

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

На правах рукописи

ЧЕРТКОВ ОЛЕГ ВАЛЕРЬЕВИЧ

ЦИТОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИОФАГА фKZ

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

03.01.03 – молекулярная биология

03.02.02 – вирусология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,

заведующий лабораторией

Мирошников Константин Анатольевич

Москва, 2017 год

Оглавление

1. Введение	4
2. Обзор литературы	7
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – бактерия-хозяин бактериофага φKZ	7
2.2. Бактериофаги <i>P. aeruginosa</i>	8
2.3. Строение хвоста бактериофагов и механизм инфицирования	10
2.4. Базальная пластинка	11
2.5. Бактериофаг φKZ	16
2.6. Цитолитические ферменты бактериофагов	20
2.7. Классификация цитолитических ферментов бактериофагов	22
2.8. Пространственная структура цитолитических ферментов	23
2.9. Пептидогликан-связывающий домен	26
2.10. Модульная эволюция эндолизинов	28
2.11. Модульное строение цитолитических ферментов	29
2.12. Энзибиотики	30
2.13. Фаговая терапия	33
2.14. Сравнение терапии эндолизинами и фаговой терапии	35
2.15. Количественное измерение ферментативной активности пептидогликанлизирующих ферментов	37
3. Материалы и методы	38
3.1. Бактериальные штаммы	38
3.2. Среда для выращивания бактерий	38
3.3. Векторы для клонирования. Плазмиды	38
3.4. Ферменты	39
3.5. Полимеразная цепная реакция	39
3.6. Выделение и очистка ДНК	40
3.7. Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	40
3.8. Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> плазмидной ДНК	40
3.9. Сайт-направленный мутагенез	41
3.10. Количественные определения препаратов ДНК	41
3.11. Секвенирование ДНК	41
3.12. Селекция клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды	42
3.13. Экспрессия клонированных генов в <i>E. coli</i>	42
3.14. Проверка растворимости синтезированных белков	42

3.15.Выделение и очистка белков	43
3.16. Электрофорез белков в полиакриламидном геле	43
3.17. Определение олигомерности белка гель-фильтрацией	44
3.18. Спектр кругового дихроизма	44
3.19.Определение ферментативной активности белков	44
3.20. Моделирование и молекулярная динамика	45
4. Результаты и обсуждение	46
4.1. Введение	46
4.2. Делеционный мутагенез ПГ181	46
4.3. Анализ механизма действия ПГ144 методом точечного мутагенеза	56
5. Заключение	73
6. Выводы	74
7. Список используемых сокращений	75
8. Список литературы	76
Приложение 1	95

1. Введение

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

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

Однако, несмотря на ряд несомненных преимуществ использования фаговой терапии, имеется заметное число ограничений ее применения в клинической практике: фаговые препараты обладают довольно высокой степенью иммуногенности, низкая жизнеспособность, сложный процесс выделения и очистки фаговых частиц. Избежать этих недостатков поможет использование цитолитических ферментов бактериофагов в качестве антибактериальных препаратов. В настоящее время актуальная задача это поиск новых цитолитических ферментов бактериофагов, изучение их свойств и механизмов действия и создание химерных белков, или поиск вспомогательных соединений, способствующих проникновению через мембрану в случае грамположительных бактерий. Бактериофаг фKZ эффективно инфицирует *P. aeruginosa* и может быть использован как для фаговой терапии, так и в качестве источника высокоактивных цитолитических ферментов. Таким образом, использование цитолитических ферментов наряду с фаговой терапией может быть перспективным направлением в борьбе с бактериями, обладающими резистентностью к антибиотикам.

Цели работы

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

Задачи исследования

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

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

Основные положения выносимые на защиту

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

Научная новизна и практическая значимость работы

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

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

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

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

Апробация работы

При подготовке материалов по теме диссертации опубликовано четыре статьи. Результаты работы доложены на семи международных и российских конференциях.

2. Обзор литературы

2.1. *Pseudomonas aeruginosa* – бактерия-хозяин бактериофага фKZ

P. aeruginosa (синегнойная палочка) - грамотрицательная, аэробная бактерия, широко распространенная в природе и участвующая в минерализации органических веществ и способная разлагать разнообразные органические соединения [1]. В естественной среде обитания бактерии рода *Pseudomonas* обнаружены в воде и почве. Некоторые виды *Pseudomonas* часто находят в клинических образцах при патологических процессах, а поскольку *Pseudomonas* устойчивы к антибиотикам, лечение таких патологий, представляет собой большую проблему в современной медицине. *P. aeruginosa* является возбудителем различных инфекций дыхательной системы, желудочно-кишечного, урогенитального тракта, мягких тканей, а также системных инфекций, в основном у иммунокомпрометированных пациентов [2,3]. *P. aeruginosa* имеет способность быстро мутировать и приобретать множественную резистентность к широкому спектру низкомолекулярных антибиотиков, включая пенициллины, цефалоспорины, тетрациклин, хлорамфеникол и ванкомицин, а также антибиотики последних поколений.

Множественная устойчивость *P. aeruginosa* формируется сочетанием разных механизмов, преимущественно за счет насосов выброса (*эффлюксных насосов*, *efflux pumps*), аминогликозид-модифицирующих ферментов и модификацией участков воздействия антибиотиков. Наиболее эффективным считается механизм выброса, так как установлено, что именно он обеспечивает невосприимчивость к большинству классов лекарств [4]. Показано, что примерно 18% изолятов штаммов *P. aeruginosa* проявляют множественную устойчивость к антибиотикам [5]. Угроза здоровью и жизни пациентов, страдающих кистозным фиброзом, раком, СПИД и ожогами, уязвимых к инфекциям *P. aeruginosa*, серьезно возросла в связи с повышенной устойчивостью псевдомонад к коммерческим антибиотикам.

Наиболее изученный штамм *P. aeruginosa* (PAO1) имеет геном размером 6.3 млн п.о., включающий множество генов, продукты которых регулируют и осуществляют катаболизм, транспорт, секрецию из клетки и хемотаксис. Основную часть генома (90%) составляет консервативное ядро, однако гены ядра прерываются областями геномной пластичности, задействованными при горизонтальном переносе генов. С использованием такой потенциальной мозаичности генома *P. aeruginosa* может приспосабливаться к выживанию в широком диапазоне природных сообществ, усиливая те или иные стороны своего метаболизма [6].

Для защиты колонии бактерий от организма-хозяина *P. aeruginosa* образует биопленку - слой липополисахаридов (ЛПС), а также синтезирует эндотоксин А. Слой биопленки *P. aeruginosa* в основном образован полисахаридом альгинатом, который построен из ацетилированных маннуровой и гулуровой кислот, связанных β -1-4-связями [7]. Он обеспечивает существование колонии *P. aeruginosa* как единого организма. Кроме того, биопленка защищает колонию от факторов окружающей среды, определяет устойчивость к действию конкурирующих бактерий и защитных механизмов инфицируемого организма, а также повышает способность к захвату питательных веществ и выбросу отходов [8]. Интересно отметить, что биопленка также служит и своеобразным хранилищем для бактериофагов, которые требуются для регулирования популяции бактерий, хотя в толще биопленки фаги редко проявляют активность [9].

2.2. Бактериофаги *P. aeruginosa*

Бактериофаги были обнаружены для многих видов *Pseudomonas*, однако, наиболее распространенным хозяином, описанным в литературе, служит *P. aeruginosa*. Причина этого заключается, во-первых, в повсеместном распространении этой бактерии в почве и воде и, во-вторых, с поиском новых противобактериальных агентов именно против *P. aeruginosa*, ряд штаммов которой отнесены к умеренным патогенам. Большинство фагов, инфицирующих *Pseudomonas*, составляют хвостатые фаги, содержащие двуцепочечную линейную или циклизированную ДНК, описано и секвенировано лишь несколько бесхвостых представителей.

Фаги *Pseudomonas* известны давно и использовались для типирования псевдомонад [10] и экспериментов по фаговой терапии [11]. Наиболее известным комплектом фагов для фаготипирования является комплект Линдберга, созданный в 1964 г. (Рис. 1).

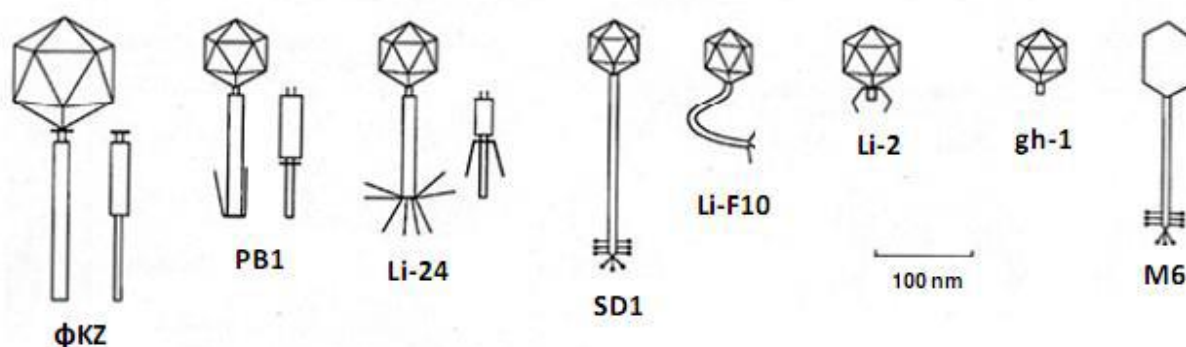


Рисунок 1. Изображение различных морфотипов фагов типизирующего комплекта Линдберга.

Хвостатые фаги *Pseudomonas* классифицированы в виде порядка *Caudovirales* и далее подразделяются на три семейства (*Myoviridae*, *Siphoviridae* и *Podoviridae*).

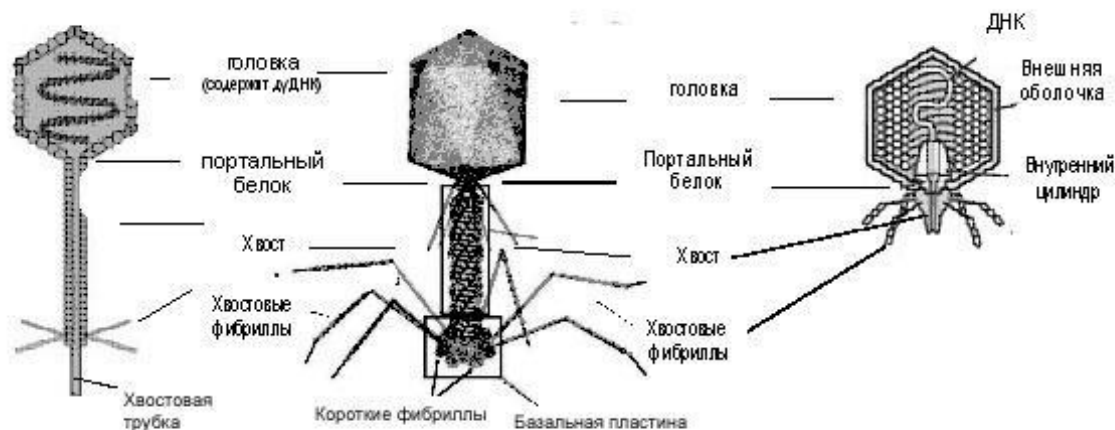


Рисунок 2. Основные морфологические элементы бактериофагов *Caudovirales*. Слева направо: *Siphovirus* (длинный несократимый хвост), *Myovirus* (длинный сократимый хвост) и *Podovirus* (короткий несократимый хвост).

Вирионы фагов *Pseudomonas*, семейства *Myoviridae* состоят из икосаэдрической головки сократимого хвоста, заканчивающегося базальной пластинкой. Сокращение хвоста при инфекции сопровождается укорочением чехла практически вдвое. «Шейка», или «воротничок», соединяющая хвост и головку фагов, заметно уже остального хвоста. Сравнительно небольшие базальные пластинки фагов имеют уплощенную форму и разветвленную сеть коротких фибрилл вокруг нее. Гигантский бактериофаг фKZ, также принадлежит к семейству *Myoviridae*.

Фаги *Pseudomonas*, принадлежащие к семейству *Siphoviridae*, имеют икосаэдрическую или вытянутую головку и гибкий несократимый хвост. Подавляющее большинство из них проявляют умеренный характер, то есть способность, кроме литического цикла развития, к лизогении внутри клетки-хозяина. Наиболее изученными представителями семейства являются фаги D3112, B3 и D3, имеющие морфологию типа SD1 и напоминающие λ -подобные вирионы. С точки зрения организации генома и цикла развития, фаги D3112 и B3 напоминают миовирус Mu. В отличие от них, фаг D3 имеет геномную организацию типа λ .

Фаги семейства *Podoviridae* также имеют икосаэдрическую головку и очень короткий несократимый, жесткий хвост. Наиболее изученные фаги *Pseudomonas*, семейства *Podoviridae*: gh-1 T7-подобный бактериофаг, Pap3 и F116.

2.3. Строение хвоста бактериофагов и механизм инфицирования

Хвост бактериофагов - это молекулярная машина обеспечивающие узнавание клетки хозяина, проникновение внутрь клетки и доставку ДНК в цитоплазму. В семействе *Caudovirales* хвосты бактериофагов бывают разного размера и морфологии, длина варьируется от 100 до 8000 А.

Хвосты бактериофагов семейств *Siphoviridae* и *Myoviridae* состоят из концевой части, которая распознает поверхность клетки хозяина и инициирует процесс инфицирования, хвостового чехла, проводящего ДНК и терминирующих белков, формирующих портал для связывания головки [12,13]. Фаги которые используют белковые рецепторы для связывания с клеткой, обычно имеют коническую концевую часть, а фаги которые используют полисахаридные рецепторы имеют сложные базальные пластинки на дистальном конце хвоста.

У семейств бактериофагов *Siphoviridae* и *Myoviridae* комплекс конца хвоста служит платформой и связывает субъединицы белков хвостового чехла. К комплексу конца хвоста присоединен белок “рулетки”, который определяет длину хвоста [14–16]. Этот белок вытянут вдоль центрального канала хвоста. В процессе полимеризации субъединицы белка хвоста образуют гексамерные кольца, уложенные друг на друга начиная с базальной пластинки, таким образом окружая белок “рулетки”. Когда растущая трубка достигает конца белка “рулетки”, полимеризация останавливается путем присоединения к гексамерному кольцу белка терминатора на вершине трубки и, возможно, к N-концу белка “рулетки” [17]. Фаги семейства *Myoviridae* обладают сократимой хвостовой оболочкой, которая собирается вокруг хвоста трубки. Полимеризация хвостового чехла также начинается с базальной пластинки и продолжается до вершины трубки. Субъединицы хвостового чехла организовываются в стопки гексамерных колец, повернутых относительно друг друга, тем самым формируя спираль [18-20]. Полимеризация хвостового чехла останавливается гексамером белка терминатора чехла, который связывается с белком терминатором трубки хвоста и взаимодействует с последним кольцом хвостового чехла [21]. У фагов семейства *Myoviridae* белок терминатора хвостового чехла формирует портал для присоединения головки, а у фагов семейства *Siphoviridae*, которые не имеют хвостового чехла, портал для присоединения головки формируется белком терминатором трубки хвоста.

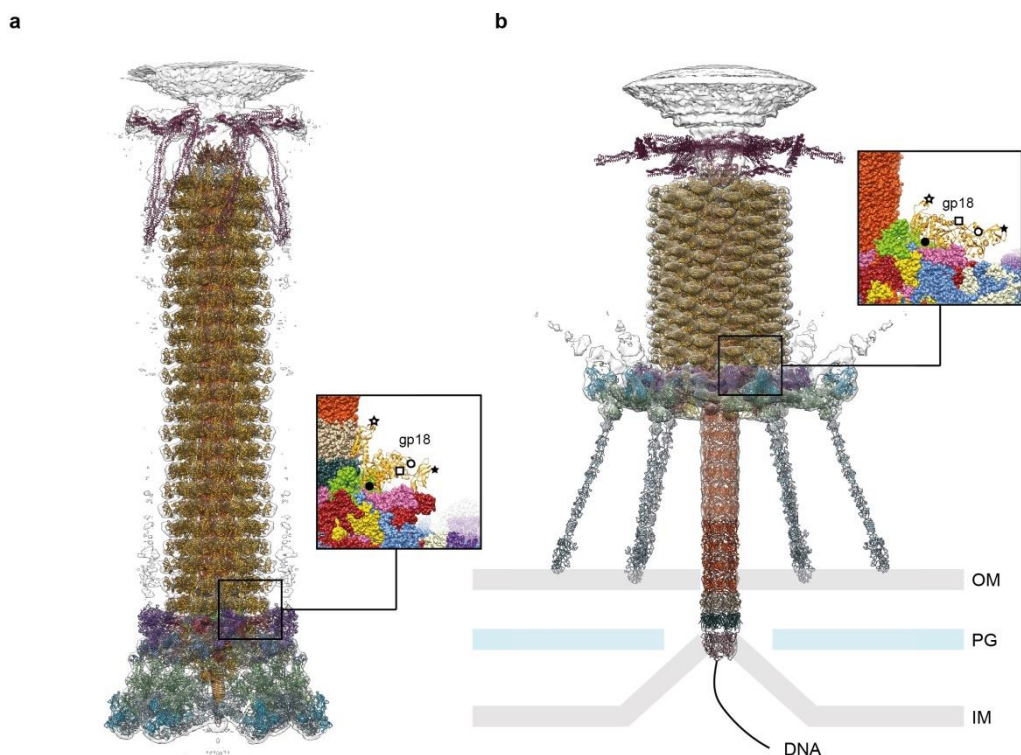


Рисунок 3. Псевдоатомная модель хвоста фага T4 в вытянутом (перед связыванием) (a) и сокращенном (после связывания) (b) состоянии. Вставки показывают увеличенный вид конформации белка gp18 в вытянутом и сокращенном положении хвостового чехла [22].

Белок “рулетки” вытянут вдоль собранной хвостовой трубки. Точная стехиометрия белка “рулетки” неизвестна, хотя для фага λ количество копий было определено как 6-7 [23]. Предсказания вторичной структуры указывают на наличие α -спиральной структуры по всей длине. В процессе инфицирования сигнал должен быть передан от базальной пластинки до белка шеи и привести в дальнейшем к открытию портала для выхода ДНК. Так как белок “рулетки” вытянут вдоль всей хвостовой трубки, то вполне вероятно, что он должен быть вовлечен в передачу сигнала. Альтернативно сигнал может быть передан через белки трубки хвоста [24]. В процессе инфицирования белок “рулетки” должен выходить из трубки хвоста перед впрыскиванием ДНК. У семейства бактериофагов *Siphoviridae* белок “рулетки” может быть вовлечен в создание канала для транспортировки ДНК через клеточную стенку бактерии [16].

2.4. Базальная пластинка

Базальная пластинка бактериофагов это очень большой и сложный белковый комплекс. Наиболее изученная базальная пластинка фагов семейства *Myoviridae* принадлежит бактериофагу T4, которая состоит из примерно 140 субъединиц и как минимум 16 различных белков. Жесткость базальной пластинке придают 6 длинных

хвостовых фибрилл и 6 коротких хвостовых фибрилл. Длинные хвостовые фибриллы, длиной 1450 А обратимо связываются с липополисахаридом (ЛПС) и/или с молекулой OmpC, что становится первичным узнаванием клетки хозяина [25]. Сигнал о связывании передается по длинным хвостовым фибриллам на базальную пластинку, в результате 6 коротких фибрилл разворачиваются и необратимо связываются с ЛПС. При связывании конформация базальной пластинки изменяется с куполообразной на конформацию звезды, что в свою очередь, вызывает сокращение хвостового чехла. Структуры базальной пластинки фага Т4 в конформации купола и звезды были определены при помощи криоэлектронной микроскопии [16,22,26], а структуры практически всех, 15 белков базальной пластинки определены при помощи кристаллографии [18,22]. Сравнение структур некоторых белков (pg10, pg11, pg12) показало, что они образовались путем дупликации генов [27].

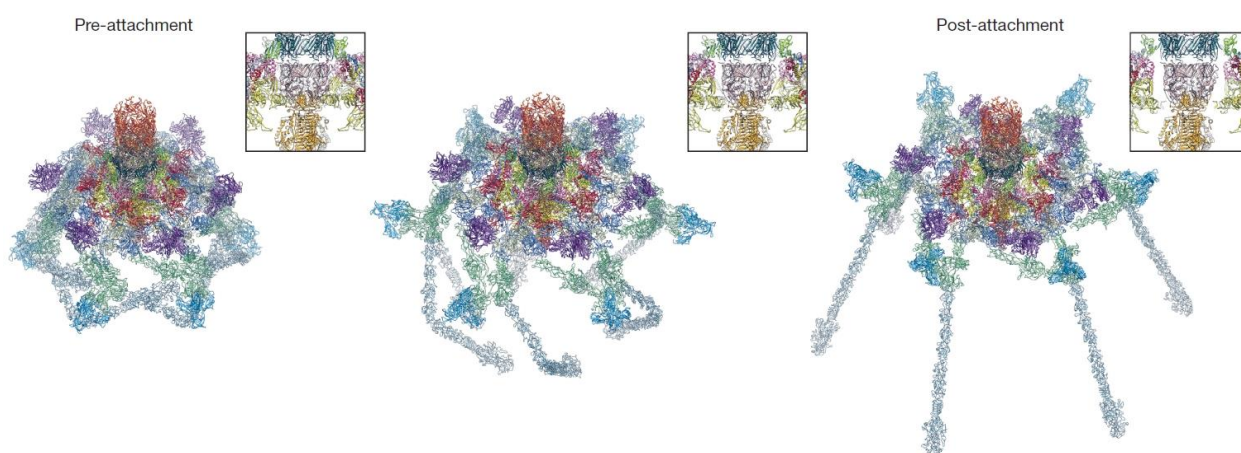


Рисунок 4. Конформационные изменения базальной пластинки фага Т4 при связывании с клеткой хозяина. Левые и правые изображения показывают состояние до и после связывания, полученные при помощи криоэлектронной микроскопии. Среднее изображение – модель переходного состояния. На вставке изображена центральная часть комплекса базальной пластинки, демонстрирующая освобождение комплекса трубки хвоста центрального шипа. Структура центральной части комплекса остается неизменной в процессе трансформации [22].

Большинство структур базальной пластинки фага Т4 имеет гексамерную симметрию. Однако, центральный хаб базальной пластинки сформирован тримером белка pg27. Белок pg27 состоит из 4 доменов, 2 из которых напоминают структуру белков трубки хвоста. В базальной пластинке эти домены формируют псевдо гексамерное кольцо, которое также было обнаружено в несократимом хвосте фагов семейства *Siphoviridae*. На основании этого факта, можно предположить, что такая структура хаба базальной пластинки общая для всех бактериофагов. Тример pg27 связывает центральный шип, образованный

тримером пг5 [28]. Белок пг5 состоит из трех доменов: *N*-концевого домена олигосахарид/олигонуклеотид связывающего, центрального домена лизоцим-подобного, имеющего пептидогликанлизирующую активность и *C*-концевого домена образованного переплетенными β -спиралями. На конце β -спирали недавно обнаружили еще один мономерный белок пг5.4, который заостряет центральный шип [29]. В процессе инфицирования центральный шип протыкает клеточную мембрану и лизоцимный домен пг5 лизирует пептидогликан, позволяя проникнуть ДНК фага в периплазму *E. coli*.

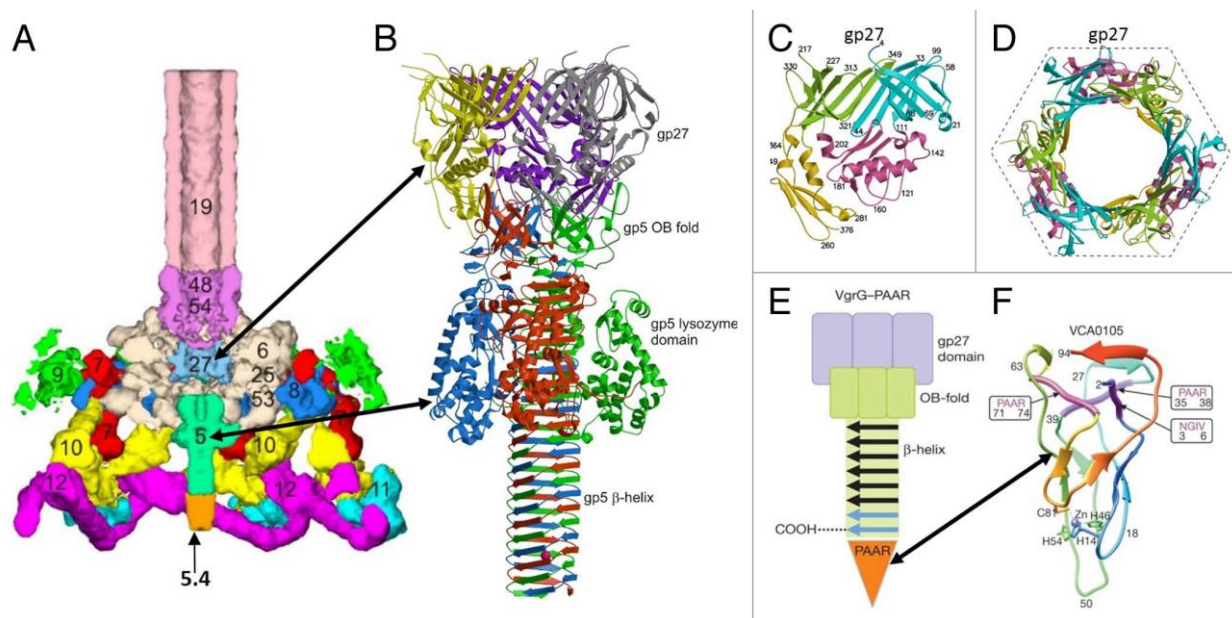


Рисунок 5. Структура базальной пластинки фага T4 и комплекса протыкающего клетку. (A) Поперечное сечение базальной пластинки фага T4. Различные белки отмечены различными цветами и пронумерованы соответственно номерам генов. (B) Структура комплекса тримера пг27-пг5. (C) Домен пг27 сходный с белком трубки хвоста. (D) Псевдогексамерные кольца сформированные тримером домена пг27 сходного с белком трубки хвоста [18]. (E) Схематическое представление бактериальной системы секреции IV. (F) Структура белка с PAAR-повторами [29].

Похожая структурная организация хвоста с центральным шипом наблюдается и у бактериальной системы секреции VI. Эта система отвечает за перенос токсичных молекул, позволяя хищным бактериям убивать прокариотические и эукариотические клетки. Белковый комплекс VgrG бактериальной системы секреции VI соответствует комплексу пг27 и пг5, только без лизоцимного домена. На конце β -спирали VgrG находится заостряющий шип белок с повторяющимися последовательностями PAAR и содержащий атом цинка [29].

Протыкающие клетку центральные шипы фагов P2 и ф92 структурно похожи на пг5 фага T4, но без лизоцимного домена, однако различия есть в том, как переплетаются

3 мономера, образуя β -спираль. Фаги P2 и ϕ 92 не кодируют отдельный белок заостряющий шип, вместо этого гомологи пг5 имеют в С-концевой заостренной области связанный ион железа [30].

Наиболее изученные базальные пластинки фагов семейства *Siphoviridae* принадлежат фагам p2 и TP901-1, инфицирующих грамположительную бактерию *Lactococcus lactis* [31,32]. Оба фага используют олигосахариды как рецепторы для связывания с клеткой хозяина. Базальная пластинка фага p2 состоит из 3 различных белков: Dit (ORF15), Tal (ORF16) и белка связывающего рецептор (ORF18). Белок Dit образует 6-членное кольцо под трубкой хвоста. Центральная часть гексамера Dit, образованная N-концевыми доменами 6 мономеров, очень похожа на белки трубки хвоста. К С-концевому домену, каждого из 6 белков Dit, присоединен тример белков связывающих рецептор. Таким образом, на фаговую частицу приходится 18 копий белка связывающего рецептор.

Тример белка Tal присоединен к дну кольца из белков Dit. Структурно белок Tal имеет высокую степень гомологии с пг27 фага T4. Как и пг27, Tal состоит из 4 доменов, 2 из которых имеют структурную гомологию с белком трубки хвоста. Однако, в отличие от фага T4, базальная пластинка фага p2 не содержит центрального шипа, присоединенного к белку Tal. У базальной пластинки фага p2 существует 2 конформационных состояния: релаксированное и активное. Переход от релаксированного к активному состоянию инициируется ионом Ca^{2+} , что обязательно для инфицирования фагом P2. В присутствии иона Ca^{2+} тример белка связывающего рецептор поворачивается на 200° приобретая ориентацию “вниз”, открываясь сайтами связывания к поверхности клетки. Активация базальной пластинки, также становится результатом конформационных изменений в тримере белка Tal, которые открывают пространство для прохода ДНК [32].

Базальная пластинка фага TP901-1 состоит из 6-членного кольца белка Dit, который связывает 6 тримеров белков верхней части базальной пластинки (VppU) [33]. Каждый мономер VppU взаимодействует с тримером белка связывающего рецептор. Таким образом, на фаговую частицу приходится 54 копий белка связывающего рецептор, что в 3 раза больше чем в фаге p2. Однако, фаг TP901-1 не нуждается в активации ионами Ca^{2+} . Он постоянно остается в состоянии готовности к инфицированию, а его белки связывающие рецептор ориентированы для связывания с поверхностью клетки. К кольцу гексамера Dit присоединяется тример белка Tal. N-концевая часть белка Tal имеет высокую степень гомологии с аналогичным белком фага p2 и пг27 из фага T4, в то время как С-концевая часть формирует центральный шип и содержит предсказанный домен ПФЛ.

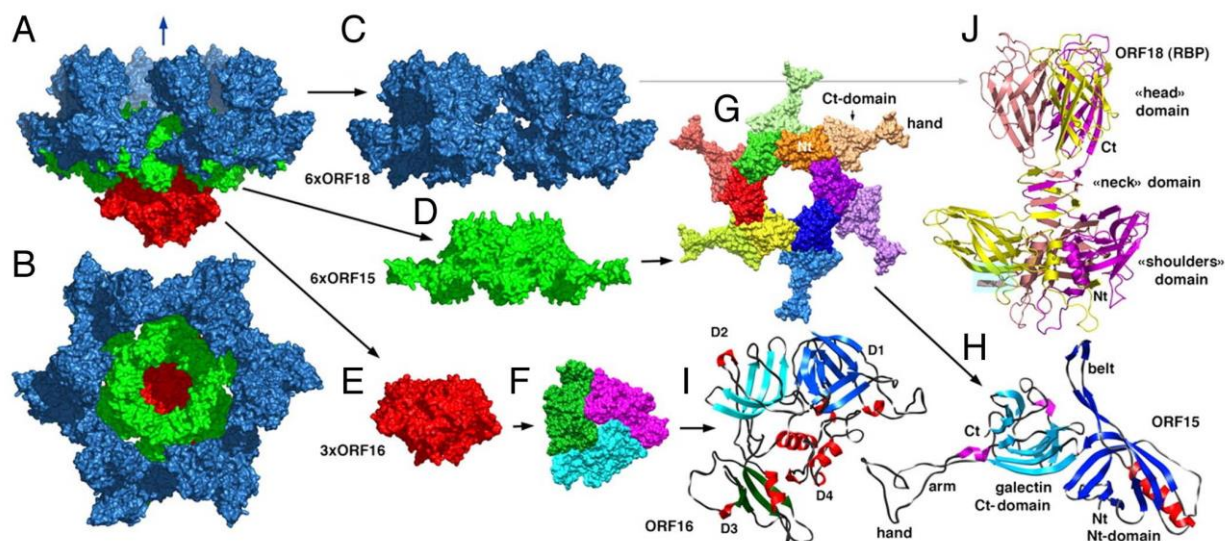


Рисунок 6. Кристаллическая структура базальной пластинки и ее компонентов фага P2. (A) Поверхность базальной пластинки; ORF15(Dit), ORF16(Tal), ORF18(белок связывающий рецептор). (B) Базальная пластинка повернутая на 90°. (C) Тример ORF18. (D) Гексамер ORF15. (E) Тример ORF16. (F) Тример ORF16 повернут на 90°. Гексамер ORF15, в той же ориентации, что и (B). (I), (J), (H). Кристаллические структуры ORF16, ORF18 и ORF15, соответственно [32].

Белки, аналогичные Dit, также найдены в бактериофаге SPP1 [34], который инфицирует в грамположительные бактерии и бактериофаге T5 [35,36] который инфицирует грамотрицательные бактерии. Данные фаги не имеют базальной пластинки, но имеют белковый комплекс, сужающий хвост на конце. Фаг T5 имеет белок аналогичный белкам Tal фага p2 и пг27 фага T4, которые связаны с Dit и центральному хвостовому шипу, в то время как фаг SPP1 имеет Tal/пг27 гомологичную область в N-концевой части белка фибриллы [37].

Центральная часть конца хвоста имеет обычную для длиннохвостовых фагов архитектуру. Гексамер Dit подобного белка, присоединенного к трубке хвоста, служит переходником для белков локализованных на периферии базального комплекса. Tal/пг27-подобный тример присоединяется ниже Dit гексамера. Два домена Tal/пг27 образуют псевдо гексамерное кольцо, которое образует адаптер между 6-мерным доменом Dit и тримером центрального шипа. Хвостовая трубка начинается с Tal/пг27-подобного белка, продолжается Dit-подобным белком, затем белком терминатором трубки и заканчивается кольцом белков формирующих капсид на вершине хвоста. Все эти белки, вероятно, имеют общее эволюционное происхождение.

Структура и периферическая часть базальной пластинки различных бактериофагов различаются в размерах и сложности организации и зависят от специфичности и

характера взаимодействия между бактерией и фагом. Однако, белки связывающие рецептор имеют общие особенности. Почти все они являются тримерами и соединены с фагом за N-концевую часть. Цепи субъединиц в тримере, как правило, взаимосвязаны. Белки связывающий рецептор обычно имеют β -структурные участки и содержат β -спираль.

2.5. Бактериофаг фKZ

Бактериофаг фKZ - это гигантский вирус, принадлежащий к семейству *Myoviridae*, который инфицирует бактерию *P. aeruginosa* [38,39]. Бактериофаг фKZ эффективно инфицирует *P. aeruginosa* и, вероятно, может быть использован для фаговой терапии.

Геном бактериофага фKZ имеет размер 280334 пар оснований и представляет собой линейную, переставляемую по кругу двухнитевую молекулу ДНК. При анализе генома было найдено 306 открытых рамок считывания, которые варьируются по размеру от 50 до 2237 аминокислотных остатков [39]. Целый ряд открытых рамок считывания кодирует продукты, сходные с функционально важными продуктами генов про- и эукариот.

Частица бактериофага фKZ имеет длинный сократимый хвост, оканчивающийся базальной пластинкой, и гигантский икосаэдрический капсид диаметром 120 нм, содержащий двухнитевую ДНК (рис. 7). Уникальный признак бактериофага фKZ - наличие в капсиде внутреннего тела - спиралевидного образования цилиндрической формы, представляющего собой, белковую структуры с намотанной на нее ДНК. Наличие внутреннего тела показано при исследовании ультратонких срезов инфицированных бактериальных клеток *P. aeruginosa*. Благодаря большому размеру своего капсида бактериофаг фKZ может накапливать большие участки бактериальных ДНК [40,41]. Таким образом, возможно, бактериофаг фKZ может быть связующим звеном между прокариотами со сравнительно простой укладкой ДНК и эукариотами, имеющими сложную организацию ДНК – хромосомы.

Так же как и в бактериофаге T4, инфицирование *P. aeruginosa* бактериофагом фKZ начинается с присоединения хвостовых фибрилл к внешней мембране клетки. Это связывание инициирует конформационные изменения в базальной пластинке, что влечет за собой сокращение хвостового чехла и позволяет хвостовой трубке проникнуть через мембрану к клеточной стенке и далее внутрь клетки и приводит к проникновению ДНК бактериофага внутрь бактериальной клетки.

Хвостовой чехол собран вокруг центральной хвостовой трубки, и состоит из 44 колец, каждое из которых образованно шестью субъединицами пг29. Пг29 бактериофага фKZ молекулярной массой 77 кДа очень похож на аналогичный по функции структурный

белок пг18 бактериофага Т4 массой 71 кДа, однако, сходства в их последовательности выявлено не было. Тем не менее, форма плотности полученной криоэлектронной микроскопией, отображающей мономеры структурных белков, очень схожа для пг29 и пг18.

Базальная пластинка бактериофага фKZ имеет гексагональную форму и расширяется при сокращении хвоста. Форма и размер базальной пластинки фKZ отличается от куполообразной гексагональной базальной пластинки бактериофага Т4 с растянутым хвостовым чехлом [21,42], что указывает на структурные различия механизмов инфицирования клеток. Тем не менее, как и в случае Т4 у бактериофага фKZ наблюдается повышенная плотность в середине базальной пластинки, что похоже на иглоподобный, протыкающий мембрану механизм у бактериофага Т4. Это образование скорее всего состоит из пг181 (2237 а.о.), который как и протыкающий клетку белок бактериофага Т4 пг5 [27], содержит лизоцим-подобный домен (остатки 1866-2051) [43].

На изображении вирусной частицы фKZ, полученном при помощи криоэлектронной микроскопии, были обнаружены 6 коротких хвостовых фибрилл, присоединенных к базальной пластинке.

К настоящему моменту установлены кристаллические структуры трех белков, входящих в состав вирусной частицы бактериофага фKZ: белок образующий хвостовой чехол пг29 [44], белок базальной пластинки пг131 [45] и эндолизин пг144 [46]. Пг29 состоит из трех доменов, два из которых имеют высокую степень структурной гомологии с доменами II и III белка хвостового чехла бактериофага Т4. Пг29 образуют гексамерные диски с отверстием в середине, которые укладываются друг на друга с поворотом на 22° относительно друг друга. В целом, структуры хвостовых чехлов фагов фKZ и Т4 организованы одинаково, внешние диаметры имеют сходные величины, однако, внутренний диаметр хвостового чехла фKZ больше, чем у Т4. Пг131 локализован на периферии базальной пластинки. Структурно он представляет собой семилепестковый β-пропеллер, образующий торроид. Небольшая, но консервативная часть белка заряжена отрицательно и может играть важную роль в связывании субстрата или во взаимодействии с другими белками хвоста. По-видимому, пг131 связан с проксимальной областью хвостовых фибрилл и, возможно, связывается с рецепторами клеточной стенки бактерии.

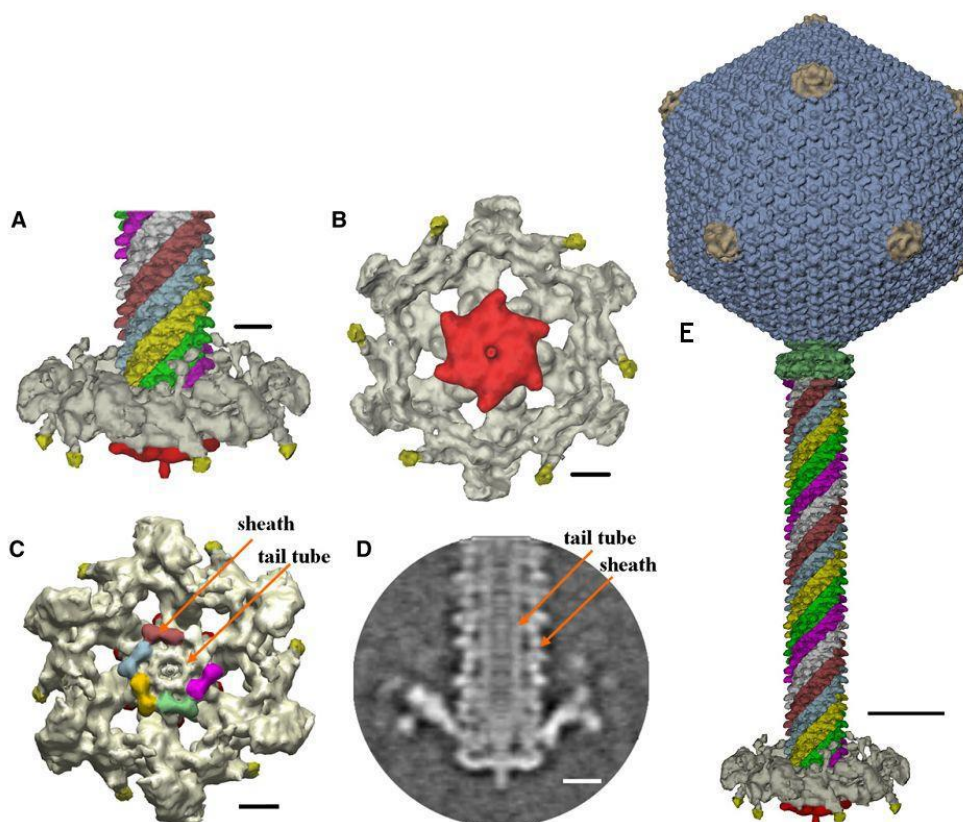


Рисунок 7. Реконструкция области базальной пластинки хвоста бактериофага ϕKZ . А: вид сбоку, В: вид снизу, С: вид сверху; D - распределение плотности центральной секции базальной пластинки. Белки хвостового чехла организованы в виде спиралей с общей осью симметрии 6-го порядка. Каждая спираль указана отдельным цветом. Базальная пластинка окрашена серым, комплекса протыкания клеточной стенки (красная), места примыкания хвостовых фибрилл (желтая). Масштабная линейка 10 нм; E - Трехмерная модель вириона фага ϕKZ , разрешение 28 Å. Масштабная линейка - 200 нм [41].

Пг144 был успешно клонирован и экспрессирован в *E. coli* под T7 промотором [47]. Наиболее консервативным остатком пг144 при сравнении с другими трансгликозилазами является остаток Glu¹¹⁵, который служит карбоксильной группой активного центра фермента.

При помощи рентгеноструктурного анализа была определена пространственная структура пг144 с разрешением 2,6 Å (рис. 8) [46]. Пг144 разрезает пептидогликаны, принадлежащие к "A γ " семейству [48] грамотрицательных бактерий, к которому принадлежит и *P. aeruginosa* [49,50]. Активность пг144 в 143 раза превышает активность куриного лизоцима [49,51]. Максимальной активности фермент достигает при pH 6,2 [49].

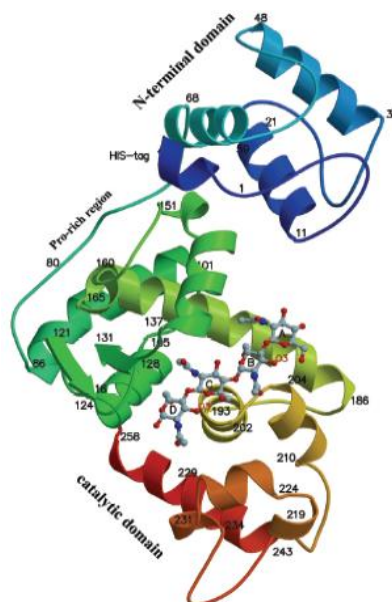


Рисунок 8. Пространственная структура pg144 в комплексе с хитотетраозой (NAG)₄. Разрешение 2.6 Å [46].

N-концевой домен pg144 относится к группе доменов, в среднем включающих 70 аминокислотных остатков и представляющих собой пучок из трех α -спиралей. Впервые структура этого типа была описана в составе Zn-зависимой Ala-Ala карбоксипептидазы [52], а позже обнаружена у ряда ферментов, разрушающих клеточные стенки бактерий [53]. Было экспериментально показано, что химерная конструкция N-концевого домена pg144 с GFP связывается с клеточными стенками [49]. Гомология пептидогликан-связывающего домена pg144 с модулями этой группы значительно ниже, чем у каталитического домена pg144 и других трансгликозилаз. Это, видимо, связано с сохранением лишь общей архитектуры домена, в то время как аминокислотные остатки, ответственные за связывание с конкретными участками пептидогликана, различаются. Наличие дополнительного, помимо собственно активного центра фермента, домена связывания с субстратом, скорее всего, объясняет повышенную селективность эндолизина pg144 и отсутствие цитотоксического действия на *E. coli* [47].

Структура C-конца pg144 (остатки Thr²¹³ - Lys²⁴³) отличается от структур SLT70 и от других лизоцимов. Эти остатки вместе с остатками Phe²⁰¹ - Arg²⁰⁹ формируют полость на поверхности pg144. Полость расположена близко к субсайту D, который связывает NAM. Структура комплекса pg144 с (NAG)₄ предполагает, что пептид ковалентно связанный с эквивалентным остатком NAM в нативном субстрате, может находиться в удобной позиции для связывания с поверхностью полости pg 144.

Помимо предложенного каталитического домена, структура и функции остальной части белка pg181 неизвестны. Ген 181 полностью транслируется в белок, который после

протеолитического процессинга - делеции 150-ти N-концевых остатков - включается в состав частицы фага. Судя по интенсивности полосы при электрофорезе белков бактериофага фKZ, в частице содержится не менее 6 копий пг181 [39].

Можно предположить, что каскад белков-эндолизин фKZ действует по той же схеме, что и у наиболее изученных представителей этого семейства Т-четных бактериофагов *E. coli*. Домен эндолизина в составе пг181 обнаружен в числе структурных белков вириона фага [39] - аналогично пг5 фага Т4 [27]. Поэтому второй белок, пг144, должен был бы являться лизоцимом-помощником, способствующим высвобождению собранной фаговой частицы из клетки-хозяина, подобно пге фага Т4. Однако, иммунологический анализ показал, что пг144 также входит в состав вириона, причем предположительно входит в состав хвоста или базальной пластинки, так как мутант фага фKZ ts13, продуцирующий только капсиды фага, не дает иммунной реакции на сыворотку против белка пг144 [47].

На основании этих данных, можно предположить, что лизоцим пг144 находится в составе белкового комплекса хвоста фага и участвует в процессе первичного узнавания и инфицирования клетки-хозяина.

Бактериофаг фKZ имеет ряд уникальных особенностей в механизме инфицирования и лизиса клеточной стенки бактерии: пг181 состоит из белка «рулетки», пептидогликанлизирующего домена и, по-видимому, иглоподобной β -спирали, протыкающей клеточную мембрану, а пг144 входит в состав зрелой вирусной частицы и, возможно, участвует в первичном инфицировании. Данные факты указывают на отличия в системе инфицирования от более изученных фагов с сократимым хвостом. В данной работе мы сфокусировались на изучении цитолитических ферментов бактериофага фKZ и их механизмов действия. Эти исследования помогут лучше понять механизм инфицирования бактериофага фKZ, а также, возможно, помогут найти новые перспективные ферменты для применения в качестве «энзимбиотиков» для лечения и профилактики бактериальных инфекций.

2.6. Цитолитические ферменты бактериофагов

Для всех бактериофагов перенос его генетического материала внутрь клетки хозяина и выход из клетки новых синтезированных фагов - необходимые составляющие жизненного цикла. Клеточная поверхность бактерий состоит из нескольких сложноорганизованных и упорядоченных слоев, которые служат защитной преградой от различных внешних воздействий на бактериальную клетку. У прокариот наиболее часто встречается двухслойная клеточная стенка состоящая из пептидогликана и внутренней

клеточной мембраны (грамположительные бактерии) или трехслойная состоящая из наружной мембраны, пептидогликана и внутренней мембраны (грамотрицательные бактерии) [54,55] (рис. 9). В процессе инфицирование клетки хозяина фагу сложнее всего преодолевать пептидогликановый слой. Он состоит из чередующихся остатков *N*-ацетилглюкозамина и *N*-ацетилмурамовой кислоты, соединенных между собой через β -1,4-гликозидные связи (рис. 10). К *N*-ацетилмурамовой кислоте присоединяются короткие пептидные фрагменты, образующие сшивки между соседними гликановыми цепочками. Многообразие пептидогликанов различных видов бактерий обусловлено, в основном, именно различием в пептидной части.

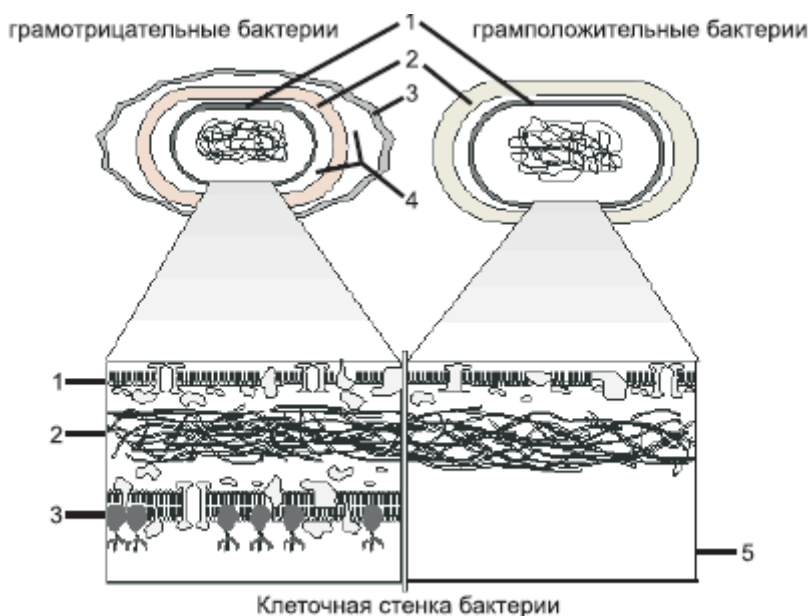


Рисунок 9. Клеточная стенка грамотрицательных и грамположительных бактерий. 1 – цитоплазматическая мембрана, 2 – пептидогликан, 3 – наружная мембрана, 4 – периплазматическое пространство, 5 – внешняя среда [56].

Блоки пептидогликанов (муреин), сшиваются между собой и образуют фактически единую гигантскую макромолекулу, которая определяет прочность пептидогликанового слоя и его непроницаемость для вирусных частиц и токсических факторов с большой молекулярной массой. Таким образом, фагу необходимо локально нарушить целостность клеточной стенки для инфицирования и переноса генетического материала фага внутрь клетки [57].

Литические ферменты бактериофагов разделяются на 2 типа: экзолизины, входящие в состав вирионов и расщепляющие пептидогликан при проникновении бактериофага в клетку и эндолизины, в основном, растворимые ферменты, экспрессирующиеся на последнем этапе инфицирования, осуществляющие “лизис изнутри”, в результате чего бактериальная клетка-хозяин погибает, а новые зрелые вирусные частицы выходят

наружу. В геноме бактериофага эндолизины вместе с холинами являются частью литического модуля. В ходе литического цикла эндолизины накапливаются в цитоплазме во время созревания вирусных частиц. Поскольку у эндолизинов нет сигнального пептида, они не могут пересечь цитоплазматическую мембрану. Этот процесс происходит благодаря холинам [58]. Холины экспрессируются в основном на последней стадии бактериальной инфекции и образуют каналы во внутренней мембране, позволяющие эндолизинам проникнуть за пределы мембраны и расщепить пептидогликан, что приводит к лизису бактериальной клетки. Эндолизины имеют узкий спектр литической активности, т.е. их способность лизировать бактерии часто ограничена конкретными видами и штаммами.

2.7. Классификация цитолитических ферментов бактериофагов

Бактериофаги расщепляют пептидогликановый слой бактерии с помощью литических ферментов, которые обобщенно можно назвать лизоцимами. По способу связывания и расщеплению субстрата фаговые литические ферменты подразделяются на: 1) лизоцим-подобные мурамидазы EC 3.2.1.17; 2) N-ацетилмурамоил-L-аланин амидазы EC 3.5.1.28; 3) пептидазы EC 3.4.17 [59] (рис. 10). Лизоцим-подобные литические ферменты гидролизуют N-ацетилмурамоил-1,4,- β -N-ацетилглюкозаминовую связь в молекуле пептидогликана и подразделяются на мурамидазы и литические трансгликозилазы. В качестве примера мурамидаз можно привести лизоцим - продукт гена *e* бактериофага T4, а в качестве примера трансгликозилазы - продукт гена *R* фага λ . N-ацетилмурамоил-L-аланин амидазы гидролизуют связь между N-ацетилмурамовой кислотой и L-аланином, а пептидазы - пептидную связь между ϵ -аминогруппой *m*- α - ϵ -диаминопимелиновой кислоты и карбонильной группой D- аланина. Примером амидазы может служить продукт гена 15 бактериофага T7, а пептидазы – лизоцим фага ϕ 6 (рис. 10).

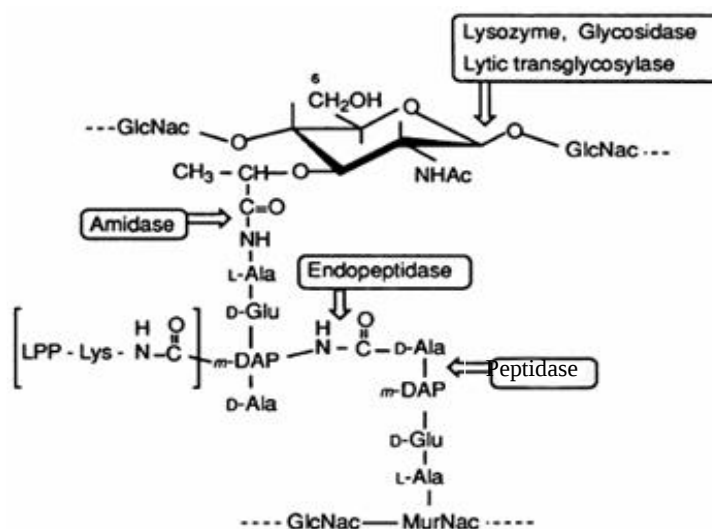


Рисунок 10. Литические ферменты бактериофагов, гидролизующие пептидогликановый слой бактерий.

В настоящий момент существуют несколько классификаций лизоцимов [60–62]. Так, по классификации гликозилгидролаз в работе [60] лизоцимы относятся к 22, 23 и 24 группам гидролаз. В работе [61] лизоцимы классифицировали на V(virus)-, G(goose)-и C(chicken)-типы лизоцимов. Fastrez [62] в своем обзоре классифицировал лизоцимы бактериофагов на 4 типа V-, G-, λ - и СН-тип лизоцимов. В качестве примера лизоцимов V-типа можно привести лизоцимы, синтезируемые бактериофагом T4 (пге, пг5); G-типа – пг16 из бактериофага T7 и пг7 из бактериофага PRD1; λ -типа – пгR из бактериофага λ ; СН-типа – пгLysA из бактериофага MV1 и пгscr1 из бактериофага Cr-1. Структурные и энзимологические исследования лизоцимов первых трех типов показали, что лизоцимы первых двух групп, и, возможно, третьей имеют общие структурные элементы с С-типом лизоцимов.

2.8. Пространственная структура цитолитических ферментов

В настоящее время известны только 18 пространственных структур различных цитолитических ферментов бактериофагов (табл.1.).

Таблица 1. Разрешенные пространственные структуры цитолитических ферментов бактериофагов.

Эндолизин	Фаг	Публикация
T4 лизоцим	<i>Escherichia coli</i> фаг T4	Matthews и Remington, 1978 [63]
T7 амидаза	<i>Escherichia coli</i> фаг T7	Cheng <i>et al.</i> , 1994 [64]
λ трансгликозилаза	<i>Escherichia coli</i> фаг λ	Evrard <i>et al.</i> , 1998 [65]
СрI-1 лизоцим	<i>Streptococcus pneumoniae</i> фаг C1	Hermoso <i>et al.</i> , 2003 [66]
P1 лизоцим	<i>Escherichia coli</i> фаг P1	Xu <i>et al.</i> , 2005 [67]
PlyL амидаза*	<i>Bacillus anthracis</i> профаг Ba02	Low <i>et al.</i> , 2005 [68]
PlyPSA амидаза	<i>Listeria monocytogenes</i> фаг PSA	Korndorfer <i>et al.</i> , 2006 [69]
P22 лизоцим	<i>Salmonella typhimurium</i> фаг P22	Moore и Matthews, 2006 [70]
PlyB лизоцим*	<i>Bacillus anthracis</i> фаг BcpI	Porter <i>et al.</i> , 2007 [71]
KZ144 трансгликозилаза	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> фаг ϕ KZ	Fokin <i>et al.</i> , 2008 [46]
Ply500 пептидаза	<i>Listeria monocytogenes</i> фаг A500	Korndorfer <i>et al.</i> , 2008 [72]
R21 лизоцим	<i>Escherichia coli</i> фаг 21	Sun <i>et al.</i> , 2009 [73]
PlyC лизоцим	<i>Streptococcus pyogenes</i> фаг C1	McGowan <i>et al.</i> , 2012 [74]
CHAP(K) домен LysK амидаза/пептидаза	<i>Staphylococcus aureus</i> фаг K	Sanz-Gaitero <i>et al.</i> , 2014 [75]
SPN1S лизоцим	<i>Salmonella typhimurium</i> фаг SPN1S	Park <i>et al.</i> , 2014 [76]
Psm трансгликозилаза	<i>Clostridium perfringens</i> фаг ϕ SM101	Tamai <i>et al.</i> , 2014 [77]
СТР1L лизоцим	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> фаг ϕ СТР1L	Dunne <i>et al.</i> , 2016 [78]

Самой первой была решена структура лизоцима бактериофага T4, состоящего из 2-х петель, соединенных с длинной α -спиралью, формирующих типичный активный центр с каталитическими остатками [63]. Многочисленные мутанты лизоцима бактериофага T4 были закристаллизованы группой Brain Matthews (Университет Орегона, США) в рамках работы по изучению фолдинга и стабильности белков, где T4 лизоцим использовался в качестве модели. Полученные позже пространственные структуры лизоцимов P1 и P22 имели значительное сходство со структурой лизоцима T4 [67,70]. Процесс дисульфидной

изомеризации был иллюстрирован позже при помощи изучения активной и неактивной формы Р1 лизоцима. Образование дисульфидной связи между остатками Cys⁴⁴ и Cys⁵¹ удерживает белок в компактной, закрытой конформации, в которой активный центр еще не сформирован. Переход к активной форме происходит путем формирования новой дисульфидной связи между Cys¹³ и Cys⁴⁴ с последующей перестройкой активного центра.

Структура литической трансгликозилазы фага λ была разрешена в 1998 году при помощи производного, в котором все остатки триптофана были заменены на 7-азатриптофан [65]. Анализ полученной структуры выявил взаимосвязь с V-типом лизоцимов (т4-лизоцим) и С-типом лизоцимов (лизоцим из яйца курицы). Совместная кристаллизация с ингибитором гекса-N-ацетилгексаозой, позволила установить, что эндолизин содержит 6 субсайтов связывания сахаридов [79].

Кристаллическая структура Cpl-1 – первая разрешенная структура эндолизина действующего на грамположительные бактерии [66]. Эта структура представляет собой двухмодульный фаговый эндолизин с двумя отдельными доменами, связанными с длинным линкером. Структура такого типа была предсказана ранее на основании биохимического и генетического анализа. С-концевой участок пептидогликан-связывающего домена включает в себя 6 похожих холин-связывающих повторов. Было подробно описано связывание с клеточной стенкой и другие ключевые моменты механизма действия эндолизина Cpl-1 [80]. Хорошо изучена структура пептидогликан-связывающего и каталитического домена эндолизина PlyPSA из *L. monocytogenes*. Пептидогликан-связывающий домен эндолизина PlyPSA включает в себя новый структурный мотив состоящий из двух β -бочек, удерживаемых вместе β -листом [69]. Также была опубликована пространственная структура ПГ144 фага ϕ KZ, бактерии *P. aeruginosa* – первый эндолизин из фага инфицирующего грамотрицательную бактерию, который имеет модульную структуру [46].

Разрешены структуры каталитических доменов профагов и фагов *Bacillus*: PlyB, PlyL, XlyA [68,71]. Каталитический домен PlyB имеет похожую структуру с гликозил-гидролазами семейства GH-25 и с каталитическим доменом Cpl-1. Каталитический домен PlyL имеет сходную структуру с Zn-зависимой T7 амидазой. Кристаллические структуры каталитических доменов PlyL и XlyA очень похожи. Однако, XlyA теряет способность лизировать клетки *B. subtilis* при удалении пептидогликан-связывающего домена, в то время как активность PlyL в аналогичной ситуации возрастает. Было выдвинуто предположение, что это различие зависит от наличия четырех остатков лизина и одного аргинина на поверхности PlyL (pI=8,8), которые заменены на три треонина, аспарагиновую кислоту и лейцин в XlyA (pI=5,8) [68]. Замена всех этих остатков на лизин

в HlyA, изменяет pI с 5,8 на 8,0, что приводит к более эффективному лизису *B. subtilis* каталитическим доменом. PlyB ($pI=5,0$) проявляют похожую pI -зависимую дихотомию. На основании этих данных можно предположить, что пептидогликан-связывающий домен, в основном является «коннектором» между кислотным каталитическим доменом и отрицательно заряженной клеточной стенкой бактерии и служит для преодоления электростатического барьера.

2.9. Пептидогликан-связывающий домен

Пептидогликан-связывающий домен обеспечивает высокоспецифичное узнавание субстрата пептидогликан лизирующим ферментом, что приводит к очень узкому спектру субстратов, который ограничен видом или штаммом клетки хозяина фага кодирующего эндолизин [81–83] или же родом клетки хозяина [84]. С другой стороны эндолизины грамотрицательных бактерий, которые не содержат пептидогликан-связывающего домена, обладают более широким спектром субстратов [85–88]. Хорошо изученные примеры взаимодействия с лигандами холин-связывающих эндолизинов: Cpl-1, Pal и Ejl бактериофагов пневмококков Cp-1, Dp-1 и Ej-1. Их пептидогликан-связывающие домены специфически связывают холин, который представлен тейхоевой кислотой клеточной стенки пневмококков [89–91]. Узнавание пептидогликан-связывающим доменом Cpl-1 холина направляет субстрат по оптимальному пути в полость каталитического домена [66]. В случае Pal связывание холина стабилизирует пептидогликан-связывающий домен. Эта конформационная стабилизация передается на каталитический домен, переводя фермент из низкоактивной (Е-форма) в высокоактивную форму (С-форма) [92]. Это подтверждает, что Pal — холин зависимый фермент, неспособный к гидролизу клеточной стенки с присутствием тейхоевой кислоты из которой холин был удален этаноламином [90]. Холин-связанный Ejl индуцирует только небольшие изменения в его вторичной структуре, но улучшает мультимеризацию фермента: из димера он превращается в тетрамер [91]. Эти примеры хорошо иллюстрируют корреляцию между узнаванием лиганда пептидогликан-связывающим доменом и субстранным спектром полноразмерных эндолизинов.

Еще один пример это пептидогликан-связывающие домены эндолизинов Ply118 и Ply500 бактериофагов инфицирующих *Lysteria monocytogenes*. Пептидогликан-связывающие домены этих ферментов распознают различные серотипические группы *Lysteria*, что было визуализировано при помощи химерной конструкции с зеленым флуоресцентным белком (GFP) и показывает, что места связывания ферментов коррелируют с наличием соматического антигена связанного с этим серотипом. Более

того, конструкция CBD118-GFP связывается с лигандом в полярных областях, в то время как CBD500 распределяется равномерно по клеточной стенке. Точный лиганд этих доменов не известен, но предположительно это специфический углевод клеточной стенки, который может быть найден в уникальной структуре серотипически специфичной тейхоевой кислоты, и который различается для CBD118 и CBD500 [93].

Вторая функция пептидогликан-связывающих доменов - обеспечение достаточной аффинности субстрата для сближения его с ферментом. Другие гидролазы, расщепляющие нерастворимые углеводные полимеры, такие как ксиланазы и целлюлазы имеют похожую модульную структуру [94], и их связывающие домены пространственно сближают фермент с субстратом. Были измерены константы равновесной ассоциации, которые составили: 3×10^8 (CBD500) и 6×10^8 (CBD118) M^{-1} [93]. Делеция CBD118 или CBD500 разрушает лизирующую активность Ply118 или Ply500 соответственно. Также литическая активность делеционного мутанта эндолизина Ply3626 бактериофага *C. perfringers*, у которого удален пептидогликан-связывающим домен, полностью исчезает [82]. Тем не менее, зачастую наличие пептидогликан-связывающего домена не критично для ферментативной активности. Удаление пептидогликан-связывающего домена эндолизина PlyPSA бактериофага *L. monocitogenes* лишь понижает литическую активность, а не приводит к полному ее исчезновению [95]. При удалении С-концевого домена эндолизина бактериофага LL-N *Lactobacillus delbrueckii*, активность не меняется [96]. С-концевая делеция эндолизинов PlyTW и Ply187 бактериофага *S. aureus*, эндолизина Ply511 бактериофага *L. monocitogenes*, эндолизина фага *Bacillus amyloliquefaciens*, эндолизина PalL профага *Bacillus anthracis* и эндолизина Ply21 фага *Bacillus cereus* вызывает увеличение литической активности [68,97–100].

Хотя в большинстве случаев не ясно, почему это укорочение способствует повышению литической активности, структурный анализ PlyL позволил установить, что С-концевой пептидогликан-связывающий домен не только специфически связывает каталитический домен с лигандом, но также и ингибирует каталитическую активность при отсутствии субстрата. Была выдвинута гипотеза, что узнавание субстрата пептидогликан-связывающим доменом разрывает взаимодействие между ним и каталитическим доменом, ослабляя ингибирующее действие [68]. Это междоменное взаимодействие отсутствует в делеционном мутанте, что позволяет ему постоянно оставаться в активной форме. *B. subtilis* который не является хозяином PlyL и его клеточная стенка не нативным субстратом для эндолизина, лизируется более эффективно делеционным мутантом чем полноразмерным белком, а в случае *B. anthracis*, клеточная стенка которого - нативный

субстрат для PlyL, полноразмерный фермент и делеционный мутант имеют практически равную активность.

2.10. Модульная эволюция эндолизинов

При сравнении последовательности генома *Streptococcus pneumoniae* и геномов их бактериофагов была обнаружена эволюционная связь между эндолизинами фагов и клеточными автолизинами, участвующими в метаболизме клеточной стенки и делении клетки [89,101]. Cpl-1, Pal и автолизин LytA, практически идентичны в районе C-конца, что объясняется их общей зависимостью от холина и модульной структурой [89]. Эта взаимосвязь - пример горизонтального переноса генов между клеткой-хозяином и инфицирующим фагом, что было подробно описано для других генов [102] и приводит к предположению, что эндолизины фагов пневмококов образовались путем объединения предшествующих полипептидных участков. Конструирование активного химерного белка эндолизина Cpl-1 и автолизина LytA показывает, что эти последовательно соединенные домены независимо активные, что подтверждает теорию о молекулярной эволюции, которая может происходить между генами путем последовательного соединения модулей. Эндолизин бактериофага пневмококов CPL7 - холин-независимый лизоцим не имеет гомологии в последовательности с холин-зависимой LytA амидазой [101]. Гибрид N-конца LytA и C-конца CPL7 дает в результате холин-независимую амидазу, тогда как обратный гибрид дает холин-зависимый лизоцим. Этот эксперимент показывает, что специфичность, зависящая от C-концевого пептидогликан связывающего домена может быть изменена и это дополнительное экспериментальное доказательство теории модульной рекомбинации [103]. *In vitro* создание функциональных химерных конструкций между эндолизином фага пневмококов и автолизином клостридии [104] или эндолизином фага лактококов и автолизином пневмококов [90], указывает на то, что модульная рекомбинация может приводить к видовому расхождению. Интересно, что эндолизин фага пневмококов Pal это природной химерной конструкцией, состоящей из N-конца, сходного с N-концевой частью эндолизина фага BK5-T инфицирующего *Lactococcus lactis* и C-конца гомологичного автолизину LytA [105]. Эндолизин PSA фага, инфицирующего *L. Monocytogenes*, - еще один пример природной химерной конструкции: его N-конец похож на амидазу фага 12826 из *Bacillus cereus* и фага ф3626 из *Clostridium perfringens*, а C-конец почти идентичен пептидогликан-связывающему домену эндолизина фага Ply500 из *L. monocytogenes* [82].

Таким образом, модульная рекомбинация эндолизинов представляет важную движущую силу их эволюции, позволяя быстро адаптироваться к новым условиям

окружающей среды. Группы генов не ограничены пределами клетки хозяина. Этот феномен наблюдался также и в случае многих других ферментов расщепляющих полимеры, нерастворимые субстраты и др. [94,106].

2.11. Модульное строение цитолитических ферментов

В 1990 г. было установлено, что автолитические ферменты пневмококков *S. pneumoniae* состоят из нескольких функционально различных доменов или модулей [80]. Один домен связывает остатки холина, ассоциированных с пептидогликаном клеточной стенки и определяет этим место будущего лизиса, а другой, содержащий каталитический домен (мурамидаза, глюкозаминидаза и т.п.), производит расщепление пептидогликанов. Эта теория была подтверждена экспериментами по комбинированию и перестановке функциональных доменов [107,108]. В дальнейшем модульное строение было обнаружено как у новых, так и у ранее открытых цитолитических ферментов из различных источников, в том числе и бактериофагов [66,100,108–110].

Во многих случаях такие ПЛФ состоят из одного связывающего домена и двух и более каталитических доменов [110]. При наличии домена связывания обеспечивается более высокая субстратная специфичность ПЛФ. Было показано, что каталитические домены у цитолитических ферментов из различных фагов имеют высокую степень гомологии, в то время как связывающие домены неконсервативны [81].

У цитолитических ферментов фагов грамотрицательных бактерий пептидогликан-связывающий домен обычно находится в C-концевой части белка, а каталитический домен - N-концевой [19]. Имеются и исключения, например, у эндолизина пг144 бактериофага фKZ *P. aeruginosa* пептидогликан-связывающий домен расположен на N-конце белка [47]. У фагов грамотрицательных бактерий подобная закономерность не столь четко выражена [20]. Некоторые ПЛФ, как правило имеющие очень малый размер, не содержат домена связывающего пептидогликан или холин.

Т.к. строение ПЛФ бактериофагов предполагает структурную дискретность строения - становится возможно создать химерные ферменты с измененной специфичностью к субстрату и иным механизмом действия. Что и было экспериментально осуществлено при помощи литических ферментов фагов *S. pneumoniae* [81]. *De novo* сконструированный цитолитический фермент узнавал тот же самый участок клеточной стенки пневмококков.

2.12. Энзибиотики

Несмотря на то, что способность эндолизинов убивать бактериальные клетки была известна уже давно [111], эти ферменты не использовались в качестве антибактериальных агентов благодаря широкому и успешному распространению антибиотиков и более сложному процессу биосинтеза эндолизинов. Только после распространения резистентных ко многим антибиотикам бактерий, идея применения эндолизинов стала вновь интересна. Для обозначения эндолизинов, которые применяются в качестве антибактериальных средств, был введен новый термин «энзибиотики» - комбинация терминов «энзимы» и «антибиотики». В 2001 году впервые был продемонстрирован терапевтический потенциал эндолизина бактериофага C1 по отношению к стрептококкам группы А [112]. С того времени появилось много публикаций, описывающих эндолизины в качестве привлекательной альтернативы низкомолекулярным антибиотикам. В частности, различные эндолизины были предложены в качестве энзибиотиков против таких патогенов как *Streptococcus pneumoniae* [81], *B. anthracis* [83], *S. agalactiae* [113] и *Staphylococcus aureus* [114].

Стрептококки группы А

Культура стрептококков группы А количеством 5×10^6 полностью убивается в течении 5 секунд при добавлении 10 нг лизина C1. Колонии бактерий ротовой полости использовались в качестве теста на способность лизинов удалять стрептококки группы А. Обработка ротовой полости мышей 2,5 нг Cpl-1 перед контрольным заражением показало уменьшение числа заражений с 70% до 28%. А обработка 9 зараженных мышей 5 нг Cpl-1 полностью удалила стрептококки из слизистой через 2 часа. После 24 и 48 ч 6 животных остались здоровы, одно умерло и еще 2 заразились снова. Причиной этой повторной колонизация, возможно, стало более раннее заражение бактериями, устойчивыми к воздействию Cpl-1. Эти результаты показывают, что колонизация слизистой оболочки может быть предотвращена и удалена при помощи эндолизинов [112].

Streptococcus pneumoniae

Большое число исследований посвящено использованию эндолизинов фагов *Streptococcus pneumoniae*. Pal и Cpl-1 эндолизины из фагов Dp-1 и Cp-1 обладают высокой штамм-специфичностью и убивают все протестированные штаммы *S. pneumoniae*, включая инкапсулированные и пенициллин-устойчивые. Это означает, что капсула пневмококов не влияет на доступ ферментов к пептидогликану и что их спектр активности не взаимосвязан с устойчивостью к антибиотикам [81,115].

Эндолизин Cpl-1 также эффективен при внутривенном применении у мышей. Доза в 2 мкг, введенная через 1 час после инфицирования, приводит к 100% излечению в

течение 48 часов, в то время как в контрольной группе излечивается только 20% процентов мышей. Эти результаты демонстрируют, что эндолизины эффективны не только при местном применении, но также и в токе крови, несмотря на короткое время полураспада в крови (20,5 мин.) [115].

Введение эндолизинов Cpl-1 или Pal (200 мкг) при сепсисе у мышей понижают количество бактерий в крови примерно на 4 log через 2 часа после внутрибрюшной инъекции и последующим очищением крови от бактерий на следующий день. Комбинация 2,5 мкг лизоцима Cpl-1 и 2,5 мкг амидазы Pal полностью вылечивают мышью от инфекции, в то время как введение 5 мкг одного энзимбиотика Cpl-1 или Pal не обеспечивают излечения животного. Эти результаты доказывают синергетическое взаимодействие между эндолизинами с разной специфичностью, что может объясняться увеличенным доступом ферментов к сайтам гидролиза или улучшением деструктивного эффекта благодаря двумерному расщеплению в трехмерной пептидогликановой сети [116,117].

Cpl-1 и гентамицин действуют синергично, но только по отношению к пенициллин-чувствительным штаммам. Однако комбинация Cpl-1 и пеницилина проявляют синергию для большинства пенициллин-устойчивых штаммов. Эти результаты можно применить для оптимизации терапии пневмококковых инфекций [118].

Cpl-1 также эффективен против *S. pneumoniae*, вызывающих эндокардит у крыс [119]. Животные получали начальную дозу в 250 мг/кг через 16 часов после инфицирования с последующим вливанием 250 мг/кг/ч в течение 6 часов. Практически полная ликвидация бактерий наблюдалась в крови через 6 часов. Таким образом, в ходе этих исследований было установлено, что Cpl-1 также применим для лечения инфекции в глубоких очагах воспаления, где бактерии могут быть защищены физиологическим барьером, хотя для лечения таких типов заболеваний требуются большие дозы энзимбиотика. Также было показано, что быстрый лизис бактерий и освобождение фрагментов клеточных стенок, индуцированных Cpl-1, влечет за собой увеличение уровня секреции цитокинов, значительно более высокого, чем повышение вызванное ванкомицином. Этот антибиотик эффективен, но убивает бактериальные клетки медленнее. Возможно, медленное высвобождение фрагментов клеточной стенки объясняет менее выраженную секрецию цитокинов.

Bacillus anthracis

Эндолизин PlyG был идентифицирован в гамма фаге, крайне специфичному к *B. anthracis*. Для *in vivo* эксперимента *B. anthracis*, были заменены на *B. cereus* RSVF1. Этот близкородственный *B. anthracis* штамм чувствителен к гамма фагу и PlyG и

вызывает летальный исход у мышей. Инъекция 10^6 клеток бактерий приводит к характерным прогрессирующим симптомам и смерти в течение 5 часов или меньше. Доза в 50 единиц PlyG введенная через 15 минут после инфицирования спасла 13 из 19 мышей, в то время как остальные прожили дольше (6-21 ч.). Индукция прорастания спящих *B. cereus* RSVF1 спор делает их восприимчивыми к PlyG через 5 мин. Это свойство используется для детекции спор, основанной на секреции АТФ, который измеряется как свет в присутствии люцеферин-люциферазы. Предел детекции низок и находится в районе 100 спор *B. cereus* RSVF1. Метод также высоко специфичен: отсутствие лизиса означает присутствие других типов прорастающих спор [83].

Ctreptococcus agalacrtiae

Cheng описал и использовал PlyGBS при вагинальной и оральной колонизации для удаления *C. agalacrtiae* [113]. PlyGBS проявляет низко специфичную активность *in vitro*, подобно эндолизинам, описанным выше, в то время как *in vivo* наблюдается понижение числа колоний *C. agalacrtiae* примерно на 3 log за 4 часа. Делеционный мутант, содержащий только N-концевой домен эндопептидазы в 25 раз более активен *in vitro* и *in vivo* наблюдается улучшение антибактериальной активности приблизительно до 4 log за тот же период. Это иллюстрирует, что белковая инженерия эндолизинов может обеспечить более эффективным инструментом для борьбы с бактериальной инфекцией [120].

Straphilococcus aureus

MV-L — эндолизин бактериофага фMR11 убивает различные мультирезистентные штаммы *S. aureus* [114]. MV-L, значительно понижает количество бактерий, которые искусственно внесли в ноздри мышей: примерно на 1,5 log в течение 6 часов. Более того, интраперитонеальное введение MV-L полностью защищает мышей от сепсиса, вызванного *S. aureus*.

Однако, все перечисленные выше примеры относятся к грамположительным бактериям. В случае грамотрицательных бактерий пептидогликан клеточной стенки дополнительно защищен внешней мембраной, что затрудняет доступ эндолизинов. Поэтому увеличение проницаемости внешней мембраны грамотрицательных бактерий является актуальной темой антимикробной терапии. Существует несколько подходов к увеличению проницаемости внешней мембраны, основанных на дестабилизации мембраны катионными агентами: полимиксины, полилизины и полиаргинины, поликатионные пептиды, трис, катионы двухвалентных металлов, хелатирующие агенты и др.

Один из наиболее эффективных подходов в конструировании энзимотиков против грамотрицательных патогенов - комбинирование ферментов с поликатионными пептидами [121] или создание химерных белков с такими пептидами (артилизины) [122,123]. Наличие поликатионных пептидов способствует проникновению фермента через внешнюю мембрану бактерии. В этом контексте каталитические домены ПЛФ фага фKZ в силу своей высокой активности и специфичности могут стать подходящими объектами для создания инженерных ферментативных противомикробных препаратов.

2.13. Фаговая терапия

В последнее время возникает все больше патогенных бактерий, устойчивых к большинству известных антибиотиков, включая последние поколения, что представляет собой большую проблему в современной медицине. В связи с этим, вновь актуальной стала идея использовать бактериофаги в качестве антибактериальных препаратов. Первые попытки применения фаговой терапии были осуществлены в 20-30 годах XX века, однако с появлением антибиотиков эти работы были приостановлены и глобального применения не нашли. Высокая специфичность инфицирования - важнейшее свойство бактериофагов. Фаги инфицируют и приводят к лизису бактерии отдельных серологических групп в пределах одного вида, не взаимодействуя с естественной микрофлорой и тем более клеток макроорганизма. Также бактериофаги активны даже в отношении полирезистентной госпитальной микрофлоры и наличие у бактерий резистентности к синтетическим антибиотикам не влияет на их чувствительность к бактериофагам (табл. 2). Однако следует учитывать специфичность бактериофагов: каждый вид фага распознает в качестве своей мишени только один серотип бактерий. Тем не менее, эта проблема решается с помощью использования «коктейлей» бактериофагов – смеси различных бактериофагов, обладающих более широким спектром литической активности.

Несмотря на ряд несомненных преимуществ использования фаговой терапии (табл. 2), имеется заметное число ограничений ее применения в клинической практике: фаговые препараты обладают довольно высокой степенью иммуногенности; низкой жизнеспособностью, также процесс выделения и очистки фаговых частиц [124,125] достаточно сложен. В терапии должны применяться только литические фаги, т.е. их развитие должно начаться сразу после инфицирования и завершиться лизисом клетки хозяина. Следует избегать применения умеренных фагов, которые развиваются лизогенным путем, через встраивание собственного генома в геном бактерии хозяина, таким образом бактерии могут приобретать дополнительную устойчивость к низкомолекулярным антибиотикам. Поэтому необходимо избегать применения не только умеренных фагов, но и литических фагов с неисследованным жизненным циклом,

которые могут быть лизогенными. Фаготерапия не соответствует формальным правилам фармакокинетики, разработанным для низкомолекулярных препаратов. Кроме того, желательно знать рецептор фага.

Таблица 2. Сравнительная характеристика бактериофагов и антибиотиков [126].

Особенности	Антибиотики	Бактериофаги
Частота развития вторичной резистентности	От незначительной до очень высокой	Малоизучено
Профилактическое использование	Неэффективно, противопоказано	Используется
Длительность создания нового препарата	От нескольких лет до десятилетий	От нескольких дней до нескольких месяцев
Способность проникать в различные ткани	От высокой до крайне низкой для различных препаратов	Малоизучено
Концентрация в инфекционном очаге	Отличается для разных препаратов, зависит от локализации процесса, скорость снижения различна	Нарастает путем саморазмножения, снижается после ликвидации инфекции
Влияние на ферментные системы организма	Характерно для всех препаратов	Не описано
Наличие побочных эффектов и осложнений	Аллергические, токсические, конкурентные, дисбиотические изменения различных органов.	Не характерно. Редко - аллергические реакции. Могут вызывать реакцию при массивном разрушении микробов. Дисбиотических нарушений не вызывают
Рациональная комбинация с другими антибактериальными препаратами	Зависит от класса антибактериальных средств и может быть по типу суммации, потенцирования и т.д.,	Всегда по типу взаимного потенцирования, по предварительным данным – вне зависимости от класса препарата.
Совместимость с другими медикаментами	Различная, (конкуренцией за ферментные системы, связывание с тканями, усиление токсических эффектов и пр.)	Полная, в том числе и с антибиотиками.
Активность в отношении патогенных микробов	Различная. Подавляют флору организма, вызывая дисбиотические нарушения. Число чувствительных штаммов составляет 60-90%.	Не влияют на облигатную флору организма, не вызывают дисбиоз.

Таким образом, несмотря на несомненную перспективность внедрение в лечебную клинику в качестве противобактериальных препаратов бактериофагов происходит медленно.

Еще одним альтернативным подходом к терапии бактериальных инфекций - использование цитолитических ферментов бактериофагов в качестве антибактериальных препаратов, названных энзибиотиками [115,127]. Используя цитолитические ферменты, можно избежать большинства проблем, описанных выше. Однако при этом утрачиваются и некоторые положительные стороны фаговой терапии, например, возрастание концентрации литических частиц в инфекционном очаге. Специфичность ферментов в большинстве случаев ниже, чем у фаговых частиц, но тем не менее, достаточно высока. Таким образом, использование фаговых литических ферментов наряду с фаговой терапией, по всей видимости, позволит решить проблему резистентности к различным антибиотикам многих патогенных бактерий.

2.14. Сравнение терапии эндолизинами и фаговой терапии

Терапия эндолизинами неразрывна связана с фаговой терапией - приложение использующее целые фаговые частицы для борьбы с бактериальными инфекциями [128]. Терапевтический потенциал бактериофагов был известен с момента их открытия и хорошо изучен ранее [125,129,130]. Важное применением в этой области это использования коктейля из 6 очищенных бактериофагов для борьбы с заражением *L. monocytogenes* продуктов из мяса и птицы. Наиболее очевидное преимущество использования фагов это их самоамплификация: после каждого цикла выделяется от 10 до 100 новых вирусных частиц и инфицируют новые клетки бактерий. Фаги могут применяться при различных типах инфекций, обнаруженных во внутренних органах при внутривенном введении. Некоторые компании поднимают вопрос о широком использовании целых бактериофагов на коммерческой основе. Важным препятствием к этому становится узкий диапазон бактерий хозяев бактериофагов и быстрое развитие резистентности к адгезии фагов у бактерий. Частично эти проблемы решаются путем использования коктейля бактериофагов. Однако, такой подход также создает ряд проблем для производства фагов. Еще один недостаток это риск продуцирования вирулентных факторов, закодированных в геноме бактериофага, например, токсин холеры из фага ϕ CTX бактерии *Vibrio cholerae* [131]. Образование и нейтрализация антител при продолжительном или повторном лечении в некоторых индивидуальных случаях также может затруднить терапевтическое применение бактериофагов. Эта проблема была решена селекцией типов фагов с уменьшенной иммуногенностью у мышей [132].

Обработка фагов полиэтиленгликолем также маскирует их от иммунного ответа, тем самым увеличивая эффективность фаговой терапии [133].

Использование продуктов производных фагов или фагов с ассоциированными антибиотиками вместо целых фагов также является перспективным направлением [134,135]. В этом отношении, развитие методов терапии эндолизинами бактериофагов - лидирующее направление. Некоторые эксперименты с животными показали их эффективность при профилактическом и терапевтическом использовании в случае мукозных и системных инфекций. На данный момент никаких побочных эффектов в виде раздражения, гистопатологических аномалий или токсичности при местном и системном использовании отмечено не было [136].

Эндолизины дают иммунный ответ при системном или местном введении, однако, эндолизин-нейтрализующие антитела не были идентифицированы. Гипериммунная сыворотка кролика уменьшает антибактериальную активность Cpl-1 *in vitro*, но при повторном введении мышам не наблюдается снижения терапевтической активности эндолизина Cpl-1 *in vivo* [115]. Также Jado идентифицировал антитела против Cpl-1 и Pal в мышинной сыворотке, хотя понижения эффективности после второй дозы не замечалось *in vivo* [117]. Антитела, полученные против эндолизинов стрептококков группы А и сибирской язвы, дают похожие результаты *in vitro* [137]. Также была продемонстрирована иммуногенность эндолизина стафилококка MV-L, но его антитела лишь едва уменьшают активность эндолизина [138]. Эти исследования показывают, что кажущаяся иммуногенность эндолизинов не мешает их использованию и что они могут использоваться в течение продолжительного периода. Эти результаты не дают полного понимания данного процесса, но правдоподобное объяснение состоит в том, что антитела не конкурируют с ферментативной афинностью за их субстрат в виде клеточных стенок, эту гипотезу также подтверждает высоко афинная константа, которая была измерена для двух различных пептидогликан-связывающих доменов [93,137].

На сегодняшний день не обнаружено случаев устойчивости к эндолизинам. Повторное воздействие чувствительных бактерий низкой или высокой концентрацией эндолизина на чашках с агаром и в жидкой среде не приводило к возникновению спонтанных резистентных мутантов, хотя в этом же эксперименте были идентифицированы устойчивые к антибиотикам клоны [81,83]. Гипотеза отсутствия резистентности состоит в том, что в течение миллионов лет совместной эволюции между фагами и их хозяевами, фаги нацелили свои пептидогликан-связывающие домены на уникальные и неизменные молекулы клеточной стенки для того, чтобы избежать возможные проблемы внутри клетки хозяина. Эти рецепторы, такие как холин (эндолизин

пневмококков) и полирамноза (эндолизин стрептококков группы А) необходимы для жизнеобеспечения и роста клетки [139].

Таким образом, именно применение эндолизинов бактериофагов, а также модифицированных препаратов на их основе, в противомикробной терапии, является одним из самых перспективных альтернативных направлений борьбы с бактериями, обладающими приобретенную полирезистентность к низкомолекулярным антибиотикам.

2.15. Количественное измерение ферментативной активности пептидогликанализирующих ферментов

Гидролиз пептидогликана под действием эндолизинов приводит к лизису клетки, то есть к ее гибели и фрагментированию на составные части. Распад клетки можно детектировать с помощью фиксирования скорости падения оптической плотности (метод турбидиметрии) для определения ферментативной активности.

Метод турбидиметрии традиционно используется для измерения активности бактериолитических ферментов по отношению к суспензии бактериальных клеток. Однако, здесь есть несколько обстоятельств, которые необходимо принимать во внимание. Во-первых, зависимость оптической плотности суспензии от титра клеток линейна лишь на начальном участке. В случае *P. aeruginosa* линейность сохраняется приблизительно до OD600 = 0,5 [51]. Это позволяет достаточно точно оценивать титр клеток, исходя из оптической плотности, внутри линейного интервала. Во-вторых, даже после длительной инкубации клеток с бактериолитическим ферментом, оптическая плотность далека от 0 за счет рассеяния света на фрагментах лизированных клетках. Иными словами полный лизис всех клеток не соответствует значению OD600 = 0.

Cheng и сотр. [64] определили количество фермента вызывающего уменьшение OD600 на 0,001 за минуту как 1 единицу. Briers и сотр. [51] на основе этого определения предложили следующую формулу для расчета активности ПЛФ:

$$\text{Активность(ед/мг)} = \frac{\Delta OD_{600} \text{ нм}/(\text{мин мг})}{0,001} \times \frac{V \text{ реакции (мкл)}}{1000 \text{ мкл}}$$

После определения линейного диапазона уменьшения оптической плотности данный подход позволяет обнаружить небольшие различия между различными условиями и подходит для больших наборов данных с различными формами кривой.

3. Материалы и методы

3.1. Бактериальные штаммы

В работе использованы штаммы *E. coli* из коллекции лаборатории молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН:

BL 21 (DE3) (Invitrogen) [140]

AD 494 (DE3) (Novagen)

Nova Blue (Novagen)

Для исследования функционирования лизинов бактериофага фKZ использовали штаммы клеток *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

3.2. Среды для выращивания бактерий

Использовали жидкие питательные среды:

LB – бульон и 2x TY бульон [141]

В качестве твердых питательных сред использовали:

LB и 2x TY среды с добавлением 1,5% агара (Difco,). Все среды автоклавировали для стерилизации. Для отбора клонов бактерий, обладающих приобретенной устойчивостью к антибиотикам, использовали среды с добавлением 100 мкг/мл ампициллина.

Бактериальные культуры кратковременно хранили при 4 °С на чашках Петри с твердыми средами. Для длительного хранения в жидкую среду с бактериальной культурой добавляли глицерина до 10% и замораживали при – 70 °С.

3.3. Векторы для клонирования. Плазмиды

3.3.1. Векторы для клонирования и экспрессии

pET-26b Novagen

pQE-30 Qiagen

3.3.2. Плазмиды с фрагментами ДНК, полученные автором в ходе исследований

p181MA pQE-30 со вставкой *BamH* I – *Hind* III, содержащей нуклеотиды 1880-2042 гена 181 бактериофага фKZ. Вектор использовали для экспрессии делеционного мутанта пг181MA.

p181MS pET-26 со вставкой *Nde* I – *Xho* I, содержащей нуклеотиды 1863-2237 гена 181 бактериофага фKZ. Вектор использовали для экспрессии делеционного мутанта пг181MS.

p144 pQE-30 со вставкой *BamH* I – *Hind* III, содержащей ген 144 бактериофага фKZ. Вектор использовали для экспрессии рекомбинантного пг144 и получения точечных мутантов.

- p144-Ala115 pQE-30 со вставкой *BamH* I – *Hind* III, содержащей точечный мутант с заменой Glu в положении 115 на Ala, гена 144 бактериофага фKZ. Вектор использовали для экспрессии точечного мутанта p144-Ala¹¹⁵.
- p144-Leu200 pQE-30 со вставкой *BamH* I – *Hind* III, содержащей точечный мутант с заменой His в положении 200 на Leu, гена 144 бактериофага фKZ. Вектор использовали для экспрессии точечного мутанта p144-Leu²⁰⁰.
- p144-Phe197 pQE-30 со вставкой *BamH* I – *Hind* III, содержащей точечный мутант с заменой Tyr в положении 197 на Phe, гена 144 бактериофага фKZ. Вектор использовали для экспрессии точечного мутанта p144-Phe¹⁹⁷.
- p144-Ala115- pQE-30 со вставкой *BamH* I – *Hind* III, содержащей точечный мутант с заменой Glu в положении 115 на Ala и His в положении 200 на Leu, гена 144 бактериофага фKZ. Вектор использовали для экспрессии точечного мутанта p144-Ala¹¹⁵-Leu²⁰⁰.
- p144-Ala115- Phe197 pQE-30 со вставкой *BamH* I – *Hind* III, содержащей точечный мутант с заменой Glu в положении 115 на Ala и Tyr в положении 197 на Phe, гена 144 бактериофага фKZ. Вектор использовали для экспрессии точечного мутанта p144-Ala¹¹⁵-Phe¹⁹⁷.
- p144-Leu200- Tyr197 pQE-30 со вставкой *BamH* I – *Hind* III, содержащей точечный мутант с заменой His в положении 200 на Leu и Tyr в положении 197 на Phe, гена 144 бактериофага фKZ. Вектор использовали для экспрессии точечного мутанта p144-Leu²⁰⁰-Tyr¹⁹⁷.

3.4. Ферменты

В работе использовались ферменты фирм Pharmacia Biotech, Promega, MBI Fermentas и Sigma:

ДНК лигаза фага T4,

ДНК полимеразы *Thermophilus aquaticus* (Taq – полимеразы), *Pfu* - полимеразы

Нуклеаза *Dpn* I

Эндонуклеазы рестрикции *BamH* I, *Hind* III, *Nde* I, *Xho* I

Лизоцим из яйца курицы (HEWL)

Реакции рестрикции, отщепления нуклеотидов и лигирования проводили согласно рекомендациям фирм-изготовителей с использованием прилагаемых буферов.

3.5. Полимеразная цепная реакция

Фрагменты ДНК амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по стандартной методике [142] с использованием амплификатора Терцик (МПО Биотехнология).

К реакционной смеси добавляли 0.5 мкл Taq ДНК полимеразы (5 U/мкл), наслаивали 30 мкл минерального масла (Sigma) для предотвращения испарения и проводили амплификацию для всех вариантов по следующей схеме: 25 циклов реакции амплификации по следующей схеме: денатурация матричной ДНК при 95 °С (45 с), отжиг при 55 °С (60 с) и элонгация при 72 °С (60 с).

По окончании реакции смесь охлаждали и амплифицированную ДНК анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (0,5 мкг/мл).

Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в приложении 1.

3.6. Выделение и очистка ДНК

3.6.1. Очистка фрагментов, амплифицированных с помощью ПЦР

Фрагменты ДНК полученные амплификацией анализировали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Для препаративного выделения соответствующую полосу ДНК вырезали из геля и очищали с помощью набора реактивов QiaEx фирмы QiaGen (Германия) согласно инструкции фирмы-изготовителя. После проведения реакций рестрикции ДНК очищали с помощью набора QiaPCR Prep фирмы QiaGen (Германия) согласно инструкции фирмы-изготовителя.

3.6.2. Выделение и очистка плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора QiaSpin Prep фирмы QiaGen (Германия) согласно инструкции фирмы-изготовителя.

3.7. Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Одиночную колонию клеток *E. coli* помещали в 2 мл 2х ТУ среды и подращивали при 37 °С в течение 16 ч при умеренной аэрации. Добавляли 0,5 мл ночной культуры на 500 мл 2х ТУ среды и подращивали при 37 °С до достижения середины логарифмической фазы роста ($\sim 4-6 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл). Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. Осадок ресуспендировали в 1/5 исходного объема в буфере, содержащем 40 мМ NaOAc (pH 5,6), 75 мМ CaCl₂, 5 мМ NaCl, охлажденном до 4 °С. Смесь инкубировали во льду 20 мин, затем клетки осаждали центрифугированием при тех же условиях. Полученный осадок ресуспендировали в 1/12 объема того же буфера с добавлением 10% (v/v) глицерина. Клеточную суспензию, расфасованную по 0,2 мл замораживали жидким азотом и хранили при –70 °С.

3.8. Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК

100 мкл суспензии компетентных клеток *E. coli* размораживали 30 мин во льду, добавляли 1 – 50 нг плазмидной ДНК (лигазной смеси) и инкубировали 30 мин при 0 °С. Затем пробирки инкубировали при 42 °С в течение 1,5 мин, охлаждали, добавляли 500 мкл 2х ТУ бульона и инкубировали смесь 40 мин при 37 °С. Полученную суспензию клеток разливали по 150-200 мкл на чашки Петри с 2х ТУ – агаром с добавлением 100 мкг/мл ампициллина. Смесь втирали стерильным шпателем в агаровый слой и инкубировали в течение 16 ч при 37 °С.

3.9. Сайт-направленный мутагенез

Введение мутаций в гены рекомбинантных белков проводили согласно рекомендациям протокола фирмы-изготовителя (QuikChange, Stratagene, США) [143]. Реакционная смесь в объеме 50 мкл содержала 50 нг матричной (плазмидной) ДНК, по 125 нг олигонуклеотидных праймеров (приложение 1), по 10 нмоль каждого из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов и 2,5 ед. акт. *Pfu* ДНК-полимеразы. Проводили 20 циклов реакции амплификации по следующей схеме: денатурация матричной ДНК при 95 °С (45 с), отжиг при 55 °С (60 с) и элонгация при 74 °С (10 мин).

После завершения реакции к мутагенезной смеси добавляли 10 ед. акт. рестриктазы *Dpn* I и инкубировали в течение 60 мин при 37 °С. Далее аликвоту полученной смеси (2 мкл) использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* Nova Blue по стандартной методике.

3.10. Количественные определения препаратов ДНК

Количественные определения препаратов ДНК проводили 1) спектрофотометрически и 2) путем сравнения интенсивности флуоресценции бромистого этидия в исследуемом образце и в стандартном образце с известной концентрацией [141]. В первом случае измеряли поглощение растворов при длине волны 260 нм, что позволяло рассчитать концентрацию ДНК в образце. При этом считали, что оптическая плотность $D=1$ соответствует 50 мкг/мл двуцепочечной ДНК и 20 мкг/мл олигонуклеотидов. С помощью отношения величин D , измеренных при 260 и 280 нм определяли степень загрязненности препаратов ДНК примесями РНК и белков. В случае определения количества ДНК в растворах с низкими концентрациями, использовался второй метод - визуального сравнения флуоресценции образца и серии стандартов.

3.11. Секвенирование ДНК

Определение нуклеотидной последовательности рекомбинантных генов осуществляли путем секвенирование плазмидной ДНК по методу Сенгера с использованием

автоматического секвенатора ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Использовали секвенирующие праймеры согласно рекомендациям фирмы-производителя плазмиды pQE30 [144].

3.12. Селекция клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды

3.12.1. После трансформации компетентных клеток Тор 10 лигазной смесью (10 мкл смеси на 100 мкл клеточной суспензии), клетки высевали на чашки с 2х ТУ-агаром, содержащим ампициллин (100 мкг/мл), и инкубировали при 37 °С в течение 12-18 ч. Затем отдельные клоны переносили в 3 мл жидкой среды 2х ТУ, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и наращивали при 37 °С в течение 2-3 ч, после чего проводили быстрый скрининг.

3.12.2. Скрининг проводили, используя экстракцию ДНК с помощью смеси фенол-хлороформ и последующий ее анализ в агарозном геле. 200 мкл жидкой среды с клетками осаждали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 2 мин, затем ресуспендировали в 20 мкл буфера P1 (50мМ Трис-Cl, pH 7,0; 10мМ ЭДТА, РНКазы) из набора реактивов QiaEx фирмы QiaGen. К суспензии клеток добавляли 20 мкл смеси фенол-хлороформ в соотношении 1:1 и центрифугировали в течение 10 мин при 12000 об/мин. Водную фазу, содержащую плазмидную ДНК, наносили на 0,8% агарозный гель и сравнивали по подвижности с исходным вектором.

3.12.3. Положительные клоны, содержавшие плазмиды с измененной подвижностью, наращивали в 3 мл жидкой среды 2хТУ, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Затем из них выделяли плазмиду по стандартной методике с помощью набора реактивов QiaEx фирмы QiaGen (Германия).

3.12.4. Размер вставки проверяли с помощью аналитической рестрикции по сайтам клонирования. Также размер вставки проверяли при помощи ПЦР, используя в качестве матрицы 2 мкл суспензии клеток с суммарным объемом ПЦР – реакции 25 мкл. В качестве маркеров размера ДНК использовали стандартную смесь “100bp DNA ladder” фирмы New England Biolabs (США).

3.13. Экспрессия клонированных генов в *E. coli*

Клонированные гены экспрессировали в системе, сконструированной на основе РНК-полимеразы фага T7 [145]. Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) для векторов на основе pET-26, или AD494(DE3) для векторов на основе pQE30, трансформировали плазмидами, содержащими вставку гибридного гена. Клетки подрачивали в среде 2х ТУ, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), при 37 °С до OD₆₀₀ = 0,4, после чего индуцировали синтез белка добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали 4ч. при 37 °С. После

экспрессии клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин (Megafuge 2.0 R, Heraeus), замораживали и хранили при температуре -20 °С.

3.14. Проверка растворимости синтезированных белков

Для проверки степени экспрессии гена в клетке отбирали аликвоты до индукции клеток IPTG и по окончании инкубации. Содержание белка в клетках анализировали согласно стандартной методике электрофореза в SDS-полиакриламидном геле [146] с окрашиванием геля Кумасси голубым G-250. Осадок клеток ресуспендировали в 20мМ Трис-HCl pH 8, 50мМ NaCl добавляли лизоцим и ДНКазу, инкубировали 20 мин при 37 °С, после чего проводили 2-3 цикла замораживания при -70 °С и оттаивания. Суспензию разрушенных клеток центрифугировали 15 мин при 15000 об/мин и содержание белков в осадке и супернатанте анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле (прибор Hoefer SE-250, Pharmacia Biotech). Если после окрашивания геля большая часть целевого белка преимущественно находилась во фракции супернатанта, белок считали растворимым.

3.15. Выделение и очистка белков

После экспрессии клетки *E. coli* из 0,5 л среды осаждали центрифугированием при 3500 об/мин в течении 15 мин, осадок ресуспендировали в 30 мл буфера А (20мМ Трис-HCl, pH 8, 100 мМ NaCl, 1мМ о-фенилметилсульфонилфторида (PMSF)). Клетки гомогенизировали ультразвуком (Techpan MD20, Польша) в течении 2-3 мин (по 15 с с перерывом 15 с), нерастворимые фрагменты клеток отделяли центрифугированием при 15000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой (Qiagen, США). Эллюцию афинносвязанного белка в нативных условиях проводили 200 мМ имидазолом в буфере А. Очищенный препарат белка диализовали против 20 мМ буфера Трис HCl pH 8, 50 мМ NaCl, 12-16 ч при 4 °С и концентрировали с помощью Amicon Centriprep. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение при 280 нм, на спектрофотометре GENESYS 10 (Thermoelektron). Коэффициент экстинкции рассчитывали с помощью программы VectorNTI, основываясь на концентрации ароматических остатков в молекуле белка.

3.16. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили по методу Лэммли [146] и окрашивали 0,3% Кумасси R («Sigma», США) в растворе уксусная кислота, этанол, вода (1:3:6). Раствор для отмывки содержал 50% этанола и 7% уксусной кислоты. В качестве маркёра использовали смесь белков Mark12 («Invitrogen», США), содержащую: фосфоорилазу В (97,4 кДа), бычий сывороточный альбумин (66,3 кДа), овальбумин (45,0 кДа), карбоангидразу (31 кДа),

ингибитор трипсина (21,5 кДа), лизоцим (14,4 кДа). Пробы готовили следующим образом: в 100 мкл культуры клеток после экспрессии добавляли 30 мкл 4-кратного буфера для образцов (0,25 М Tris-HCl, pH 6,8, 8% Дс-Na, 40% (v/v) глицерин, 20% (v/v) 2-меркаптоэтанол, 0,02 % (w/v) бромфеноловый синий) и прогревали на кипящей водяной бане в течение 5 мин. На гель образцы наносили в объеме 10 мкл.

3.17. Определение олигомерности белка гель-фильтрацией

Препарат очищенных белков наносили на колонку Superose 12 HR10/30 (Pharmacia), уравновешенную буфером А и элюировали со скоростью 0,5 мл/мин. Предварительно колонку калибровали стандартами белков. По графику зависимости логарифма молекулярной массы белка от объема элюции определяли наблюдаемую молекулярную массу белков.

3.18. Спектр кругового дихроизма

Спектр кругового дихроизма (КД) снимали с помощью спектрополяриметра JASCO J-500 в 10 mM Na-фосфатного буфера pH 7,5 при комнатной температуре. Расчет содержания вторичной структуры проводили по методу Провенчера [147] с использованием программ CONTIN [148] или Selcon [149].

3.19. Определение ферментативной активности белков

Для определения ферментативной активности белковых препаратов в качестве субстрата использовали суспензию клеточных стенок *P. aeruginosa* PAO1, полученную обработкой клеток хлороформом для удаления внешней клеточной мембраны [150]. Для приготовления суспензии клеточных стенок клетки *P. aeruginosa* PAO1 наращивали при 37 °C в среде 2x TY до OD500 ~ 0,6 о.е. Клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об/мин. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере 50мМ Трис-HCl pH 7,8, насыщенном хлороформом и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре с перемешиванием. Остатки клеточных стенок осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об/мин. Осадок ресуспендировали в соответствующем Na-фосфатном буфере и снова осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об/мин. Полученный осадок ресуспендировали в соответствующем Na-фосфатном буфере, доводили оптическую плотность до 0,6-1 о.е. при 500 нм. Образец фермента объемом 30 мкл добавляли к 270 мкл суспензии клеточных стенок на плашке и измеряли оптическую плотность на спектрофотометрическом ридере Viktor при комнатной температуре в течении 1,5 ч с интервалом в 1 мин. Каждый образец измерялся 3 раза. Все образцы сравнивались с соответствующими негативными контролями и позитивным контролем, содержащим куриный лизоцим (HEWL 70000 U/мг).

Была определена 1 единица (U) литической активности, соответствующая линейному снижению оптической плотности на 0,001 о.е. в минуту. Результаты измерений обрабатывали при помощи программы Activity Calculator [51] (<http://www.biw.kuleuven.be/logt/ActivityCalculator.htm>).

3.20. Моделирование и молекулярная динамика

Молекулу субстрата строили и релаксировали в программе Avogadro [151]. Докинг проводили к отрелаксированной, а затем замороженной нативной структуре с помощью веб-сервиса SwissDock [152] и выбирали вариант, наиболее похожий по ориентации и положению на структуру 3BKV [153]. Распределение зарядов в нативной белковой молекуле рассчитывали с помощью программ PDB2PQR [154,155] и APBS [156].

Конформационную подвижность белка изучали методом молекулярной динамики. Исходя из кристаллической структуры 3BKH [153], создали гидратированные модели на основе силового поля AMBER [157,158]. Моделирование проводили в пакете GROMACS [159–162] со следующими параметрами: время симуляции 100 нс, шаг 2 фс, радиус обрезания ван-дер-ваальсовых взаимодействий 1 нм, метод учета электростатических взаимодействий PME, температура 300 К с отдельным термостатированием белка и раствора, использовали периодические граничные условия с кубической ячейкой.

Анализ данных проводили путем сравнения среднеквадратичного отклонения структур точечных мутантов от структуры фермента дикого типа. За референсную структуру принимали конформацию трансгликозилазы, полученную путем молекулярной динамики при 300 К. Сравнение проводили по атомам белкового остова только тех аминокислот, которые находятся вблизи субстрата (аминокислоты: 110-116, 125-150, 168-185, 195-210, 220-230) и могут влиять на его связывание с ферментом. В связи с тем, что при комнатной температуре подвижность молекулы слишком велика, чтобы на доступных временах вычисления сделать статистически достоверные выводы о конформационных отличиях, применяли метод отжига структур к низким температурам. Систему плавно замораживали в течение 1 нс от 300 К до температуры жидкого азота (77 К).

4. Результаты и обсуждение

4.1. Введение

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

4.2. Делеционный мутагенез пг181

Геном фKZ кодирует два цитолитических фермента - пг144 (260 а.о.) и пг181 (2237 а.о.) с расчетной массой 28,8 кДа и 245,8 кДа, соответственно. Анализ рамок считывания генома показал высокую степень консервативности аминокислотных остатков в С-концевой части полипептидов пг144 и пг181, характерную для класса 1 литических трансгликозилаз (рис. 11) [47,49]. Масс-спектрометрическим анализом продуктов расщепления также подтверждено, что пг144 относится к классу трансгликозилаз и расщепляет о-гликозидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином с образованием 1,6-ангидроацетилмурамоила [50].

Modeller [166] предполагает, что структуры каталитических доменов, а в особенности участки отвечающие за связывание субстрата у пг181 и пг144 практически идентичны. В *N*-концевой части пг181 (остатки 1 - 1865) не обнаруживается гомологий ни с одной известной последовательностью в общедоступных базах данных, за исключением пг183 бактериофага EL, родственника фKZ также инфицирующего *P. aeruginosa* [49].

Для изучения функциональных доменов пг181 были сконструированы различные делеционные мутанты *C*-конца пг181, в соответствии с алгоритмом информационных координат аминокислотных остатков (IDIC-алгоритм) [167] (рис. 12). Все deletированные белки синтезировали в *E. coli* с дальнейшей оценкой растворимости и активности.

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

Белок пг181M3 проявлял активность в разрушении клеточной стенки по отношению к клеткам *E. coli* и таким образом оказывал токсическое действие. Растворимыми и низко токсичными по отношению к клеткам *E. coli* оказались мутанты наименьшего размера пг181M5 - пг181M9. Растворимость белка пг181M7 значительно увеличивалась при добавлении к *N*-концу 17 а.о. (пг181M6). При помощи КД-спектроскопии было установлено, что растворимые делеционные мутанты выявляют преимущественно α -спиральную вторичную структуру. Для качественного подтверждения пептидогликангидролизующей активности каплю раствора белка наносили на газон клеток, предварительно обработанных парами хлороформа, который разрушает внешнюю мембрану, облегчая доступ к пептидогликановому слою. В качестве положительного контроля использовали лизоцим из белка куриного яйца. Образующиеся зоны лизиса вокруг нанесенной капли свидетельствует о наличии ферментативной активности и, соответственно, корректном определении белка пг181 как структурного ПЛФ фага фKZ.

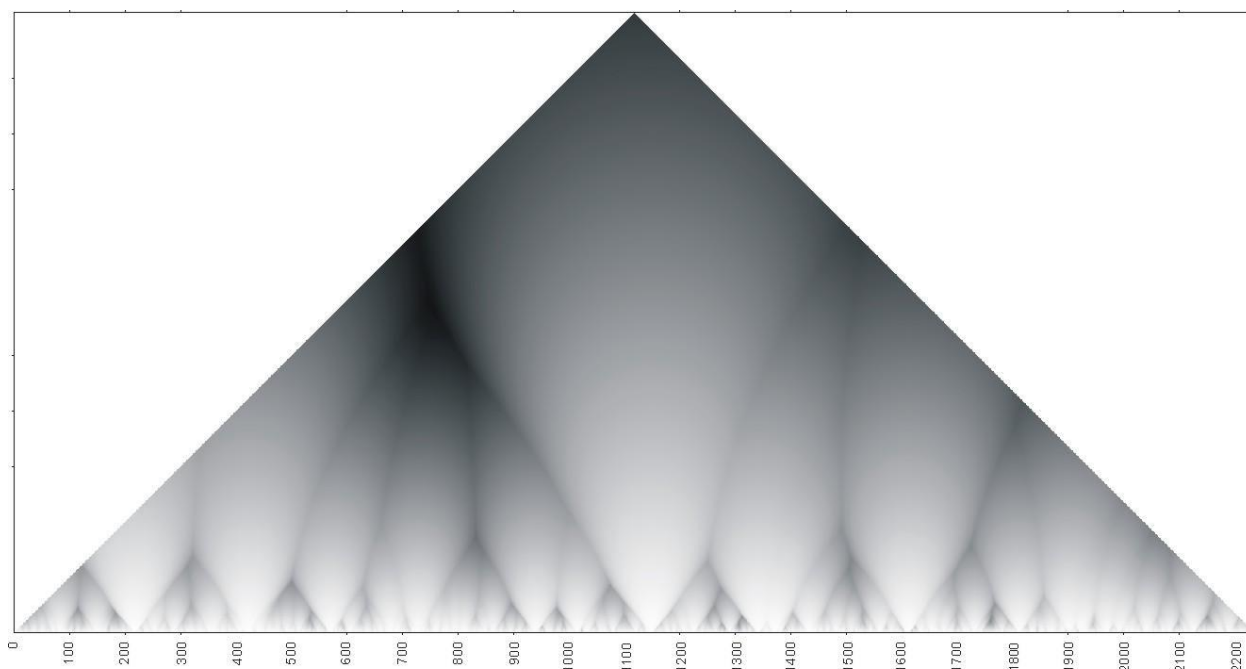


Рисунок 12. IDIC-диаграмма информационной структуры *pg181*.

Постепенное укорачивание с *N*-конца делеционных мутантов *pg181* (табл. 3.) делали на основании «информационных деревьев» (Increased Degree of Informational Coordination between residues) последовательности белка. Ранее, анализ информационной структуры белка в ряде случаев позволял проводить рациональный дизайн делеционных мутантов [167].

Все делеционные мутанты *pg181* проявляют активность, кроме *pg181M9*, который не образует зоны лизиса. Таким образом, можно сделать вывод, что минимальным каталитическим доменом служит последовательность а.о. 1880 - 2042 (что соответствует по размерам мутанту *pg181M8*, который использовали для дальнейшей характеристики ферментативной активности). По-видимому *pg181M9* входит в состав иглоподобной структуры, которая видна на крио-ЭМ реконструкции базальной пластинки фKZ и находится в центре под базальной пластинкой [41]. Преимущественно α -спиральное строение *pg181M9*, вероятно, подобно структуре аналогичного домена в составе бактериофага P22 [168].

Таблица 3. Основные свойства делеционных мутантов фKZn2181.

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

Как видно из таблицы 3, наиболее перспективными для дальнейших исследований оказались 181M6 и 181M8. Делеция осуществлялась при помощи метода ПЦР, полученные гены с сайтами рестрикции *Nde* I-*Xho* I (181M8), и *Bam*H I-*Hind* III (181M6), встраивались при помощи лигирования в вектора pET-26b, и pQE-30 соответственно. Для биосинтеза белка штамм *E. coli* AD494(DE3) трансформировали плазмидой pQE-30, несущий ген делеционного мутанта 181M6, а штамм *E. coli* BL21(DE3) - плазмидой pET-26b(+) с геном 181M8, после чего была проведена экспрессия генов и проверка на растворимость полученных продуктов. Растворимые рекомбинантные белки были очищены при помощи полигистидинового участка с использованием Ni-афинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-агарозой. Очистка обоих белковых продуктов проводилась в одну стадию с использованием ступенчатого градиента имидазола по схеме: 0 мМ имидазола при нанесении лизата клеток на колонку, 60 мМ для элюции неспецифично связанных с Ni-NTA-агарозой белков клетки и 200 мМ для элюции целевого белкового продукта, содержащего полигистидиновый участок. Чистота полученных белковых препаратов определялась при помощи ПААГ электрофореза и составила не менее 95%.

4.2.1. Изучение ферментативной активности белковых препаратов пг181M6 и пг181M8

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

Пептидогликан-лизирующие активности пг181М6 и пг181М8 были полностью охарактеризованы. Во-первых, был проведен поиск оптимальных значений буфера для полученных пептидогликан-лизирующих ферментов. Было установлено, что значения рН и рI буфера значительно влияют на ферментативную активность белковых продуктов. Тесты проводились в диапазоне значений от 20 до 320 мМ ионной силы и от 5,0 до 8,0 значений рН (табл. 4-5). Максимум активности обоих ферментов достигается при рН 6,2 и ионной силе в 140 мМ, что сходно с оптимальными значениями гомологичного пг144, описанного ранее: рН 6,2, ионная сила 120мМ NaCl [47]. Однако, в основном пг181М6 и пг181М8 активны при более низких значениях рН чем пг144, например 51% и 54% остаточной активности для пг181М6 и пг181М8 при рН 5,0 и 140 мМ и 24% в случае пг144; 42% и 37% активности для пг181М6 и пг181М8 при рН 8,0 и 140 мМ и 78% в случае пг144 [47]. Хотя значения оптимальной ионной силы для пг181М6 и пг181М8 и пг144 очень близки: 140 мМ и 120 мМ соответственно, пг181М6 и пг181М8 сохраняют активность при больших значениях ионной силы – вплоть до 320 мМ.

Таблица 4. Влияние значений рН и ионной силы на ферментативную активность пг181М6.

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

Таблица 5. Влияние значений рН и ионной силы на ферментативную активность пг181М8.

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

Ферментативные активности пг181М6 и пг181М8 были измерены, при оптимальных условиях, определенных из таблиц 4 и 5 и было проведено сравнение полученных активностей. Активность рекомбинантных ферментов была определена из линейного участка зависимости скорости реакции от количества фермента (рис. 13). Активность по отношению к клеточным стенкам, обработанных хлороформом клеток *P. aeruginosa*, составила 48090 U/мг для пг181М6 и 145040 U/мг для пг181М8. Таким образом, присутствие С-концевого фрагмента увеличивает ферментативную активность в 3 раза. Активность пг181М8 примерно в 17 раз выше активности коммерчески доступного лизоцима из яйца курицы и в 30 раз выше активности ранее описанного структурного цитолитического фермента из бактериофага фКМV *P. aeruginosa* [150], но примерно в 1,5 раза ниже чем активность пг144. Сравнение с описанными ранее литическими ферментами близкородственного фKZ бактериофага фEL дает следующую картину: активность пг181М8 выше активности EL183 (аналог пг181М6 фага фKZ) примерно в 7 раз, но примерно в 2,5 раза ниже активности EL188 (аналог пг144 фага фKZ) (табл. 6) [49]. Как указано выше, дополнительный N-концевой пептидогликан-связывающий домен приближает каталитический домен к субстрату, что объясняет более высокую ферментативную активность.

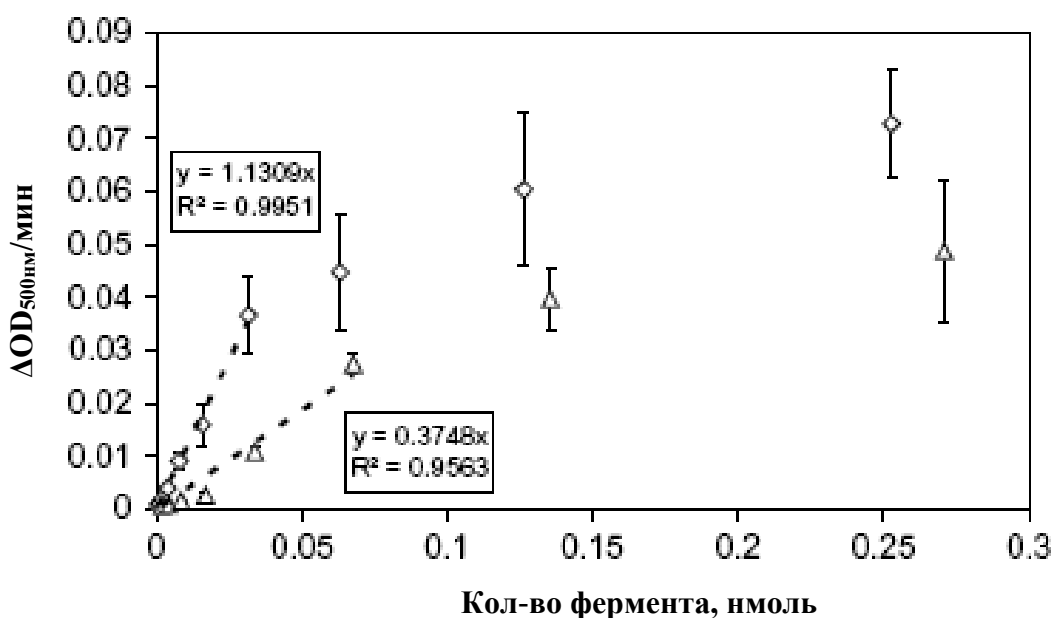


Рисунок 13. Зависимость оптической плотности от количества ферментов для пг181М6 и пг181М8 в оптимальном буфере. На рисунке отображено изменение оптической плотности $\Delta OD_{500nm}/мин$ (Y-ось) для пг181М6(ромб) и пг181М8(треугольник) (по оси x). Линейная регрессия линейной области кривых насыщения дает активность $3,77 \times 10^{12}$ и $1,25 \times 10^{12}$ U/моль для пг181М6 и пг181М8 соответственно.

Таблица 6. Сравнение активностей цитолитических ферментов из различных бактериофагов.

Название фермента	Активность (U/мг)
PMG Lys (фаг фPMG1)[169]	2310000
Пг188 (фаг фEL)	390000
Пг144 (фаг фKZ)	210000
Пг181М8 (фаг фKZ)	145000
Пг181М6 (фаг фKZ)	48090
Пг183 (фаг фEL)	19680
HEWL	8368
Пг36С (фаг фKMV)	4920

Для оценки чувствительности к термической инактивации аликвоты пг181М6 нагревали по 10 и 60 мин в диапазоне температур от 25 до 90 °С с шагом в 10 °С. Далее образцы охлаждались и остаточная активность измерялась при 25 °С. Остаточная активность после инкубирования при 90 °С в течение 10 мин составила 12%, а после инкубирования при 70 °С в течение 1 ч, фермент был полностью инактивирован, что говорит о большей термостабильности пг181М6 по сравнению с пг144, который полностью инактивировался после инкубации при 60 °С в течение 10 мин [47]. Эти результаты показывают, что большей стабильностью обладает структурный каталитический домен, которому возможно необходимо оставаться стабильным при больших величинах механических сил, действующих в процессе инфицирования. Высокая термостабильность также была обнаружена ранее у структурного лизина бактериофага фKMV *P. aeruginosa*, у которого оставалось 21% остаточной активности после инкубирования при 100 °С в течение 2 ч [50].

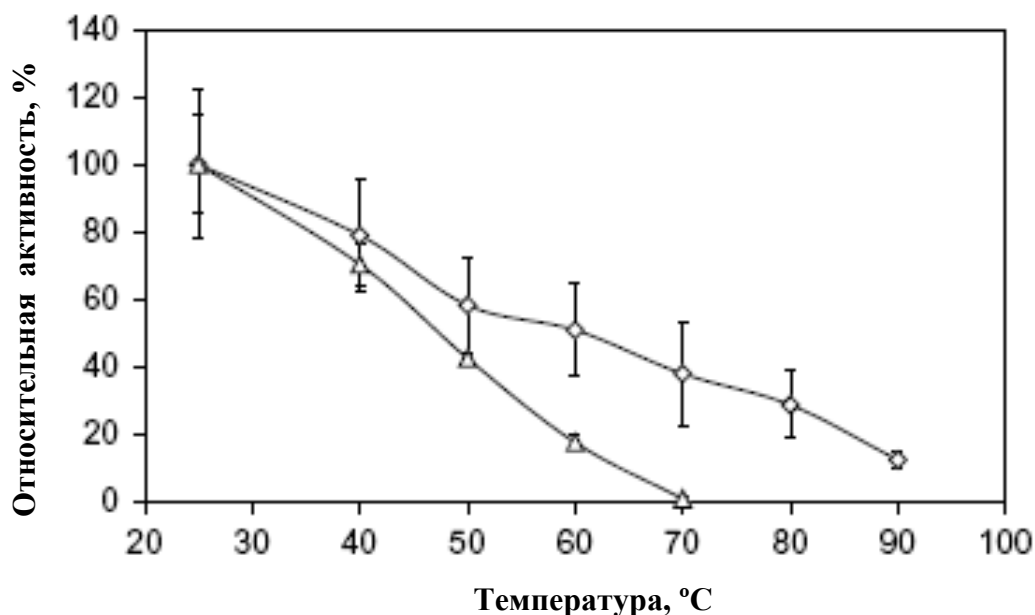


Рисунок 14. Кинетическая стабильность п181М8. Образцы п181М8 (50нг/30мкл) нагревались при различных температурах в диапазоне от 25 до 90°C, в течении 10 (ромб) и 60 (треугольник) мин. Затем образцы охлаждались во льду, измерения активности проводились при 25°C. Все измерения проводились трижды, средние стандартные отклонения отображены.

4.2.2. Определение субстрат-специфичности

Для определения субстрат-специфичности п181М6 были протестированы 7 различных видов грамотрицательных бактерий: *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Burkholderia solanacearum*, *Yersinia enterocolitica*. Все виды бактерий подвергаются лизису, что говорит о более широком спектре субстратов у структурного лизина чем у самого бактериофага фKZ, спектр бактерий хозяев которого намного уже и ограничивается несколькими штаммами *P. aeruginosa*. Пг144 также хорошо лизирует все представленные виды клеточные стенки грамотрицательных бактерий обработанных хлороформом. Соотношение ферментативной активности пг144 и пг181М6 на различных типах бактерий показывает, что пг144 более активен на всех протестированных субстратах. Наибольшая специфичность пг144 наблюдалась по отношению к *P. aeruginosa* (коэфф. 7,7), в то время как активность пг144 и пг181М6 по отношению к *Y. enterocolitica* находится практически на одном уровне (коэфф. 1,1) (рис. 15). Это позволяет предположить, что приобретение пептидогликан-связывающего домена пг144 и/или различия в каталитическом домене оказывают влияние на специфичность по отношению к субстрату.

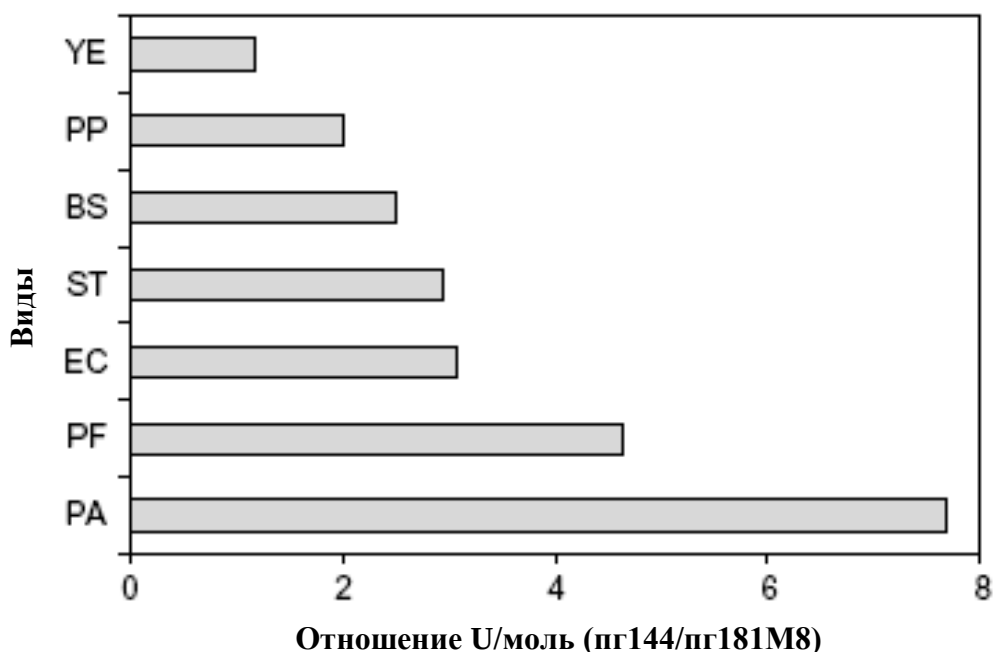


Рисунок 15. Сравнение активностей pg144 и pg181M8 для различных субстратов. Представлено отношение активности эндолизина (pg144) и домена структурного лизина (pg181M8) фага фKZ по отношению к различным видам бактерий (YE,-*Yersinia enterocolitica*; PP,-*Pseudomonas putida*; BS,-*Burkholderia solanacearum*; ST,-*Salmonella typhimurium*; EC,-*Escherichia coli*; PF,-*Pseudomonas fluorescens*; PA,-*Pseudomonas aeruginosa*).

В течение репликационного цикла, бактериофаг пересекает клеточную стенку бактерии дважды. Для обеспечения проникновения через клеточную стенку большинство бактериофагов имеют в составе ДНК две области, кодирующие пептидогликан-лизирующие ферменты. При анализе последовательности генома бактериофага фKZ было обнаружено 2 пептидогликан лизирующих фермента: pg144 (260 а.а.) и pg181 (2273 а.а.), обладающих высокой степенью гомологии (66%) каталитических доменов. Все ранее доступные данные указывают на то, что pg144 является эндолизином бактериофага фKZ [41,47,49,50].

Основываясь на масс-спектрометрической идентификации pg181 в зрелой вирусной частице бактериофага фKZ и биохимической характеристики пептидогликан лизирующего домена, расположенного недалеко от С-конца pg181, можно предположить, что pg181 участвует в процессе инфицирования бактериофагом фKZ клетки хозяина. Эта гипотеза подтверждается тем, что pg181 составляет часть базальной пластинки хвоста бактериофага фKZ, что визуализируется при помощи криоэлектронной микроскопии [41] и, по-видимому облегчает проникновение хвостовой трубки бактериофага через клеточную

стенку и мембрану бактерии путем локальной деградации пептидогликана, что впоследствии позволяет бактериофагу перенести свою ДНК в цитоплазму клетки хозяина.

Функция домена лизоцима в составе пг181 в обеспечении жизненного цикла бактериофага фKZ остается неизвестной. Возможно, подобно пг5 бактериофага Т4, он входит в комплекс «молекулярной иглы», и вместе с пг144 обеспечивает введение ДНК вируса в клетку. Поэтому окончательные этапы сборки частицы фага могут сопровождаться, как и у лизоцима пг5 фага Т4, автокаталитическим расщеплением и активацией трансгликозилазного домена пг181. Не исключено, что пг181 может принимать участие в конечном лизисе клетки-хозяина для высвобождения вновь синтезированных частиц бактериофага [47].

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

4.3. Анализ механизма действия пг144 методом точечного мутагенеза

При анализе последовательности гена 144 в системе BLAST, было найдено 62 известных и гипотетических аминокислотных последовательности со степенью гомологии больше 30% (рис. 11). На основании анализа гомологичных последовательностей был предложен каталитический остаток - Glu¹¹⁵, что в дальнейшем было подтверждено данными рентгеноструктурного анализа [46]. Анализ рентгеноструктурных данных показал, что пространственное расположение Glu¹¹⁵ в активном центре не оптимально и вероятно наличие "неканонического" дублирующего остатка, участвующего в катализе. Остаток His²⁰⁰, также расположенный в активном центре и обладающий пониженной электронной плотностью (Fokine, неопубликованные данные), был предложен в качестве второго ключевого остатка, обеспечивающего каталитическую активность. Так же было обнаружено, что высококонсервативный остаток Tyr¹⁹⁷ расположенный в -1 субсайте, имеет влияние на каталитическую активность фермента.

Каталитические домены фKZпг144 и другого ПЛФ фага, фKZпг181 (рис. 11) показывают 66% сходства и 52 % идентичности последовательности. Что указывает на возможность эволюции этим доменов через дубликацию генов. Хорошо изученным

случае системы фага с двумя ПЛФ служит бактериофаг Т4. Ферменты используются вирусом на различных стадиях инфекционного цикла [25,27]. Один из таких ферментов, Т4пг5 (575 а.о.), входит в состав базальной пластинки и используется фагом для локального разрушения клеточной стенки на ранней стадии инфекции. Другой фермент, Т4пге, или Т4 эндо-ПЛФ (эндолизин) (164 а.о.), синтезируется на поздних стадиях репродукции фага, быстро разрушает клеточную стенку и вызывает осмотический лизис бактерии. Можно было бы предположить, что растворимый белок фКЗпг144 является эндо-ПЛФ аналогично модели Т4. Однако, практически все протеомные исследования фага фКЗ показывали наличие фКЗпг144 в наборе белков частицы фага [47,49,170]. Количество фКЗпг144 в протеоме варьирует, таким образом, вопрос, принадлежит ли этот ПЛФ к структурным белкам и где локализуется, остается открытым. Возможно, фКЗпг144 способен не специфически связываться белками вириона фага и таким образом обнаруживаться в виде устойчивой примеси в структурном протеоме.

С-концевой каталитический домен пг144 (остатки 70-260) включает в себя пролин-богатый участок, состоящий из 12 аминокислотных остатков Pro⁷¹ – Ala⁸³, представляющий собой петлю, связывающую пептидогликан-связывающий домен с каталитическим. Участок Thr⁹¹ – Thr²¹³ С-концевого домена пг144 обнаруживает значительную гомологию с каталитическими доменами литических трансгликозилаз семейства 1 [171,172], представленным автолизинотом SLT70 из *E. coli* [173,174]. Среднеквадратичное отклонение между 96 C α атомами пг144 и SLT70 составляет всего 1,5 Å [46]. Семейство трансгликозилаз обнаруживает структурную гомологию с лизоцимами и особенно с гусиным лизоцимом [61] у которого С-концевая область больше чем у лизоцима из яйца курицы [175]. Большая С-концевая область также встречается у лизоцима бактериофага Т4, где она включена в связывание с пептидным компонентом пептидогликана. В семействе 1 литических трансгликозилаз можно выделить 4 типичных мотива. Мотив I начинается с С-конца и содержит каталитический остаток Glu¹¹⁵ [172]. Пг144 имеет низкую гомологию с консервативными мотивами I, II и III, но не с мотивом IV. Этот мотив включает в себя и формирует хорошо охарактеризованные сайты связывания субстратов от А до F [175].

Сайт связывания субстрата SLT70 и лизоцимов может связать 6 остатков сахаров [61,173]. Субсайт расщепления находится между остатком N-ацетилмурамоиловой кислоты (NAM) связанной в субсайте D и остатком N-ацетилглюкозамина (NAG) связанном в субсайте E. В структуре пг144 в комплексе с хитотетраозой остатки NAG связаны в субсайтах А, В, С и D, однако, положение остатка в субсайте D не определено точно. В этом заключаются отличия в структуре пг144 в свободной форме и в форме

комплекса. В нативном субстрате пг144 в позициях В и D находится остаток NAM, в то время как в хитотетраозе - NAG, а также возможно взаимодействие ковалентно присоединенного пептида к остатку NAM в положении D с пг144 и нативный субстрат связан с пг144 сильнее, чем хитотетраоза. Все это может объяснить неточное расположение остатка NAG в субсайте D, однако, такого эффекта не наблюдается в субсайте В, в котором остаток NAG располагается в аналогичном окружении.

Каталитический остаток пг144 - Glu¹¹⁵ локализован между субсайтами D и E, причем других кислотных остатков поблизости нет, что согласовывается с предполагаемым механизмом. Структура SLT70 была определена в комплексе с 1,6-ангидромуропептидом (NAG-anhNAM-L-ALA-D-GLU-M-Dap) [174]. Остаток NAG в субсайте E образует 3 водородные связи с тремя гидрофильными остатками (Gln⁴⁷⁷, Glu⁴⁷⁸ и Gln⁴⁹⁶). 2 из них (Glu¹¹⁵ и Gln¹³⁴) консервативны и пг144.

Были сконструированы праймеры для замены остатков Glu115, Tyr197 и His200 на Ala, Leu и Phe соответственно. Используя плазмиду pKZ144 в качестве матрицы, были получены плазмиды с одиночными и двойными заменами pKZ144-E¹¹⁵A, pKZ144-H²⁰⁰L, pKZ144-Y¹⁹⁷F, pKZ144-E¹¹⁵A/H²⁰⁰L, pKZ144-E¹¹⁵A/Y¹⁹⁷F, pKZ144-H²⁰⁰L/Y¹⁹⁷F. Все плазмиды были проверены при помощи секвенирования. Для экспрессии точечных мутантов штамм *E. coli* AD494 был трансформирован полученными плазмидными конструкциями. Экспрессия генов и очистка точечных мутантов с помощью Ni-хелатной хроматографии проводилась по описанным ранее методикам, без существенных изменений [47]. После очистки были получены белковые препараты содержащие 3-6 мг белка с чистотой >90%.

Ранее было показано, что пг144 обладает трансгликозилазной активностью и эффективно разрушает клеточные стенки бактерий *P. aeruginosa*, обработанных хлороформом [51], а максимальная активность фермента достигается при pH=6,2 и I=120 mM [47]. Для измерения активностей точечных мутантов, очищенные белковые препараты объемом 30 мкл добавляли к суспензии клеточных стенок обработанных буфером насыщенным хлороформом объемом 270 мкл и наблюдали падение оптической плотности, конечная масса белка на реакцию составила 30 нг. Оптическую плотность измеряли в течение 90 мин с интервалом в 1 мин. Полученные данные обрабатывали при помощи программы Activity Calculator.

Было обнаружено, что при замене двух аминокислот в любых сочетаниях фермент полностью теряет активность. При замене Glu¹¹⁵ на Ala активность мутанта составляет около 54% активности фермента дикого типа, при замене Tyr¹⁹⁷ на Phe активность составляет также 51% (рис. 16). Все мутанты проявляли максимальную активность при

том же составе буфера, что и фермент дикого типа – pH=6,2 и I=120 мМ, все ферментативные реакции проводились в данных условиях.

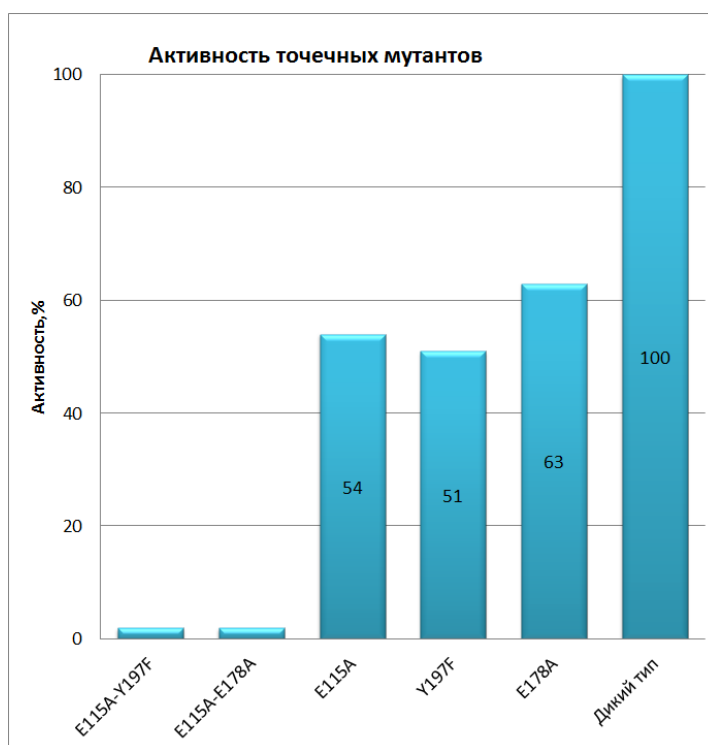


Рисунок 16. Диаграмма активностей одиночных и двойных мутантов *φKZn2144* в сравнении с активностью дикого типа, принятой за 100%.

Для исследования конформационной подвижности белка был использован метод молекулярной динамики.

Исходя из кристаллической структуры 3ВКН [41] были созданы гидратированные модели на основе силового поля AMBER [158,176]. Проводилось моделирование методом молекулярной динамики в пакете GROMACS [160,161,177] со следующими параметрами: время симуляции 100 нс, шаг 2 фс, радиус обрезания Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий 1 нм, метод учета электростатических взаимодействий PME, температура 300К с отдельным термостатированием белка и раствора, использовались периодические граничные условия с кубической ячейкой.

Анализ данных проводился путем сравнения среднеквадратичного отклонения от нативной структуры. За референсную структуру была принята конформация трансгликозилазы, полученная путем молекулярной динамики при 300К. Сравнение проводилось по атомам белкового остова только тех аминокислот, что находятся вблизи субстрата (аминокислоты: 110-116, 125-150, 168-185, 195-210, 220-230) и могут влиять на его связывание с ферментом. В связи с тем, что при комнатной температуре подвижность молекулы слишком велика, чтобы на доступных временах вычисления сделать статистически достоверные выводы о конформационных отличиях, был применен метод

отжига структур к низким температурам. Система плавно замораживалась в течение 1 нс от температуры 300K до температуры жидкого азота (77K). Результирующие графики среднеквадратичных отклонений нативной и мутантных форм трансгликозилазы приведены на рисунке 17, суммарные результаты вычислений представлены в таблице 7.

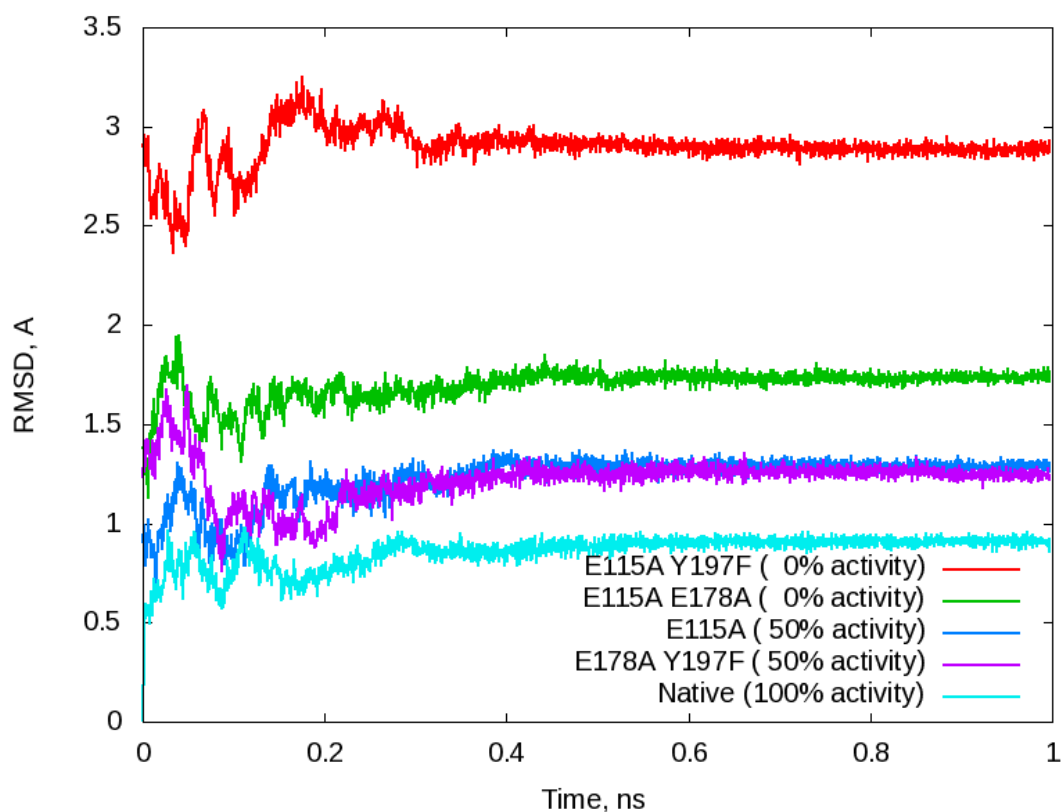


Рисунок 17. Среднеквадратичное отклонение белкового остова трансгликозилаз во время заморозки до 77K. Вычисление отклонения проводилось только для участка, контактирующего с субстратом.

Таблица 7. Сводная таблица среднеквадратичных отклонений белковой структуры в процессе отжига к температуре жидкого азота.

Фермент	Среднее, Å	Стнд. Ошибка, Å	Мин, Å	Макс, Å
Нативный	0,858	0,081	0,005	0,974
E ¹¹⁵ A	1,225	0,118	0,692	1,370
E ¹¹⁵ A - Y ¹⁹⁷ F	2,895	0,104	2,366	3,249
E ¹⁷⁸ A - Y ¹⁹⁷ F	1,219	0,110	0,762	1,693
E ¹¹⁵ A - E ¹⁷⁸ A	1,693	0,084	1,130	1,944

Был проведен анализ структуры бороздки для дополнительной оценки изменения конформаций белка при различных заменах - численный, путем оценки расстояний между СА атомами 126 и 229 аминокислот (рис. 18) и визуальный. На рисунке 19 заметно, что

белковые молекулы довольно сильно изменяют свою конформацию. Например, при мутациях основного активного центра изменяется форма бороздки, в которую укладывается субстрат, что вероятно, вызывает снижение аффинности белка к субстрату и, как следствие, реакционной способности. Из рисунка 18 следует, что двойная мутация по первому активному центру приводит наиболее сильному «открытию» бороздки.

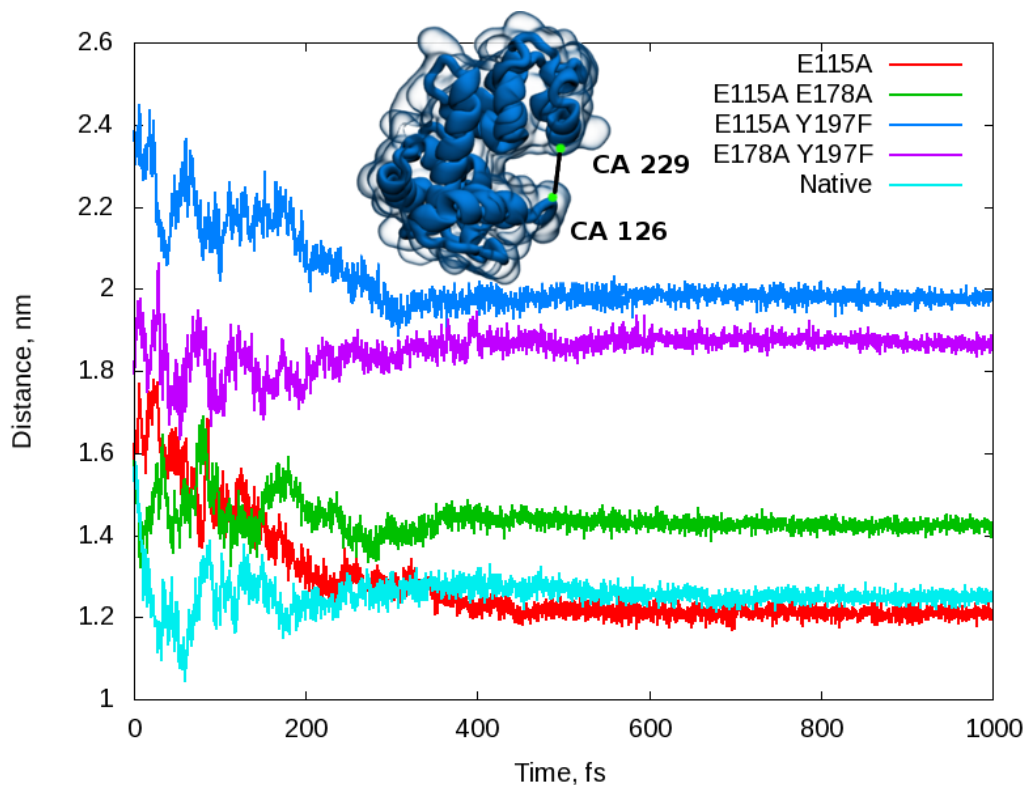


Рисунок 18. Изменение расстояния между СА атомами 126 и 229 аминокислот во время заморозки до 77K.

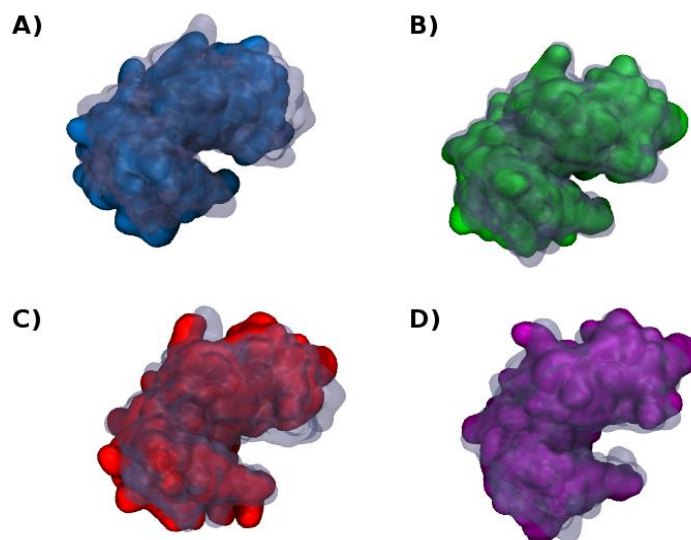


Рисунок 19. А) $E^{115}A$ В) $E^{115}A - E^{178}A$ С) $E^{115}A - Y^{197}F$ D) $E^{178}A - Y^{197}F$ Поверхности мутантных форм трансглюкозилазы после отжига к 77К в сравнении с нативной формой. полупрозрачная поверхность принадлежит нативной структуре трансглюкозилазы. На изображениях удален пептидогликан-связывающий домен. Бороздка показана в профиль.

Для каждого мутанта было вычислено распределение зарядов на поверхности доступной растворителю. На рисунке 20 видно, что замены аминокислот в активных центрах приводят к сильному изменению распределения зарядов.

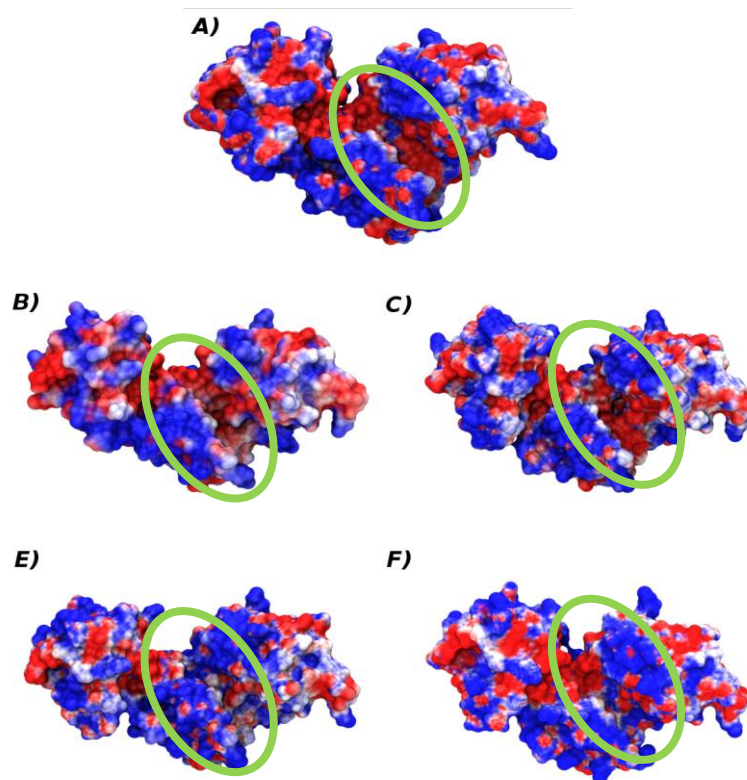


Рисунок 20. Распределение зарядов на поверхности изоформ трансгликозилазы. Выделен участок, связывающий субстрат. А) нативная структура В) $E^{115}A$ С) $E^{178}A$ - $Y^{197}F$ D) $E^{115}A$ - $E^{178}A$ E) $E^{115}A$ - $Y^{197}F$

Анализ генома фага фKZ выявил наличие белка фKZпг144 (260 а.о, 28815 Да), в котором было установлено присутствие каталитического домена, сходного с ПЛФ, а также N-концевой пептидогликан связывающий домен. Это показывает, что фKZпг144 является природным химерным белком, образовавшимся путем рекомбинации двух доменов. В составе бактериофагов, инфицирующих грамположительные бактерии часто встречаются мультидоменные или модульные ПЛФ [180], но в отличие от фKZпг144 в таких белках пептидогликан-связывающий домен расположен на C-конце. В тоже время растворимые эндо-ПЛФ бактериофагов, которые инфицируют грамотрицательные бактерии, состоят из одного каталитического домена. Таким образом, фKZпг144 и аналогичные ему ферменты из фKZ-подобных фагов (EL пг188 и 201φ 2-1 пг276 - первые найденные в природе олигомодульные ПЛФ грамотрицательных бактерий [49,178].

Пространственная структура phiKZ пг144 апофермента (3BKV) и фермента со связанной молекулой хитотетраозы, тетрамером N-ацетилглюкозамина, GlcNAc, (3BKH) получена с помощью рентгеновской кристаллографии с разрешением 2,6 Å [46]. C-концевой домен белка в основном состоит из α-спиралей и структурно схож с каталитическим доменом литических трансгликозилаз класса 1 (а.о. 71-260), а N-концевой участок (а.о. 1-70) - пептидогликан-связывающий домен (рис.10).

N-концевой домен пг144 относится к группе доменов, в среднем включающих 70 аминокислотных остатков и представляющих собой пучок из трех α -спиралей и выполняет функцию связывания пептидогликана. Впервые структура этого типа была описана в составе Zn -зависимой Ala-Ala карбоксипептидазы [52], а позже обнаружена у ряда ферментов, разрушающих клеточные стенки бактерий [53]. Было экспериментально показано, что *N*-концевой домен пг144 фузированный с GFP связывается с клеточными стенками [49]. Гомология пептидогликан-связывающего домена пг144 с модулями этой группы значительно ниже, чем у каталитического домена пг144 и других трансгликозилаз. Это, видимо, связано с сохранением лишь общей архитектуры домена, в то время как аминокислотные остатки, ответственные за связывание с конкретными участками пептидогликанов, различаются. Такие многомодульные ферменты, подобные фKZпг144 и *D*-Ala-*D*-Ala карбоксипептидазе, включают в себя на *N*- или *C*-конце белка дополнительный домен, помимо активного центра. По-видимому, наличие таких доменов обеспечивает более сильную координацию и связывание субстрата. Наличие дополнительного, помимо собственно активного центра фермента, домена связывания с субстратом, скорее всего, объясняет повышенную селективность эндолизина пг144 и отсутствие цитотоксического действия на *E. coli* [47].

При определении олигомерности фKZпг144 было обнаружено образование лабильных димеров и тримеров в растворе белка. По-видимому, это обусловлено наличием в *N*-концевом домене двух остатков цистеина экспонированных к растворителю, которые могут образовывать дисульфидные связи между различными молекулами белка.

C-концевой домен фKZпг144 имеет высокое структурное сходство с белком SLT70 *E. coli* [173,174], относящегося к литическим трансгликозилазам семейства 1. Наиболее выраженное структурное сходство этих белков проявляется в области мотива формирующего впадину на поверхности фермента (а.о. 91 - 213) (рис. 21). Эта впадина на поверхности ПЛФ может связывать 6 остатков сахаров, которые обозначаются буквами А, В, С, D, Е и F. ПЛФ катализирует гидролиз О-гликозидной связи между остатками *N*-ацетилмуравовой кислоты находящимся в позиции D и *N*-ацетилглюкозамином, находящимся в позиции Е. Анализ пространственной структуры фKZпг144 с тетрагидротетраозой показывает, что (GlcNAc)₄ находится в позициях А, В, С и D [46].

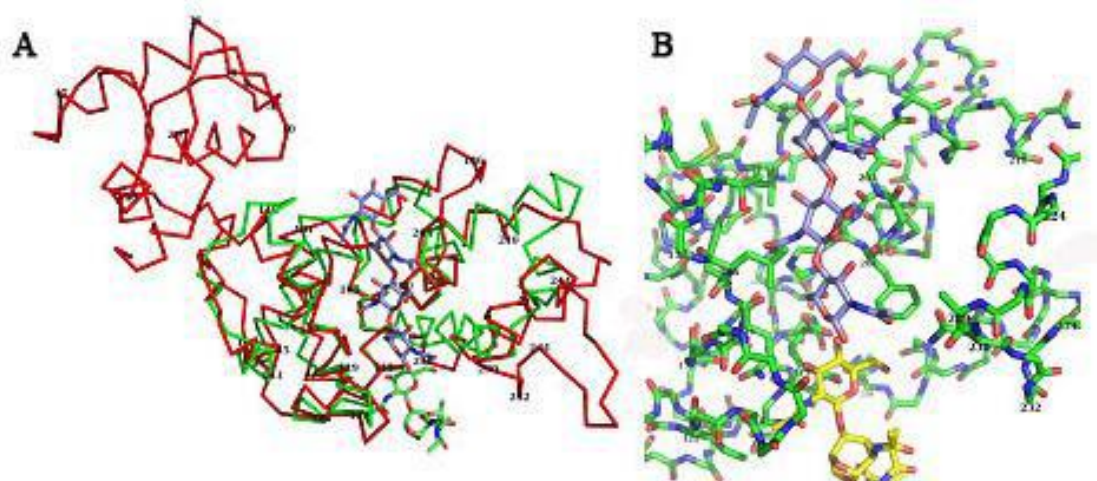


Рисунок 21. Сравнение каталитических доменов фKZпг144 и SLT70. (А) Направление цепи Са фKZпг144 показано красным, каталитического домена SLT70 зеленым. Показаны молекулы субстратов, связанных с активными центрами - хитотетраозы (синий) для фKZпг144 и 1,6 - ангидромуропептида (темно-зеленый) для SLT70. (В) Участок связывания субстрата фKZпг144. Белок представлен в виде основной цепи полипептида и боковых цепей остатков, формирующий активный центр.

Масс-спектрометрический анализ продуктов разложения пептидогликана ферментом фKZпг144 подтвердил, что фермент по направленности действия представляет собой литическую трансгликозилазу [50]. Трансгликозилазы катализируют гидролиз $\beta(1,4)$ -гликозидной связи между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина, и добавляют новую гликозидную связь к гидроксильной группе С6 остатка мурамовой кислоты. Измеренная активность рекомбинантного фKZпг144 составляет $2,1 \times 10^4$ ед/моль, что примерно в 143 раза выше, чем у лизоцима из яйца курицы. Максимум активности фKZпг144 достигается при pH 6,2 и ионной силе, соответствующей 120 mM NaCl.

Количество положительно заряженных остатков фKZпг144 (11 Arg и 21 Lys) больше, чем отрицательно заряженных (14 Asp и 12 Glu), что приводит к теоретической изоэлектрической точке 9,1. Спектроскопия КД показала, что рекомбинантный фKZпг144 имеет преимущественно α -спиральную структуру [47,50], хотя наблюдается снижение пропорции альфа-структуры при взаимодействии белка с димиристоилфосфатидилглицерином (DMPG), одним из компонентов плазматической мембраны бактерий. Изучение взаимодействия фKZпг144 с мембранными везикулами DMPG анионных липидов, содержащих кальцеин показало, что фKZпг144 вызывает быстрый выброс флуоресцентного кальцеина. Таким образом, предполагается, фKZпг144 способен дестабилизировать мембраны бактерий [50,179].

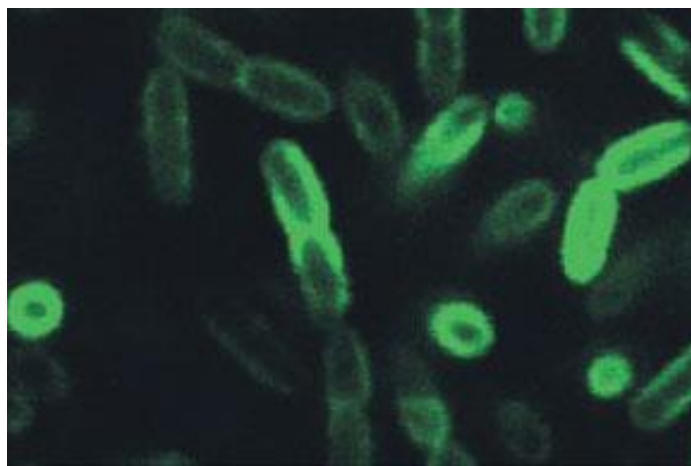


Рисунок 22. Конфокальная флуоресцентная микроскопия связывания гибридного белка «N-концевой домен фKZпг144 + GFP» с клетками *P. aeruginosa*.

При воздействии фKZпг144 на клетки *P. aeruginosa* происходит только временное замедление роста бактерий. Однако при добавлении фKZпг144 к бактериям, которые были обработаны хлороформом, наблюдалось уменьшение оптической плотности, что свидетельствует о разрушении клеточных стенок бактерий. При обработке хлороформом происходит дестабилизация внешней мембраны клеток и открывается доступ к пептидогликану клеточной стенки. фKZпг144 лизирует клетки грамотрицательных нескольких видов бактерий, которые были обработаны хлороформом, однако на грамположительные бактерии он влияния практически не оказывает.

Также в N-концевой части белка фKZпг144 находится пептидогликан-связывающий домен (рис. 11). Эксперименты с созданием химерного белка, в котором к N-концевому пептидогликан-связывающему домену пг144 присоединяли зеленый флуоресцентный белок, показали, что этот домен может связываться с пептидогликанами клеточных стенок *Pseudomonas aeruginosa* и других грамотрицательных бактерий, обработанных хлороформом (рис. 22) [49]. Эти результаты предполагают, что участки связывания пептидогликана имеются и в N-концевом домене, и в каталитическом центре фKZпг144.

При анализе консервативности аминокислотных остатков и пространственной структуры был установлен аминокислотный остаток участвующий в катализе - Glu¹¹⁵, расположенный между сайтам связывания субстрата в позициях D и E. Механизмом реакции литических трансгликозилаз (рис.23) [181] предполагается, что единственный ключевой остаток Glu¹¹⁵ выступает донором протона для гликозидного атома кислорода в связи между MurNAc остатком D и GlcNAc остатком E. Затем образуется интермедиат в виде иона оксазолинового цикла, а Glu¹¹⁵ стабилизирует протон гидроксильной группы C-6. После чего протон с остатком Glu¹¹⁵ уходит, что приводит к образованию 1,6-

ангидромурамовой кислоты. Каталитический центр фKZпг144 не имеет других кислотных остатков в окружении позиций связывания сахаров D и E. Предполагаемый механизм катализа фKZпг144 подразумевает, что остаток Glu¹¹⁵ должен оставаться протонированным при физиологических pH. Однако теоретическое вычисление значения pKa для Glu¹¹⁵ на основе уточненной рентгеновской структуры дает очень низкое значение 1,1, что предполагает депротонированную форму остатка Glu¹¹⁵. Мутагенез Glu¹¹⁵ показал, что мутант фKZпг144 не теряет ферментативной активности полностью, а сохраняет около 30% активности фермента дикого типа. Таким образом очевидно, что строение активного центра и аминокислотные остатки, участвующие в катализе, отличаются от канонической модели.

Однако, анализ рентгеноструктурных данных показал, что пространственное расположение Glu¹¹⁵ в активном центре не оптимально. В ферменте дикого типа Tyr¹⁹⁷, по-видимому образует водородную связь с карбоксильной группой остатка Glu¹¹⁵ и таким образом ее активирует [46].

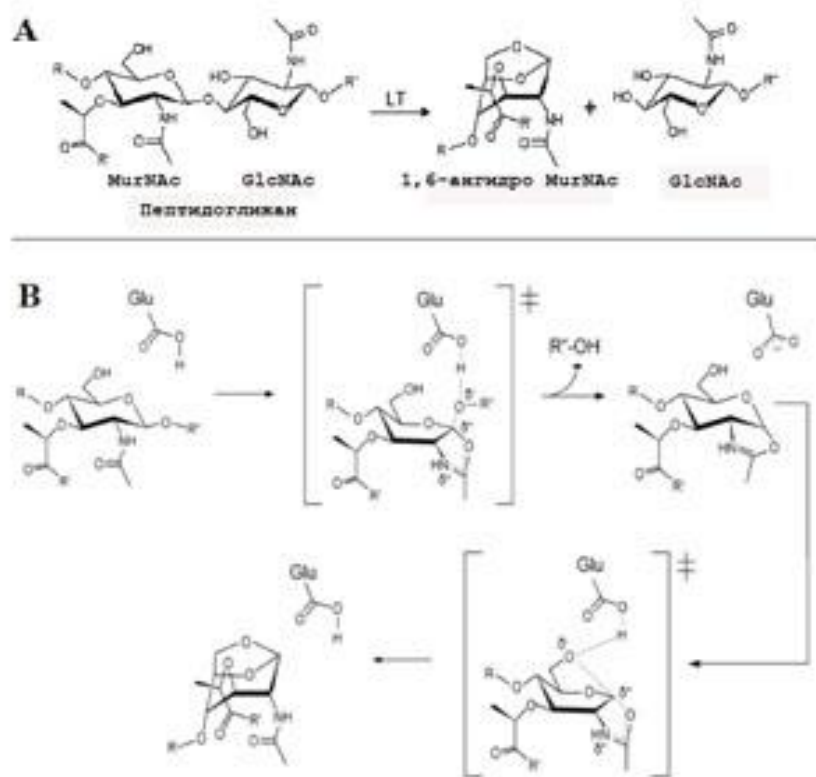


Рисунок 23. Реакция (A) и предполагаемый механизм расщепления пептидогликана (B), катализируемого литическими трансгликозилазами.

Пространственная структура 3BKV фKZ пг144 показывает высокую степень сходства каталитического домена со структурой аналогичного домена трансгликозилазы Slt70 из *E. coli* [182]. Положение и ориентация каталитического аминокислотного остатка

Glu¹¹⁵ в пг144 сходно с положением для остатка Glu⁴⁷⁸ в Slt70. Ранее был предложен механизм катализа трансгликозилазы Slt70, отличающийся от классического механизма наличием дополнительного аминокислотного остатка Tyr⁵⁹⁷, находящимся в каталитическом центре фермента и участвующем в катализе. Функция Tyr⁵⁹⁷ заключается в активации каталитического аминокислотного остатка Glu⁴⁷⁸ через образование водородной связи с ним, что увеличивает отрицательный заряд на Glu⁴⁷⁸ и облегчает протонирование *O*-гликозидной связи [183]. В полипептиде фKZ пг144 имеется остаток Tyr¹⁹⁷, расположение и ориентация которого сходны с Tyr⁵⁹⁷ в Slt70. Высокая степень пространственной гомологии позволяет предположить, что катализ фKZ пг144 происходит по варианту, аналогично механизму Slt70.

Основная гипотеза, объясняющая частичное сохранение активности фермента при замене основного каталитического остатка, предполагает наличие двух каталитических участков — главного Glu¹¹⁵/Tyr¹⁹⁷ и дублирующего Glu¹⁷⁸/Tyr¹⁴⁷. Расположение аминокислот предполагаемого второго активного центра относительно цепи пептидогликанового субстрата похоже на конформацию аминокислотных остатков в основном активном центре. При совмещении положения при помощи вычислений минимальных среднеквадратичных отклонений для боковых цепей остатков «основного» и «дублирующего» активных центров была получена практически идентичная позиция (рис. 24).

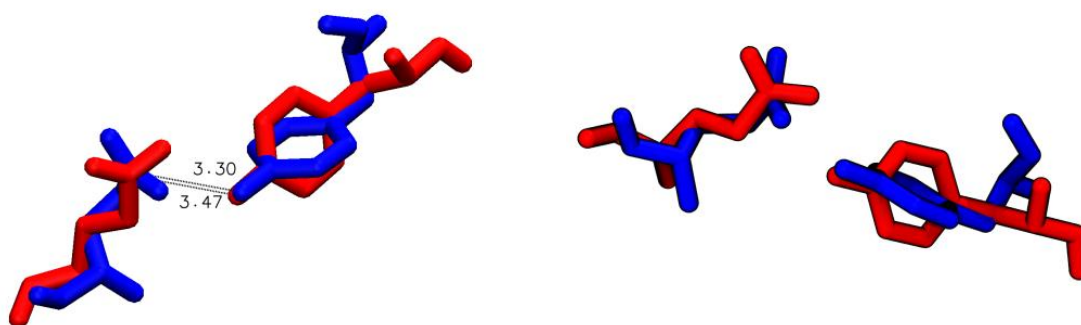


Рисунок 24. Совмещенные аминокислоты активных центров. Красным цветом обозначена пара Glu¹¹⁵ - Tyr¹⁹⁷, синим - Glu¹⁷⁸ - Tyr¹⁴⁷. Расстояние в Å.

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

фермента дикого типа (по данным связывания с аффинной смолой и спектроскопии кругового дихроизма). Очистку мутантных белков проводили с помощью Ni-хелатной хроматографии [47] без существенных изменений. Полученные препараты мутантных белков содержали 3-6 мг белка с чистотой >90%.

Одиночные мутанты E¹¹⁵A, E¹⁷⁸A и Y¹⁹⁷F по каждому из остатков проявляли активность 54, 63 и 51%, соответственно, в сравнении с ферментом дикого типа фKZпг144 (рис. 16). Все мутанты проявляли максимальную активность при том же составе буфера, что и фермент дикого типа (pH=6,2 и I=120 mM NaCl), далее все ферментативные реакции проводили в этих условиях. Замена аминокислотных остатков His²⁰⁰ приводила к снижению активности на 20-30%, что подтверждает предположение об участии остатков гистидина в координации субстрата.

Таблица 8. Изменение активности двойных мутантов фKZпг144.

Фермент	Дикий тип	E ¹⁷⁸ A	Y ¹⁹⁷ F	E ¹¹⁵ A	E ¹¹⁵ A Y ¹⁹⁷ F	E ¹¹⁵ A E ¹⁷⁸ A
Активность, U/мг	210000	132000	107000	113000	0	0

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

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

Методами докинга был получен набор возможных конфигурация реакционных комплексов связывания естественного субстрата N-ацетилмурамоила-N-ацетилглюкозамина с ферментом. На основании анализа структуры 3BKV [46] (комплекс фKZпг144 с синтетическим субстратом N-ацетил-D-глюкозамином) можно предполагать, что данный субстрат будет располагаться аналогичным образом.

Молекула субстрата была построена и отрелаксирована в программе Avogadro [151]. Докинг проводился с помощью веб сервиса SwissDock [152] к отрелаксированной, а

затем замороженной нативной структуре. Далее был отобран вариант наиболее похожий по ориентации и положению на структуру 3BKV.

Полученный комплекс был модифицирован в программе Avogadro путем переноса N-ацетилмурамоила с одного конца молекулы на другой. Наиболее вероятное расположение субстрата в бороздке активного центра показано на рисунке 25. Мы предположили, что заряд бороздки связывания имеет большое влияние на связывание субстрата. При помощи программ PDB2PQR [154,155] и APBS [156] был произведен расчет распределения зарядов в нативной белковой молекуле. Как показало вычисление поверхностного заряда глобулы белка фKZпг144, бороздка связывания субстрата заряжена преимущественно положительно.

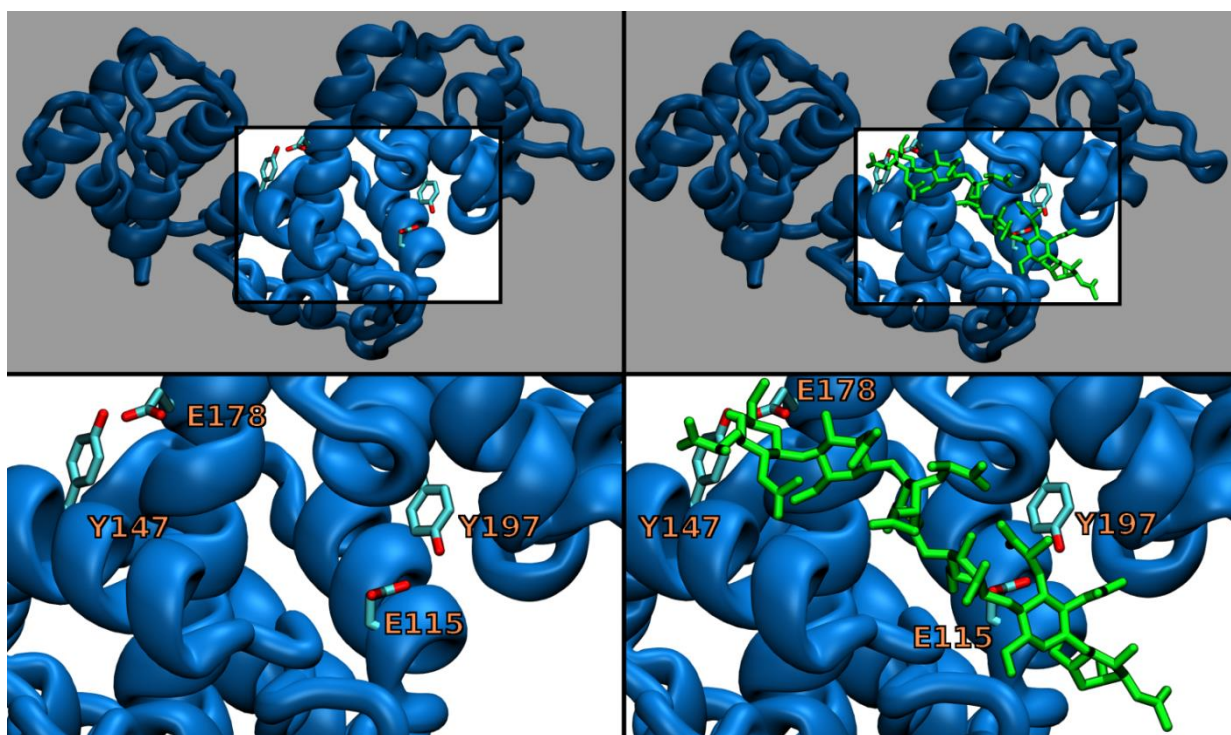


Рисунок 25. Боковые цепи аминокислотных остатков, формирующие активные центры фKZпг144 и возможное расположение молекулы MurNAc-GlcNAc. На верхних рисунках изображен общий вид фермента без субстрата (сверху слева) и с субстратом (сверху справа). На нижних рисунках крупным планом изображены сайты связывания фермента без субстрата (снизу слева) и с субстратом (снизу справа).

Была проведена дополнительная оценка изменения конформации белка для всех мутантов методом молекулярно-динамического анализа конфигурации бороздки, путем оценки внешнего вида бороздки и расстояний между C α атомами 126 и 229 а.о. В случае некоторых мутаций, область активного центра фKZпг144 довольно сильно изменяет свою

конформацию, что обусловлено изменением взаимодействия между боковыми цепями а.о., которые формируют активный центр.

Исходя из кристаллической структуры фKZпг144 и полученного методами докинга комплекса фKZпг144 - MurNAc-GlcNAc первый этап ферментативного катализа это связывание субстрата в бороздке на поверхности белковой глобулы, которую образует каталитический центр. Вторым этапом катализа является атака $\beta(1-4)$ гликозидной связи и расщепление субстрата. Очевидно, что замена аминокислотных остатков в активных центрах может изменить ход второго этапа каталитической реакции. Кроме того, мутация может привести и к изменению формы связывающей поверхности (бороздки) и изменению распределения зарядов, что препятствует правильной ориентации субстрата относительно аминокислот активного центра и блокирует всю реакцию в целом. Таким образом, можно предположить два механизма инактивации фKZпг144 при точечном мутагенезе: непосредственная инактивация реакционного сайта и изменение конформации молекулы, приводящее к неспособности фермента правильно координировать субстрат.

Мутант E¹¹⁵A Y¹⁹⁷F не обладает активностью, несмотря на то, что один из реакционных центров остался в нативном состоянии и должен сохранить активность. Двойная мутация близкорасположенных аминокислот приводит к сильному изменению конформации связывающей субстрат поверхности и смене заряда в этой области бороздки. Такое изменение свойств поверхности, вероятно, не позволяет фKZпг144 связывать субстрат, и фермент полностью теряет активность.

Мы предполагаем, что в полипептидной цепи трансгликозилазы фKZпг144 существует два активных центра: основной E¹¹⁵ Y¹⁹⁷ и дублирующий E¹⁷⁸ Y¹⁴⁷. Участок молекулы пептидогликана может связаться с бороздкой на глобуле фермента двумя способами (схематично изображено на рис. 26). Предположительно, направление укладки субстрата имеет значение для протекания реакции и определяет, какой из активных центров проведет реакцию разрезания субстрата. То есть при инактивации одного из участков активного центра соответствующий способ укладки субстрата не будет приводить к реакции.

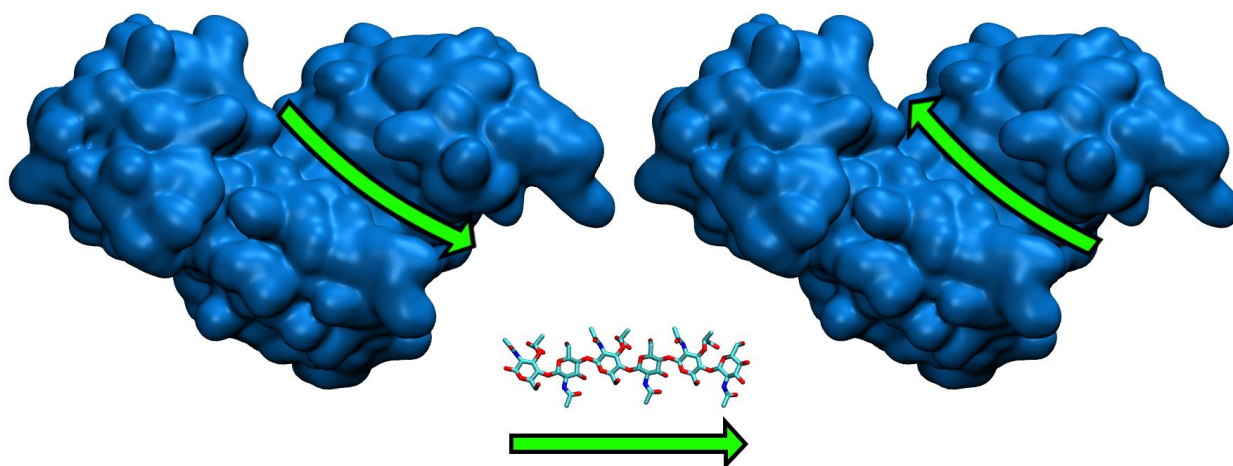


Рисунок 26. Схема возможных направлений укладки субстрата в бороздку $\phi KZn2144$. Субстрат (*N*-ацетилмурамоил-*N*-ацетилглюкозамин) показан над стрелкой.

Ключевым остатком осуществляющим атаку на β 1-4 гликозидную связь является Glu, при его замене происходит полная инактивация одного из активных центров, что приводит к общему снижению активности фермента в два раза.

Одиночные мутации по Тут так же приводят к снижению активности фермента. В пространственной модели активного центра Glu и Тут обращены друг к другу и образуют водородную связь. Большую часть времени симуляции методом молекулярной динамики они скоординированы таким же образом. Можно предположить, что Тут фиксирует Glu в наиболее выгодном с точки зрения протекания реакции положении. Замена Тут на Phe приводит к смещению боковой цепи Glu в сторону от выгодного положения и изменению активности мутантного сайта. В эксперименте с двойным мутантом $E^{178}A/Y^{197}F$ показано, что инактивации сайта не происходит. Несмотря на выключение одного из активных центров, вызванное заменой Glu, второй активный центр сохраняет активность без остатка Тут.

Двойной мутант $E^{115}A - E^{178}A$ не проявляет активности, так как произведена замена атакующих остатков глутамата в обоих реакционных центрах.

Мутант $E^{115}A - Y^{197}F$ не обладает активностью, несмотря на то, что один из реакционных центров остался в нативном состоянии и должен сохранить активность. Двойная мутация близкорасположенных аминокислот привела к сильному изменению конформации связывающей субстрат поверхности (Рисунок 17, Рисунок 19 С), а также привела к смене заряда в этой области бороздки (Рисунок 20 Е). Такое изменение свойств поверхности, вероятно, не позволяет трансгликозилазе связывать субстрат и фермент полностью теряет активность.

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

5. Заключение

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

Несмотря на законченный результат, разработанный подход позволит проводить рациональный дизайн ПЛФ. Полученные в данной работе ферменты потенциально могут найти применение в качестве «энзибиотиков» для антимикробной терапии против *P. aeruginosa*. Делеционные мутанты пг181 устойчивы при повышенной температуре и обладают широким спектром действия, а также высоким уровнем активности. Данные структуре активного центра и наличии второго активного центра у пг144 в перспективе позволят создать новые ферменты с повышенной активностью. Помимо этого, возможно применение используемых методов к аналогичным ПЛФ.

6. Выводы

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

7. Список используемых сокращений

ПЛФ – пептидогликанлизирующие ферменты

ПГ – продукт гена

А.О. – аминокислотный остаток

П.О. – пар оснований

ЛПС – липополисахарид

ORF – open reading frame, открытая рамка считывания

NAG - N-Acetylglucosamine, N-ацетилглюкозамин

GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок

NAM - N-Acetylmuramic acid, N-ацетилмурамовая кислота

КД – круговой дихроизм

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Ni-NTA – nikel-nitrilotriacetic acid, никель-нитрилотриуксусная кислота

IPTG – isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

PMSF – фенилметилсульфонилфторида

SDS – додецилсульфат натрия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

О.Е. – оптические единицы

HEWL - Hen Egg-White Lysozyme, лизоцим из яйца курицы

DMPG - 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol,

димиристоилфосфатидилглицерином

MurNAc – Muramoil-N-acetil, мурамоил-N-ацетил

GluNAc – Glucosamin-N-acetil, глюкозамин-N-ацетил

8. Список литературы

1. Ahearn D.G. et al. Primary adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to inanimate surfaces including biomaterials // *Methods in Enzymology*. 1999. Vol. 310. P. 551–557.
2. Giamarellou H. Therapeutic guidelines for *Pseudomonas aeruginosa* infections // *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000. Vol. 16. № 2. P. 103–106.
3. Stover C.K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen // *Nature*. 2000. Vol. 406. № 0028–0836. P. 959–964.
4. Tenover F.C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria // *The American Journal of Medicine*. 2006. Vol. 119. № 6. P. S3–S10.
5. Souli M., Galani I., Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. // *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2008. Vol. 13. № 47.
6. Mathee K. et al. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105. № 8. P. 3100–3105.
7. Hentzer M. et al. Alginate overproduction affects *pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function // *Journal of Bacteriology*. 2001. Vol. 183. № 18. P. 5395–5401.
8. Branda S.S. et al. Biofilms: The matrix revisited // *Trends in Microbiology*. 2005. Vol. 13. № 1. P. 20–26.
9. Kay M.K. et al. Bacteriophage ecology in *Escherichia coli* and *pseudomonas aeruginosa* mixed-biofilm communities // *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. Vol. 77. № 3. P. 821–829.
10. Bergan T. Bacteriophage typing and serogrouping of *Pseudomonas aeruginosa* from animals. // *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and immunology*. 1972. Vol. 80. № 3. P. 351–361.
11. Deresinski S. Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas. // *Clinical infectious*

- diseases. 2009. Vol. 48. № 8. P. 1096–1101.
12. Davidson A.R. et al. Long noncontractile tail machines of bacteriophages. // *Advances in experimental medicine and biology*. 2012. Vol. 726. P. 115–142.
 13. Leiman P.G., Shneider M.M. Contractile tail machines of bacteriophages. // *Advances in experimental medicine and biology*. 2012. Vol. 726. P. 93–114.
 14. Abuladze N.K. et al. Tail length determination in bacteriophage T4. // *Virology*. 1994. Vol. 199. P. 301–310.
 15. Katsura I., Hendrix R.W. Length determination in bacteriophage lambda tails // *Cell*. 1984. Vol. 39. № 3 PART 2. P. 691–698.
 16. Davidson A.R. et al. Long noncontractile tail machines of bacteriophages. // *Advances in experimental medicine and biology*. 2012. Vol. 726. P. 115–142.
 17. Pell L.G. et al. The X-ray crystal structure of the phage lambda tail terminator protein reveals the biologically relevant hexameric ring structure and demonstrates a conserved mechanism of tail termination among diverse long-tailed phages. // *Journal of molecular biology*. 2009. Vol. 389. № 5. P. 938–951.
 18. Leiman P.G. et al. Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers // *Virology journal*. 2010. Vol. 7. P. 355-393.
 19. Kostyuchenko V.A. et al. The tail structure of bacteriophage T4 and its mechanism of contraction. // *Nature structural & molecular biology*. 2005. Vol. 12. № 9. P. 810–813.
 20. Zheng W. et al. Refined Cryo-EM Structure of the T4 Tail Tube: Exploring the Lowest Dose Limit // *Structure*. 2017. Vol. 25. № 9. P. 1436-1441.
 21. Fokine A. et al. The molecular architecture of the bacteriophage T4 neck // *Journal of Molecular Biology*. 2013. Vol. 425. № 10. P. 1731–1744.
 22. Taylor N.M.I. et al. Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. // *Nature*. 2016. Vol. 533. № 7603. P. 346–352.
 23. Casjens S.R., Hendrix R.W. Locations and amounts of the major structural proteins in

- bacteriophage lambda // Journal of Molecular Biology. 1974. Vol. 88. № 2. P. 535-545.
24. Plisson C. et al. Structure of bacteriophage SPP1 tail reveals trigger for DNA ejection. // The EMBO journal. 2007. Vol. 26. № 15. P. 3720–3728.
 25. Bartual S.G. et al. Structure of the bacteriophage T4 long tail fiber receptor-binding tip. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010. Vol. 107. № 47. P. 20287–20292.
 26. Leiman P.G. et al. Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host // Cell. 2004. Vol. 118. № 4. P. 419–429.
 27. Leiman P.G. et al. Evolution of Bacteriophage Tails: Structure of T4 Gene Product 10 // Journal of Molecular Biology. 2006. Vol. 358. № 3. P. 912–921.
 28. Kanamaru S. et al. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. // Nature. 2002. Vol. 415. № 6871. P. 553–557.
 29. Shneider M.M. et al. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike // Nature. 2013. Vol. 500. № 7462. P. 350–353.
 30. Browning C. et al. Phage pierces the host cell membrane with the iron-loaded spike // Structure. 2012. Vol. 20. № 2. P. 326–339.
 31. Veasler D. et al. Structure of the phage TP901-1 1.8 MDa baseplate suggests an alternative host adhesion mechanism. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012. Vol. 109. № 23. P. 8954–8958.
 32. Sciara G. et al. Structure of lactococcal phage p2 baseplate and its mechanism of activation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010. Vol. 107. № 15. P. 6852–6857.
 33. Veasler D. et al. Structure of the phage TP901-1 1.8 MDa baseplate suggests an alternative host adhesion mechanism. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012. Vol. 109. № 23. P. 8954–8958.
 34. Veasler D. et al. Crystal structure of bacteriophage SPP1 distal tail protein (gp19.1): A

- baseplate hub paradigm in gram-positive infecting phages // *Journal of Biological Chemistry*. 2010. Vol. 285. № 47. P. 36666–36673.
35. Flayhan A. et al. Crystal structure of pb9, the distal tail protein of bacteriophage T5: a conserved structural motif among all siphophages. // *Journal of virology*. 2014. Vol. 88. № 2. P. 820–828.
 36. Zivanovic Y. et al. Insights into bacteriophage T5 structure from analysis of its morphogenesis genes and protein components. // *Journal of virology*. 2014. Vol. 88. № 2. P. 1162–1174.
 37. Goulet A. et al. The opening of the SPP1 bacteriophage tail, a prevalent mechanism in Gram-positive-infecting siphophages // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. Vol. 286. № 28. P. 25397–25405.
 38. Krylov V.N. et al. Structure of ϕ KZ bacteriophage particles // *Voprosy virusologii*. 1978. № 5. P. 568–571.
 39. Mesyanzhinov V.V. et al. The genome of bacteriophage ϕ KZ of *Pseudomonas aeruginosa*. // *Journal of molecular biology*. 2002. Vol. 317. № 1. P. 1–19.
 40. Krylov V. et al. *Pseudomonas* bacteriophage ϕ KZ contains an inner body in its capsid // *Canadian journal of microbiology*. 1984. Vol. 30. № 6. P. 758–762.
 41. Fokine A. et al. Cryo-EM Study of the *Pseudomonas* Bacteriophage ϕ KZ // *Structure*. 2007. Vol. 15. № 9. P. 1099–1104.
 42. Yap M.L. et al. Role of bacteriophage T4 baseplate in regulating assembly and infection. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016. Vol. 113. № 10. P. 2654–2659.
 43. Briers Y. et al. The structural peptidoglycan hydrolase gp181 of bacteriophage ϕ KZ // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008. Vol. 374. № 4. P. 747–751.
 44. Aksyuk A.A. et al. Structural conservation of the myoviridae phage tail sheath protein

- fold. // Structure. NIH Public Access, 2011. Vol. 19. № 12. P. 1885–1894.
45. Sycheva L. V. et al. Crystal structure and location of gp131 in the bacteriophage ϕ KZ virion // Virology. 2012. Vol. 434. № 2. P. 257–264.
 46. Fokine A. et al. Structure of the bacteriophage ϕ KZ lytic transglycosylase gp144 // Journal of Biological Chemistry. 2008. Vol. 283. № 11. P. 7242–7250.
 47. В.В. Месянжинов et al. Свойства эндолитической трансгликозилазы бактериофага ϕ KZ *Pseudomonas aeruginosa*, кодируемой геном 144 // Биохимия. 2006. Vol. 71. № 3. P 379-385
 48. Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. // Bacteriological reviews. American Society for Microbiology (ASM), 1972. Vol. 36. № 4. P. 407–477.
 49. Briers Y. et al. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages ϕ KZ and EL // Molecular Microbiology. 2007. Vol. 65. № 5. P. 1334–1344.
 50. Paradis-Bleau C. et al. Peptidoglycan lytic activity of the *Pseudomonas aeruginosa* phage ϕ KZ gp144 lytic transglycosylase // FEMS Microbiology Letters. 2007. Vol. 266. № 2. P. 201–209.
 51. Briers Y. et al. A standardized approach for accurate quantification of murein hydrolase activity in high-throughput assays. // Journal of biochemical and biophysical methods. 2007. Vol. 70. № 3. P. 531–533.
 52. Dideberg O. et al. Structure of a Zn^{2+} -containing D-alanyl-D-alanine-cleaving carboxypeptidase at 2.5 Å resolution. // Nature. 1982. Vol. 299. № 5882. P. 469–470.
 53. Koraimann G. Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria // Cellular and Molecular Life Sciences. 2003. Vol. 60. № 11. P. 2371–2388.
 54. Navarre W.W., Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and

- mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. // Microbiology and molecular biology reviews. 1999. Vol. 63. № 1. P. 174–229.
55. Beveridge T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles // Journal of Bacteriology. 1999. Vol. 181. № 16. P. 4725–4733.
56. Clark J.R., March J.B. Bacterial viruses as human vaccines? // Expert review of vaccines. 2004. Vol. 3. P. 463–476.
57. Мирошников К.А., et al. Пептидогликанлизирующие ферменты бактериофагов - перспективные противобактериальные агенты // Успехи биологической химии. 2006. Vol. 46. P. 65–98.
58. Wang I.-N. et al. The Protein Clocks of Bacteriophage Infections // Annual Review of Microbiology. 2000. Vol. 54. № 1. P. 799–825.
59. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Nomenclature Committee, Webb E.C. (Edwin C., International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme nomenclature 1992 : recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. P. 862.
60. Henrissat B., Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. // The Biochemical journal. 1996. Vol. 316 Pt 2. P. 695–696.
61. Weaver L.H. et al. Comparison of goose-type, chicken-type, and phage-type lysozymes illustrates the changes that occur in both amino acid sequence and three-dimensional structure during evolution // Journal of Molecular Evolution. 1985. Vol. 21. № 2. P. 97–111.
62. Fastrez J. Phage lysozymes. // Exs. 1996. Vol. 75. P. 35–64.
63. Remington S.J. et al. Structure of the lysozyme from bacteriophage T4: An electron density map at 2.4 Å resolution // Journal of Molecular Biology. 1978. Vol. 118. № 1. P. 81–98.

64. Cheng X. et al. The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994. Vol. 91. № 9. P. 4034–4038.
65. Evrard C., Fastrez J., Declercq J.-P. Crystal structure of the lysozyme from bacteriophage lambda and its relationship with V and C-type lysozymes // *Journal of Molecular Biology*. 1998. Vol. 276. № 1. P. 151–164.
66. Hermoso J.A. et al. Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1 // *Structure*. 2003. Vol. 11. № 10. P. 1239–1249.
67. Xu M. et al. Disulfide Isomerization After Membrane Release of Its SAR Domain Activates P1 Lysozyme // *Science*. 2005. Vol. 307. № 5706. P. 113–117.
68. Low L.Y. et al. Structure and lytic activity of a *Bacillus anthracis* prophage endolysin // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. Vol. 280. № 42. P. 35433–35439.
69. Korndörfer I.P. et al. The Crystal Structure of the Bacteriophage PSA Endolysin Reveals a Unique Fold Responsible for Specific Recognition of *Listeria* Cell Walls // *Journal of Molecular Biology*. 2006. Vol. 364. № 4. P. 678–689.
70. Mooers B.H.M., Matthews B.W. Extension to 2268 atoms of direct methods in the ab initio determination of the unknown structure of bacteriophage P22 lysozyme. // *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. 2006. Vol. 62. № Pt 2. P. 165–176.
71. Porter C.J. et al. The 1.6 Å Crystal Structure of the Catalytic Domain of PlyB, a Bacteriophage Lysin Active Against *Bacillus anthracis* // *Journal of Molecular Biology*. 2007. Vol. 366. № 2. P. 540–550.
72. Korndörfer I.P. et al. Structural analysis of the L-alanoyl-D-glutamate endopeptidase domain of *Listeria* bacteriophage endolysin Ply500 reveals a new member of the LAS peptidase family. // *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. 2008. Vol. 64. № Pt 6. P. 644–650.

73. Sun Q. et al. Regulation of a muralytic enzyme by dynamic membrane topology. // *Nature structural & molecular biology*. 2009. Vol. 16. № 11. P. 1192–1194.
74. McGowan S. et al. X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. Vol. 109. № 31. P. 12752–12757.
75. Sanz-Gaitero M. et al. Crystal structure of the lytic CHAP(K) domain of the endolysin LysK from *Staphylococcus aureus* bacteriophage K. // *Virology journal*. 2014. Vol. 11. P. 133.
76. Park Y. et al. Structure of bacteriophage SPN1S endolysin reveals an unusual two-module fold for the peptidoglycan lytic and binding activity. // *Molecular microbiology*. 2014. Vol. 92. № 2. P. 316–325.
77. Tamai E. et al. X-ray structure of a novel endolysin encoded by episomal phage ϕ SM101 of *Clostridium perfringens*. // *Molecular microbiology*. 2014. Vol. 92. № 2. P. 326–337.
78. Dunne M. et al. Crystal Structure of the CTP1L Endolysin Reveals How Its Activity Is Regulated by a Secondary Translation Product. // *The Journal of biological chemistry*. 2016. Vol. 291. № 10. P. 4882–4893.
79. Leung A.K.W. et al. Crystal structure of the lytic transglycosylase from bacteriophage lambda in complex with hexa-N-acetylchitohexaose // *Biochemistry*. 2001. Vol. 40. № 19. P. 5665–5673.
80. Pérez-Dorado I. et al. Elucidation of the molecular recognition of bacterial cell wall by modular pneumococcal phage endolysin CPL-1. // *The Journal of biological chemistry*. 2007. Vol. 282. № 34. P. 24990–24999.
81. Loeffler J.M., Nelson D., Fischetti V.A. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase // *Science*. 2001. Vol. 294. P. 2170–2172.
82. Zimmer M. et al. The murein hydrolase of the bacteriophage ϕ 3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains // *Applied and Environmental*

- Microbiology. 2002. Vol. 68. № 11. P. 5311–5317.
83. Schuch R., Nelson D., Fischetti V. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis* // *Nature*. 2002. Vol. 418. P. 884–889.
 84. Loessner M.J. et al. Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli // *Journal of Bacteriology*. 1997. Vol. 179. № 9. P. 2845–2851.
 85. Tsugita A., Inouye M. Purification of bacteriophage T4 lysozyme. // *The Journal of Biological Chemistry*. 1968. Vol. 243. № 2. P. 391–397.
 86. Koteswara G.R., And R., Burma D.P. Purification and Properties of Phage P224 Induced Lysozyme // *Journal of biological chemistry*. 1971. Vol. 246. № 21. P. 6474–6479.
 87. Bieńkowska-Szewczyk K., Taylor A. Murein transglycosylase from phage lambda lysate. Purification and properties. // *Biochimica et biophysica acta*. 1980. Vol. 615. № 2. P. 489–496.
 88. Caldentey J., Hänninen A.L., Bamford D.H. Gene XV of bacteriophage PRD1 encodes a lytic enzyme with muramidase activity. // *European journal of biochemistry FEBS*. 1994. Vol. 225. № 1. P. 341–346.
 89. García E. et al. Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988. Vol. 85. № 3. P. 914–918.
 90. Sheehan M.M. et al. Analysis of the catalytic domain of the lysin of the lactococcal bacteriophage Tuc2009 by chimeric gene assembling. // *FEMS microbiology letters*. 1996. Vol. 140. № 1. P. 23–28.
 91. Sáiz J.L. et al. Characterization of Ejl, the cell-wall amidase coded by the pneumococcal bacteriophage Ej-1. // *Protein science : a publication of the Protein Society*. Wiley-Blackwell. 2002. Vol. 11. № 7. P. 1788–1799.
 92. Varea J. et al. Structural and thermodynamic characterization of Pal, a phage natural

- chimeric lysin active against pneumococci. // The Journal of biological chemistry. 2004. Vol. 279. № 42. P. 43697–43707.
93. Loessner M.J. et al. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates // Molecular Microbiology. 2002. Vol. 44. № 2. P. 335–349.
 94. Khosla C., Harbury P.B. Modular enzymes. // Nature. 2001. Vol. 409. № 6817. P. 247–252.
 95. Korndörfer I.P. et al. The crystal structure of the bacteriophage PSA endolysin reveals a unique fold responsible for specific recognition of *Listeria* cell walls. // Journal of molecular biology. 2006. Vol. 364. № 4. P. 678–689.
 96. Vasala A. et al. Genetic and biochemical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophage LL-H lysin // Applied and Environmental Microbiology. 1995. Vol. 61. № 11. P. 4004–4011.
 97. Loessner M.J. et al. The two-component lysis system of *Staphylococcus aureus* bacteriophage Twort: A large TTG-start holin and an associated amidase endolysin // FEMS Microbiology Letters. 1998. Vol. 162. № 2. P. 265–274.
 98. Loessner M.J., Gaeng S., Scherer S. Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187 // Journal of Bacteriology. 1999. Vol. 181. № 15. P. 4452–4460.
 99. Gaeng S. et al. Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. // Applied and environmental microbiology. 2000. Vol. 66. № 7. P. 2951–2958.
 100. Morita M. et al. Functional analysis of antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin against Gram-negative bacteria. // FEBS letters. 2001. Vol. 500. № 1–2. P. 56–59.
 101. Díaz E., López R., García J.L. Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular

- evolution of genes. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1990. Vol. 87. № 20. P. 8125–8129.
102. Hambly E., Suttle C.A. The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities // Current Opinion in Microbiology. 2005. Vol. 8. № 4. P. 444–450.
 103. Diaz E., López R., Garcia J.L. Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits // Journal of Biological Chemistry. 1991. Vol. 266. № 9. P. 5464–5471.
 104. Croux C. et al. Interchange of functional domains switches enzyme specificity: construction of a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. // Molecular microbiology. 1993. Vol. 9. № 5. P. 1019–1025.
 105. Sheehan M.M. et al. The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysin of intergeneric origin. // Molecular microbiology. 1997. Vol. 25. № 4. P. 717–725.
 106. Wren B.W. A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeat sequences. // Molecular microbiology. 1991. Vol. 5. № 4. P. 797–803.
 107. López R. et al. The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins? // Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.). 1997. Vol. 3. № 2. P. 199–211.
 108. Lucchini S., Desiere F., Brüßow H. The structural gene module in Streptococcus thermophilus bacteriophage ϕ Sfi11 shows a hierarchy of relatedness to Siphoviridae from a wide range of bacterial hosts. // Virology. 1998. Vol. 246. № 1. P. 63–73.
 109. Sheehan M.M. et al. Identification and characterization of a lysis module present in a large proportion of bacteriophages infecting Streptococcus thermophilus. // Applied and environmental microbiology. 1999. Vol. 65. № 2. P. 569–577.
 110. Navarre W.W. et al. Anchor structure of staphylococcal surface proteins: II. COOH-terminal structure of muramidase and amidase-solubilized surface protein // Journal of

- Biological Chemistry. 1998. Vol. 273. № 44. P. 29135–29142.
111. Krause R.M. Studies on bacteriophages of hemolytic streptococci. I. Factors influencing the interaction of phage and susceptible host cell. // The Journal of experimental medicine. 1957. Vol. 106. № 3. P. 365–384.
 112. Nelson D., Loomis L., Fischetti V. a. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001. Vol. 98. № 7. P. 4107–4112.
 113. Cheng Q. et al. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005. Vol. 49. № 1. P. 111–117.
 114. Rashel M. et al. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage ϕ MR11. // The Journal of infectious diseases. 2007. Vol. 196. № 8. P. 1237–1247.
 115. Loeffler J.M., Djurkovic S., Fischetti V.A. Phage Lytic Enzyme Cpl-1 as a Novel Antimicrobial for Pneumococcal Bacteremia // Infection and Immunity. 2003. Vol. 71. № 11. P. 6199–6204.
 116. Loeffler J.M., Fischetti V.A. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003. Vol. 47. № 1. P. 375–377.
 117. Jado I. et al. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003. Vol. 52. № 6. P. 967–973.
 118. Djurkovic S., Loeffler J.M., Fischetti V.A. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. // Antimicrobial agents and chemotherapy.

2005. Vol. 49. № 3. P. 1225–1228.
119. Entenza J.M. et al. Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. Vol. 49. № 11. P. 4789–4792.
120. Cheng Q., Fischetti V.A. Mutagenesis of a bacteriophage lytic enzyme PlyGBS significantly increases its antibacterial activity against group B streptococci // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007. Vol. 74. № 6. P. 1284–1291.
121. Legotsky S.A. et al. Peptidoglycan degrading activity of the broad-range *Salmonella* bacteriophage S-394 recombinant endolysin // *Biochimie*. 2014. Vol. 107. № PB. P. 293–299.
122. Briers Y., Lavigne R. Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. // *Future microbiology*. 2015. Vol. 10. № 3. P. 377–390.
123. Yang H., Yu J., Wei H. Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. // *Frontiers in microbiology*. 2014. Vol. 5. P. 542.
124. Inal J.M. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. // *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2003. Vol. 51. P. 237–244.
125. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G. Bacteriophage therapy. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001. Vol. 45. № 3. P. 649–659.
126. Kutter E. Phage therapy: bacteriophages as antibiotics. Evergreen State College, Olympia, 1997.
127. Nelson D., Loomis L., Fischetti V.A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001. Vol. 98. № 7. P. 4107–4112.
128. Fischetti V.A. Using phage Lytic Enzymes to Control Pathogenic Bacteria // *BMC Oral*

- Health. 2006. Vol. 6. № Suppl 1. P. S16.
129. Stone R. Stalin's Forgotten Cure // Science. 2002. Vol. 298. № October. P. 63–66.
 130. Thiel K. Old dogma, new tricks--21st Century phage therapy. // Nature biotechnology. 2004. Vol. 22. № 1. P. 31–36.
 131. Davis B.M., Waldor M.K. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae* // Current Opinion in Microbiology. 2003. Vol. 6. № 1. P. 35–42.
 132. Merrill C.R. et al. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996. Vol. 93. № 8. P. 3188–3192.
 133. Kim K.P. et al. PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immune response // Microbial Biotechnology. 2008. Vol. 1. № 3. P. 247–257.
 134. Liu J. et al. Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. // Nature biotechnology. 2004. Vol. 22. № 2. P. 185–191.
 135. Projan S. Phage-inspired antibiotics? // Nature biotechnology. 2004. Vol. 22. № 2. P. 167–168.
 136. Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Górski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents // Exp.Biol.Med.(Maywood.). 2006. Vol. 231. № 1535–3702. P. 366–377.
 137. Fischetti V.A. Bacteriophage lytic enzymes: Novel anti-infectives // Trends in Microbiology. 2005. Vol. 13. № 10. P. 491–496.
 138. Rashel M. et al. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage ϕ MR11. // The Journal of infectious diseases. 2007. Vol. 196. № 8. P. 1237–1247.
 139. Fischetti V.A. Using phage Lytic Enzymes to Control Pathogenic Bacteria // BMC Oral Health. 2006. Vol. 6. № Suppl 1. P. S16.

140. Studier F.W., Moffatt B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // *Journal of Molecular Biology*. 1986. Vol. 189. № 1. P. 113–130.
141. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press // New York. 1989. P. 931–957
142. Moody M.F. Application of optical diffraction to helical structures in the bacteriophage tail. // *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 1971. Vol. 261. № 837. P. 181–195.
143. Stratagene. QuikChange ® Site-Directed Mutagenesis Kit // QuikChange ® Site-Directed Mutagenesis Kit. 2007. Vol. 200518.
144. Qiagen. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins // *The QIAexpressionist*. 2003. № June. P. 128.
145. Studier F.W. et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. // *Methods in enzymology*. 1990. Vol. 185. P. 60–89.
146. Cleveland D.W. et al. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. // *The Journal of biological chemistry*. 1977. Vol. 252. № 3. P. 1102–1106.
147. Provencher S.W., Glöckner J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. // *Biochemistry*. 1981. Vol. 20. № 1. P. 33–37.
148. Venyaminov S.Y. et al. Circular dichroic analysis of denatured proteins: inclusion of denatured proteins in the reference set. // *Analytical biochemistry*. 1993. Vol. 214. P. 17–24.
149. Sreerama N., Woody R.W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism // *Anal Biochem*. 1993. Vol. 209. № 1. P. 32–44.
150. Lavigne R. et al. Identification and characterization of a highly thermostable bacteriophage lysozyme // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004. Vol. 61. № 21. P.

2753–2759.

151. Hanwell M.D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform // *Journal of Cheminformatics*. 2012. Vol. 4. № 8.
152. Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS // *Nucleic Acids Research*. 2011. Vol. 39, № SUPPL. 2.
153. Fokine A. et al. Structure of the bacteriophage ϕ KZ lytic transglycosylase gp144. // *The Journal of biological chemistry*. 2008. Vol. 283. № 11. P. 7242–7250.
154. Dolinsky T.J. et al. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations // *Nucleic Acids Research*. 2004. Vol. 32. web server iss.
155. Dolinsky T.J. et al. PDB2PQR: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations // *Nucleic Acids Research*. 2007. Vol. 35. № SUPPL.2.
156. Baker N.A. et al. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001. Vol. 98. № 18. P. 10037–10041.
157. Eric J. Sorin V.S.P. Exploring the Helix-Coil Transition via All-Atom Equilibrium Ensemble Simulations // *Biophysical Journal*. The Biophysical Society, 2005. Vol. 88. № 4. P. 2472.
158. DePaul A.J. et al. Equilibrium conformational dynamics in an RNA tetraloop from massively parallel molecular dynamics. // *Nucleic acids research*. 2010. Vol. 38. № 14. P. 4856–4867.
159. Berendsen H.J.C., van der Spoel D., van Drunen R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation // *Computer Physics Communications*. North-Holland, 1995. Vol. 91. № 1–3. P. 43–56.
160. Lindahl E., Hess B., Spoel D. van der. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis // *Molecular modeling annual*. Springer-Verlag. Vol. 7.

№ 8. P. 306–317.

161. Van Der Spoel D. et al. GROMACS: fast, flexible, and free. // Journal of computational chemistry. 2005. Vol. 26. № 16. P. 1701–1718.
162. Hess B. et al. GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation // Journal of Chemical Theory and Computation. 2008. Vol. 4. № 3. P. 435–447.
163. Lecoutere E. et al. Identification and comparative analysis of the structural proteomes of ϕ KZ and EL, two giant *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. // Proteomics. 2009. Vol. 9. № 11. P. 3215–3219.
164. Hertveldt K. et al. Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages // Journal of Molecular Biology. 2005. Vol. 354. № 3. P. 536–545.
165. Hildebrand A. et al. Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred. // Proteins. 2009. Vol. 77 Suppl 9. P. 128–132.
166. Eswar N. et al. Tools for comparative protein structure modeling and analysis. // Nucleic acids research. 2003. Vol. 31. № 13. P. 3375–3380.
167. Nekrasov A.N. Analysis of the information structure of protein sequences: a new method for analyzing the domain organization of proteins. // Journal of biomolecular structure & dynamics. 2004. Vol. 21. № 5. P. 615–624.
168. Tang L. et al. Three-dimensional structure of the bacteriophage P22 tail machine. // The EMBO journal. 2005. Vol. 24. № 12. P. 2087–2095.
169. Chertkov O. V et al. The properties of the *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage ϕ PMG1. // Bioorganicheskaya khimiya. Vol. 37. № 6. P. 807–814.
170. Thomas J.A. et al. Extensive proteolysis of head and inner body proteins by a morphogenetic protease in the giant *Pseudomonas aeruginosa* phage ϕ KZ. // Molecular microbiology. 2012. Vol. 84. № 2. P. 324–339.
171. Blackburn N.T., Clarke A.J. Identification of four families of peptidoglycan lytic

- transglycosylases. // *Journal of molecular evolution*. 2001. Vol. 52. № 1. P. 78–84.
172. Scheurwater E., Reid C.W., Clarke A.J. Lytic transglycosylases: Bacterial space-making autolysins // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008. Vol. 40. № 4. P. 586–591.
173. Thunnissen A.M. et al. Structure of the 70-kDa soluble lytic transglycosylase complexed with bulgecin A. Implications for the enzymatic mechanism // *Biochemistry*. 1995. Vol. 34. № 39. P. 12729–12737.
174. van Asselt E.J., Thunnissen A.-M.W.H., Dijkstra B.W. High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt70 and its complex with a peptidoglycan fragment. // *Journal of molecular biology*. 1999. Vol. 291. № 4. P. 877–898.
175. BLAKE C.C. et al. Structure of lysozyme. A Fourier map of the electron density at 6 angstrom resolution obtained by x-ray diffraction. // *Nature*. 1962. Vol. 196. P. 1173–1176.
176. Sorin E.J. et al. Exploring the helix-coil transition via all-atom equilibrium ensemble simulations. // *Biophysical journal*. Elsevier, 2005. Vol. 88. № 4. P. 2472–2493.
177. Hess B. et al. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. // *Journal of chemical theory and computation*. 2008. Vol. 4. № 3. P. 435–447.
178. Walmagh M. et al. Characterization of modular bacteriophage endolysins from Myoviridae phages OBP, 201φ2-1 and PVP-SE1. // *PloS one*. 2012. Vol. 7. № 5. P. e36991.
179. Claverie J.-M., Ogata H. Ten good reasons not to exclude giruses from the evolutionary picture. // *Nature reviews. Microbiology*. 2009. Vol. 7. № 8. P. 615-618.
180. Loessner M.J. Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. // *Current opinion in microbiology*. 2005. Vol. 8. № 4. P. 480–487.
181. Höltje J. V. Lytic transglycosylases. // *EXS*. 1996. Vol. 75. P. 425–429.

182. Van Asselt E.J. et al. Crystal structure of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 reveals a lysozyme-like catalytic domain with an EF-hand // *Structure*. 1999. Vol. 7. № 10. P. 1167–1180.
183. Thunnissen A.M.W.H., Isaacs N.W., Dijkstra B.W. The catalytic domain of a bacterial lytic transglycosylase defines a novel class of lysozymes // *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 1995. Vol. 22. № 3. P. 245–258.

Приложение 1.

Нуклеотидные последовательности праймеров

E115A Fw 5'-CATTTGCTTCTATT**GC**ATCAGCATTTCGATTAC-3',

E115A Re 5'-GTAATCGAATGCTAGT**GC**AATAGAAGCAAATG-3',

H200L Fw 5'-GATCTTTAGCT**CTCT**CTTTGGGCCTGG-3',

H200L Re 5'-CCAGGCCCAAAGA**AGAG**AGCTAAATAAAGATC-3',

Y197F Fw 5'-ACTGATACTGATCTTT**TTTT**TAGCTCACTTCTTT-3',

Y197F Re 5'-AAAGAAGTGAGCTAA**AAAA**AAGATCAGTATCAGT-3'.

E178A Fw 5'-GCGGAAGTGAATTA**AGC**AAACATGAACATTCTG-3',

E178A Re 5'- CAGAATGTTTCATGTT**TGCT**TAATCAGTTCCGC-3',