева 2010), как это предполагается для α -литической протеазы *L. enzymogenes*. Поэтому мы предположили, что различия в топогенезе этих белков могут быть обусловлены их структурными особенностями.

2.1 Сравнительная структурная характеристика белков Л1 и Л5

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.

С полученных кристаллов собраны рентгенодифракционные данные и определены структуры с разрешением 1,35 Å для белка Л1 и 1,60 Å для белка Л5. Установлено, что полипептидная цепь каждой молекулы обоих белков формирует два гидрофобных домена, двойной β -баррель, между которыми расположен активный центр, представленный триадой аминокислот Ser/His/Asp. Такая структура характерна для всех представителей семейства сериновых протеаз S1 субклана PA(S) (Rawlings&Barrett 2013).

Для белка Л5 было выявлено ряд интересных особенностей. Так, в асимметричной части ячейки кристалла были обнаружены две молекулы белка Л5 с большим количеством контактов на мономер–мономер интерфейсе (рис. 9). Это вызвало предположение о димеризации белка. Однако методом эксклюзионной хроматографии и электрофорезом в нативных условиях было установлено, что белок Л5 является мономером.

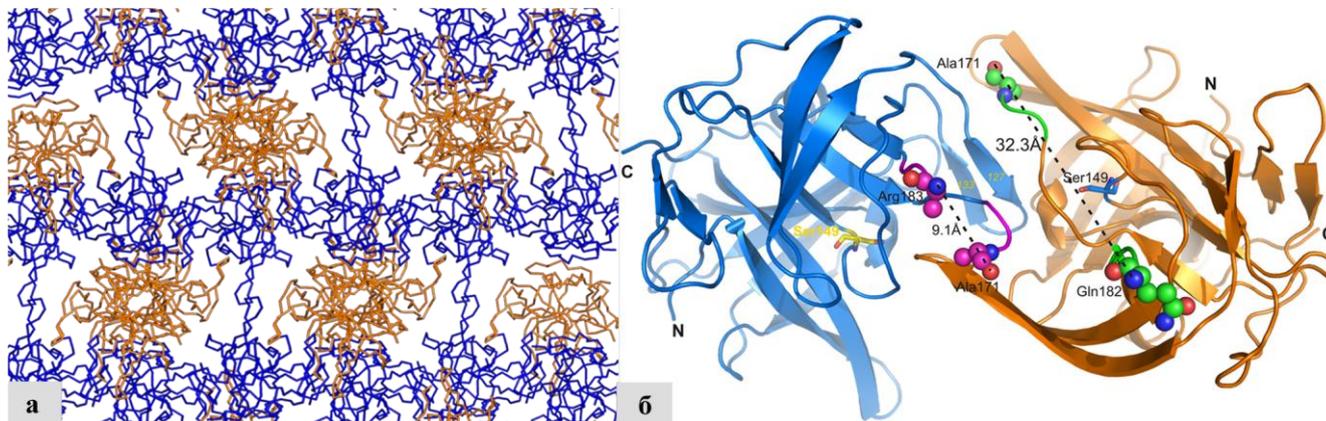


Рис. 9. Структура белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1.

а – Кристаллическая упаковка белка Л5. **б** – Структура молекул белка Л5 в асимметричной части ячейки.

Из рисунка 9б также видно, что две молекулы в асимметричной части ячейки кристалла белка Л5 не идентичны. 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.

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. 10). Между собой белки Л1 и Л5 идентичны на 63%.

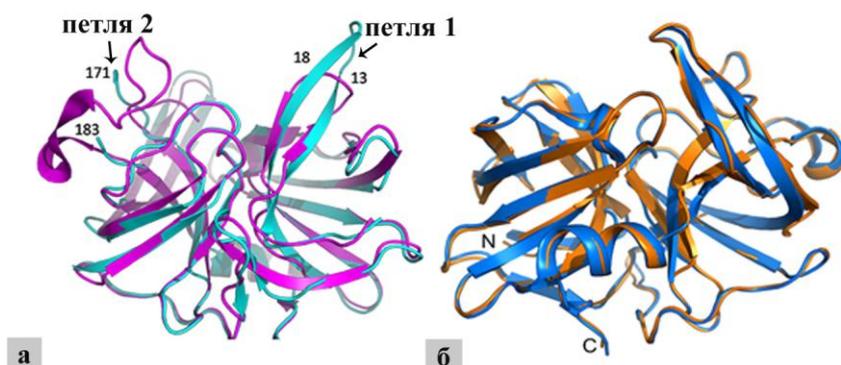


Рис. 10. Наложение структуры белков Л5 (розовый цвет) (**а**) и Л1 (желтый цвет) (**б**) на структуру α -литической протеазы (pdb – 2ALP).

В белке Л5 обращают на себя внимание две петли (рис. 10а). Первая петля соответствует участку 5 – 28 а.о. (на рис. 10а обозначены номера а.о. 13..18) и вторая петля соответствует участку 161 – 190 а.о. (на рис. 10а 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 об его накоплении в периплазматическом пространстве клеток *Lysobacter* sp. XL1 позволили сделать предположение об его способности формировать амилоидоподобные структуры. Вероятно, в везикулах этот белок находится в таком упорядоченном состоянии.

2.2 Изучение способности литической протеазы Л5 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. 11а).

Был проведен анализ белка Л5 методом дифракции рентгеновских лучей. В результате получены рефлексы 4,34 Å (рис. 11б) и 8,00 Å, которые свидетельствуют о наличии кросс-β-структуры, характерной для амилоидов.

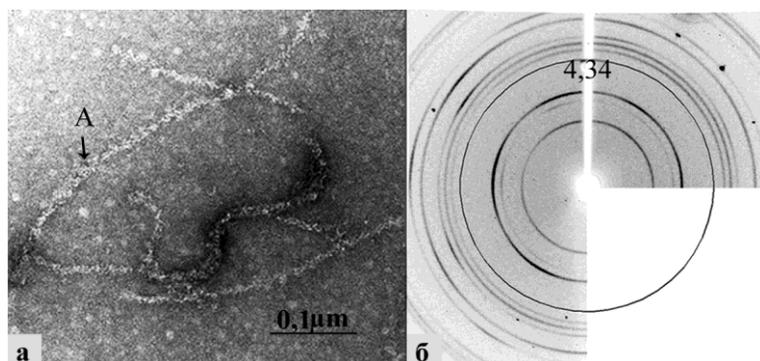


Рис. 11. Амилоидоподобная конформация белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1.

а – Электронная микроскопия. А, амилоидоподобные фибриллы.

б – Рентгенограмма препарата, полученная при дифракции рентгеновских лучей.

Таким образом, литическая протеаза Л5 *Lysobacter* sp. XL1 способна агрегировать в виде амилоидов. В периплазме бактерии и в самих везикулах белок Л5, вероятно, находится в амилоидоподобной конформации. И, возможно, именно способность к формированию амилоидоподобных структур является определяющей для везикулообразования. Это также объясняет, почему при накоплении белка Л5 в периплазме *Lysobacter* sp. XL1 в процессе секреции и формирования везикул не происходит гидролиза собственного пептидогликана.

Для бактерий известны так называемые функциональные амилоидоподобные упорядоченные структуры (Romero&Kolter 2014). Однако способность

бактериальных литических ферментов формировать такие структуры показана впервые.

2.3 Изучение специфичности литической протеазы Л5

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.

После действия белка Л5 на пептидогликан *S. aureus* 209P происходит общее падение глицина и аланина (табл. 3). Следовательно, в результате гидролиза пептидогликана белком Л5 высвобождаются N-концы именно этих аминокислот, которые становятся доступными для 2,4-динитрофторбензола. 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).

Таблица 3. 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

Приведены средние значения двух биологических повторов. В таблице приведены количества N-аминокислот, отнесенных к 1 нмолю Glu.

Способность белка Л5 гидролизовать амидные связи была подтверждена при использовании флюорогенного синтетического субстрата Abz–Ala–Ala–Phe–pNa, в котором белок разрушал связь только между фенилаланином и паранитроанилином.

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 была отмечена более низкая интенсивность гидролиза этого субстрата белком Л5 по сравнению с Л1.

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 для внутреннего применения невозможно из-за многокомпонентного состава. Подобные биомедицинские препараты должны соответствовать требованию известного

качественного и количественного состава. В связи с этим была проведена работа по конструированию антимикробных препаратов на основе литического фермента Л5 *Lysobacter* sp. XL1. Было выбрано два направления.

Первое – конструирование препаратов на основе ЭПС и белка Л5. Высокомолекулярный кислый ЭПС *Lysobacter* sp. XL1 (300 кДа) стабилизирует некоторые электростатически связанные с ним белки, усиливая их активность за счет изменений в кинетике реакций (Степная и др., 2001). Мы предположили, что такое взаимодействие может расширять возможности Л5 в отношении живых клеток.

Второе – конструирование липосомных препаратов на основе фосфолипидов везикул и белка Л5. За модель для конструирования данного препарата были взяты внешнемембранные везикулы как прототип высокоэффективного антимикробного препарата.

3.1 Литическая активность сконструированных антимикробных препаратов

Полученные препараты были проанализированы на способность лизировать живые патогенные бактерии родов *Bacillus* и *Staphylococcus* методом спот–теста (табл. 4). Было выявлено, что они обладают хорошим литическим действием в отличие от гомогенного белка Л5. Этот эффект также был подтвержден на суспензии живых клеток *S. aureus* 209Р турбидиметрическим методом.

Таблица 4. Литическая активность препаратов

Патогенные бактерии	ЭПС +белок Л5	Липосомный препарат на основе белка Л5	Гомогенный белок Л5
<i>B. anthracis</i> 71/12	++	++	–
<i>B. cereus</i> 771	++	++	–
<i>S. aureus</i> 55 MRSA	++	++	–
<i>S. aureus</i> 538 ПАТИ	++	++	–
<i>S. aureus</i> 209	++	++	–

++, хороший литический эффект; –, отсутствие литического действия

3.2 Лечебное действия антимикробного препарата на основе белка Л5 и ЭПС

Лечебное действие препарата на основе ЭПС и белка Л5 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 *S. aureus* 55 (MRSA). Первая группа мышей – контрольная (без лечения), вторая группа – леченая препаратом ЭПС в качестве контроля, и третья группа мышей – леченая сконструированным препаратом. 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).

Наибольшему воздействию при моделировании стафилококкового сепсиса подвергались почки. В таблице 5 приведены значения веса животных и обсемененности почек на 5, 9 и 15 сутки после заражения.

Таблица 5. 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	$1,35 \times 10^6$	$5,40 \times 10^6$	$1,58 \times 10^6$
2 группа мышей (ЭПС)	99,7	-19,4	$0,75 \times 10^7$	$0,59 \times 10^7$	$1,00 \times 10^7$
3 группа мышей (ЭПС + белок Л5)	97,0	+4,7	$0,65 \times 10^7$	$1,20 \times 10^4$	$1,85 \times 10^4$

Антимикробный препарат способствовал снижению обсемененности почек на два порядка (табл. 5). Кроме того, мыши к 15 дню после начала лечения прибавляли в весе по сравнению с контрольными группами, что также подтверждало наличие лечебного эффекта испытываемого препарата.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на интенсивное изучение бактериальных везикул, до недавнего времени не было информации о способности представителей рода *Lysobacter* их образовывать. Данная работа явилась продолжением исследований, связанных с изучением везикул грамотрицательной бактерии *Lysobacter* sp. XL1. Все представленные результаты получены впервые.

В настоящей работе показано, что *Lysobacter* sp. XL1 образует гетерогенные везикулы по размеру, плотности и белковому составу. Белок Л5 обнаруживается в определенной группе секреторных везикул. Везикулы этой группы отличаются и по суммарному белковому составу, что предполагает образование их в определенных участках мембраны. Это нашло подтверждение в иммуноцитохимических исследованиях ультратонких срезов колоний клеток *Lysobacter* sp. XL1. Установлено, что белок Л5 концентрируется в определенных локусах периплазмы, прилегающих к внутренней стороне внешней мембраны, из которых в дальнейшем и формируются секреторные везикулы. Все это указывает на то, что белок Л5 принимает участие в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1. Дополнительные доказательства этого получены при изучении везикулообразования у штамма *P. fluorescens* Q2-87/B, продуцирующего рекомбинантный белок Л5.

Другим установленным фактором биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1 является кислый фосфолипид кардиолипид. Инициация формирования везикул

может происходить из-за нарушения жесткости внешней мембраны в участках, обогащенных этим фосфолипидом.

На основании полученных данных предложена модель биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1: белок Л5 является фактором биогенеза определенной субпопуляции секреторных везикул, а кардиолипин, вероятнее всего, является одним из основных участников биогенеза всего пула везикул *Lysobacter* sp. XL1.

Изучены пространственные структуры литических протеаз Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1. Белок Л5 обладает рядом особенностей. Установлено, что он имеет плотную кристаллическую упаковку. При этом 50% молекул имеют разрыв в петле в участке между 172 и 182 а.о. Кроме того, в структуре белка Л5 выявлены две петли, имеющие существенные отличия от эквивалентных петель гомологов. Дальнейшие исследования могут позволить разобраться в значимости этих доменов как в отношении топогенеза, так и специфичности белка Л5.

Важным результатом явилось обнаружение способности белка Л5 агрегировать в виде амилоидов. Для бактериолитических ферментов ранее такого свойства показано не было. Эта способность позволяет объяснить, почему в процессе топогенеза белка Л5 не происходит гидролиза собственного пептидогликана. Формирование амилоидоподобных структур вблизи внутреннего листа внешней мембраны может обуславливать образование в этом участке везикул. Это является первым шагом к пониманию механизма действия белка Л5 в качестве фактора биогенеза везикул.

Литическая протеаза Л5 гидролизует пептидогликан стафилококка, проявляя эндопептидазную и амидазную активности, как и белок Л1. Однако гидролиз пептидогликана белком Л5 происходит менее интенсивно, несмотря на то что он обладает более сильным протеолитическим действием в отличие от Л1. Это еще раз подтверждает значимость структурных отличий, существующих между этими белками, для их функционирования.

Сконструированы препараты на основе фермента Л5 *Lysobacter* sp. XL1. Полученные препараты обладали выраженным литическим действием по отношению к живым клеткам клинических изолятов штаммов *Staphylococcus* и *Bacillus*. Был установлен лечебный эффект препарата на основе ЭПС и белка Л5 в отношении стафилококкового сепсиса, смоделированного у беспородных белых мышей. В результате его применения в качестве лекарственного средства происходило снижение обсемененности почек на два порядка. Будущие исследования будут способствовать дальнейшей разработке антимикробных препаратов на основе отдельных 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/В, продуцирующего его. Это указывает на особые свойства белка Л5, способствующие биогенезу везикул.
2. Мажорным фосфолипидом везикул *Lysobacter* sp. XL1 является кардиолипин. Кардиолипин 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. 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. doi: 10.1159/000346550.
2. 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. doi: 10.1159/000381266.
3. Kudryakova I.V., Suzina N.E., Vasilyeva N.V. Biogenesis of *Lysobacter* sp. XL1 vesicles // *FEMS Microbiol Lett.* – 2015. – V.362. – №18. – fmv137. doi: 10.1093/femsle/fmv137.
4. 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. doi: 10.1007/s00253-016-7524-6.
5. 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. doi: 10.1007/s10930-015-9645-7.
6. Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Винокурова Н.Г., Шишкова Н.А., Васильева Н.В. Изучение факторов биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1 // *Биохимия.* – 2017. – Т.82. – №4. – с.677 – 686.

Тезисы

1. Кудрякова И.В., Шишкова Н.А., Сузина Н.Е., Васильева Н.В., Степная О.А. Участие внешнемембранных везикул в секреции рекомбинантной литической эндопептидазы Л5 в *Pseudomonas fluorescens* // 16–я Международная Пущинская школа–конференция молодых ученых “Биология – Наука XXI века”. – 2012. – Пущино (Россия). – с.177 – 178.
2. Кудрякова И.В., Шишкова Н.А., Сузина Н.Е., Цфасман И.М., Васильева Н.В. Изучение биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1 // 17–я Международная Пущинская школа–конференция молодых ученых “Биология – Наука XXI века”. – 2013. – Пущино (Россия). – с.275 – 276.
3. Kudryakova I., Shishkova N., Suzina N., Tsfasman I., Vasilyeva N. The studying of biogenesis process of outer membrane vesicles produced by *Lysobacter* sp. XL1 // *The 38th FEBS CONGRESS.* – 2013. – St. Petersburg (Russia). – p.561.
4. Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Цфасман И.М., Васильева Н.В. Изучение особенностей образования везикул *Lysobacter* sp. XL1 // XI Международная научная конференция “Молодежь в науке”. – 2014. – Минск (Беларусь). – с.102.
5. Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Цфасман И.М., Васильева Н.В. Изучение роли секретлируемой литической эндопептидазы Л5 в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1 // 18–я Международная Пущинская школа–конференция молодых ученых “Биология – Наука XXI века”. – 2014. – Пущино (Россия). – с.147 – 148.
6. Kudryakova I., Suzina N., Tsfasman I., Vasilyeva N. The study of biogenesis features of outer membrane vesicles produced by *Lysobacter* sp. XL1 // *Journal of*

Extracellular Vesicles (UK–Russia Researcher Links Workshop: Extracellular vesicles – mechanisms of biogenesis and roles in disease pathogenesis). – 2015. – Moscow (Russia). – p.7 – 8.

7. Kudryakova I., Suzina N., Tsfasman I., Vasilyeva N. The study of biogenesis features of outer membrane vesicles produced by *Lysobacter* sp. XL1 // 6th FEMS Microbiology Congress. –2015. – Maastricht (The Netherlands). – p.1533.

8. Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Васильева Н.В. Литическая эндопептидаза Л5 *Lysobacter* sp. XL1: перспективы использования в биомедицине // IX Международная научная конференция “Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты”. – 2015. – Минск (Беларусь). – с.158 – 159.

9. 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. XL1 // III Пуштинская школа-конференция “Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов”. – 2016. – Пушкино (Россия). – с.99 – 101.