

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

**Шестак Никита Викторович**

**Изучение каталитической и бактериолитической активности  
рекомбинантного белка лизостафина из *Staphylococcus simulans***

1.1.10 – Биомеханика и биоинженерия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д. б. н., проф. Карягина-Жулина Анна Станиславовна

Москва, 2024

## Оглавление

Список сокращений и условных обозначений .....	6
1 Введение .....	8
1.1 Актуальность проблемы и степень разработанности темы.....	8
1.2 Цели и задачи .....	10
1.3 Объект и предмет исследования .....	11
1.4 Научная новизна .....	11
1.5 Теоретическая и практическая значимость.....	12
1.6 Методология и теоретические основы исследования.....	13
1.7 Положения, выносимые на защиту.....	13
1.8 Степень достоверности данных .....	14
1.9 Личный вклад автора.....	14
1.10 Публикации по теме диссертации.....	15
1.11 Апробация работы .....	16
1.12 Объем и структура диссертации .....	16
2 Литературный обзор.....	17
2.1 Антибиотикоустойчивые штаммы <i>S. aureus</i> .....	17
2.2 Строение бактериального пептидогликана.....	18
2.3 Антибактериальные лизины .....	20
2.3.1 Общая характеристика .....	20
2.3.2 Структура антибактериальных лизинов.....	21
2.3.3 Синтетические антибактериальные лизины .....	25
2.4 Лизостафин из <i>S. simulans</i> .....	27
2.4.1 Общая характеристика, строение и механизм действия лизостафина .....	27
2.4.2 Методы исследования активности лизостафина .....	31
2.4.3 Влияние каталитического иона металла на активность лизостафина и других представителей семейства лизинов M23.....	35
2.4.4 Выделение и очистка лизостафина .....	37
3 Материалы и методы.....	41
3.1. Материалы и оборудование.....	41
3.2 Методы .....	43
3.2.1 Нарботка биомассы для выделения рекомбинантных белков.....	43
3.2.2 Выделение рекомбинантного лизостафина без 6xHis-tag при помощи катионообменной хроматографии.....	44

3.2.3	Разрушение биомассы штамма-продуцента рекомбинантного лизоцима с 6xHis-tag и его осаждение при помощи сульфата аммония.....	44
3.2.4	Хроматографическая очистка рекомбинантного лизоцима с 6xHis-tag с использованием катионообменного сорбента.....	45
3.2.5	Хроматографическая очистка рекомбинантного лизоцима с 6xHis-tag с использованием металл-хелатных аффинных сорбентов .....	45
3.2.6	Электрофорез в полиакриламидном геле.....	46
3.2.7	Определение концентрации лизоцима .....	46
3.2.8	Разработка метода определения каталитической активности лизоцима.....	46
3.2.9	Использование разработанного метода определения каталитической активности для лизоцима с заведомо низкой каталитической активностью .....	47
3.2.10	Исследование реакции гидролиза пентаглицина лизоцимом при помощи тонкослойной хроматографии.....	48
3.2.11	Построение калибровочной кривой для пересчета оптической плотности окрашенной нингидрином реакционной смеси в количество нерасщепленного пентаглицина и численная оценка каталитической активности лизоцима.....	48
3.2.12	Сравнение каталитической активности лизоцима по отношению к пентаглицину, находящемуся в составе клеточной стенки бактерии, и к свободному пентаглицину.....	50
3.2.13	Получение вариантов лизоцима с ионами различных металлов в активном центре фермента.....	51
3.2.14	Определение каталитической активности вариантов лизоцима с ионами различных металлов в активном центре фермента.....	52
3.2.15	Выделение пептидогликановых оболочек .....	52
3.2.16	Подготовка к эксперименту суспензии пептидогликановых оболочек .....	53
3.2.17	Определение пептидогликанолитической активности вариантов лизоцима Lst-Zn или Lst (EDTA) с использованием пептидогликановых оболочек.....	53
3.2.18	Обработка пептидогликановых оболочек для удаления ионов металлов.....	54
3.2.19	Обработка бычьего сывороточного альбумина для удаления ионов металлов.....	54
3.2.20	Адаптация метода определения пептидогликанолитической активности для вариантов лизоцима с ионами различных металлов в активном центре фермента .....	54
3.2.21	Исследование и численная оценка пептидогликанолитической активности вариантов лизоцима с ионами различных металлов в активном центре фермента .....	55
3.2.22	Исследование и численная оценка пептидогликанолитической активности вариантов лизоцима с ионами различных металлов в активном центре фермента в	

присутствии соответствующих ионов металлов .....	56
3.2.23 Исследование и численная оценка бактериолитической активности рекомбинантного лизоафрина с ионами различных металлов в активном центре фермента.....	57
3.2.24 Исследование и численная оценка бактериолитической активности вариантов лизоафрина Lst-Co и Lst-Mn в присутствии соответствующих ионов металлов .....	58
3.2.25 Исследование и численная оценка каталитической и бактериолитической активности препаратов рекомбинантного лизоафрина с 6xHis-tag, выделенных с использованием различных хроматографических сорбентов.....	59
3.2.26 Восстановление активности рекомбинантного лизоафрина.....	59
3.2.27 Статистический анализ .....	60
4 Результаты и их обсуждение .....	61
4.1 Разработка метода определения каталитической активности лизоафрина с использованием пентаглицина.....	61
4.1.1 Получение рекомбинантного белка лизоафрина из <i>S. simulans</i> .....	61
4.1.2 Разработка метода определения каталитической активности лизоафрина с использованием пентаглицина в качестве субстрата и хромогенной реакции с нингидрином ....	62
4.1.3 Применимость разработанного метода определения каталитической активности лизоафрина с использованием пентаглицина в качестве субстрата и хромогенной реакции с нингидрином.....	64
4.1.4 Численная оценка параметров реакции гидролиза пентаглицина лизоафрином ..	68
4.1.5 Сравнение каталитической активности лизоафрина по отношению к пентаглицину, находящемуся в составе клеточной стенки бактерии, и к свободному пентаглицину.....	71
4.2 Исследование соотношения между каталитической, пептидогликанолизической и бактериолитической активностью вариантов рекомбинантного лизоафрина с различным уровнем каталитической активности .....	75
4.2.1 Получение вариантов рекомбинантного лизоафрина с ионами различных металлов в активном центре белка .....	76
4.2.2 Исследование каталитической активности вариантов рекомбинантного лизоафрина с ионами различных металлов в активном центре белка с использованием пентаглицина в качестве субстрата .....	77
4.2.3 Получение пептидогликановых оболочек <i>S. aureus</i> для исследования с их использованием пептидогликанолизической активности вариантов рекомбинантного лизоафрина с ионами различных металлов в активном центре белка .....	79
4.2.4 Адаптация метода исследования пептидогликанолизической активности	

вариантов рекомбинантного лизоцимина с ионами различных металлов в активном центре белка.....	81
4.2.5 Исследование пептидогликанолитической активности вариантов рекомбинантного лизоцимина с ионами различных металлов в активном центре белка.....	83
4.2.6 Исследование соотношения между уровнями каталитической и пептидогликанолитической активностей вариантов рекомбинантного лизоцимина с ионами различных металлов в активном центре белка.....	95
4.2.7 Исследование бактериолитической активности вариантов рекомбинантного лизоцимина с ионами различных металлов с использованием интактных клеток <i>S. aureus</i> .....	96
4.2.8 Исследование соотношения между уровнями каталитической и бактериолитической активностей вариантов рекомбинантного лизоцимина с ионами различных металлов в активном центре белка.....	102
4.3 Исследование влияния хроматографического сорбента на активность рекомбинантного лизоцимина.....	105
4.3.1 Выбор хроматографических сорбентов.....	105
4.3.2 Получение препаратов рекомбинантного лизоцимина с 6xHis-tag с использованием различных хроматографических сорбентов.....	106
4.3.3 Исследование каталитической и бактериолитической активности препаратов рекомбинантного лизоцимина, выделенных с использованием различных хроматографических сорбентов.....	107
4.3.4 Восстановление активности препаратов лизоцимина, выделенных с использованием различных хроматографических сорбентов и исследование их каталитической и бактериолитической активности.....	110
4.3.5 Получение препарата рекомбинантного лизоцимина с 6xHis-tag с использованием цинк-хелатного хроматографического сорбента и исследование его каталитической и бактериолитической активности.....	112
5 Заключение.....	116
Основные результаты и выводы.....	119
Список литературы.....	120

## Список сокращений и условных обозначений

- а.о. – аминокислотный остаток;
- ТСХ – тонкослойная хроматография;
- ПААГ – полиакриламидный гель;
- Трис-НСl – трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид;
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;
- 6xHis-tag – гексагистидиновая метка
- 8-HQ – 8-гидроксихинолин;
- BSA – бычий сывороточный альбумин;
- BSA-E – бычий сывороточный альбумин, обработанный ЭДТА;
- CBD – домен, связывающийся с клеточной стенкой;
- CM-Asp – карбоксиметиласпартат;
- Dpm – мезо-2,6-диаминопимелиновая кислота;
- FRET – резонансный перенос энергии Фёрстера;
- HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота;
- IDA – иминодиуксусная кислота;
- Lst (EDTA) – рекомбинантный лизостафин, обработанный ЭДТА;
- Lst-Ca – рекомбинантный лизостафин с ионами  $Ca^{2+}$  в активном центре фермента;
- Lst-Cex – рекомбинантный лизостафин с С-концевой 6xHis-tag, выделенный при помощи катионообменного сорбента;
- Lst-Cex-R – рекомбинантный лизостафин с С-концевой 6xHis-tag, выделенный при помощи катионообменного сорбента, с восстановленной активностью;
- Lst-Co – рекомбинантный лизостафин с ионами  $Co^{2+}$  в активном центре фермента;
- Lst-Cu – рекомбинантный лизостафин с ионами  $Cu^{2+}$  в активном центре фермента;
- Lst-IDA – рекомбинантный лизостафин с С-концевой 6xHis-tag, выделенный при помощи никель-хелатного аффинного сорбента WorkBeads 40 Ni-IDA;
- Lst-IDA-R – рекомбинантный лизостафин с С-концевой 6xHis-tag, выделенный при помощи никель-хелатного аффинного сорбента WorkBeads 40 Ni-IDA, с восстановленной активностью;
- Lst-Mg – рекомбинантный лизостафин с ионами  $Mg^{2+}$  в активном центре фермента;
- Lst-Mn – рекомбинантный лизостафин с ионами  $Mn^{2+}$  в активном центре фермента;
- Lst-Ni – рекомбинантный лизостафин с ионами  $Ni^{2+}$  в активном центре фермента;
- Lst-NiMAC – рекомбинантный лизостафин с С-концевой 6xHis-tag, выделенный при помощи никель-хелатного аффинного сорбента WorkBeads NiMAC;

Lst-NiMAC-R – рекомбинантный лизоцим с С-концевой 6xHis-tag, выделенный при помощи никель-хелатного аффинного сорбента WorkBeads NiMAC, с восстановленной активностью;

Lst-NTA – рекомбинантный лизоцим с С-концевой 6xHis-tag, выделенный при помощи никель-хелатного аффинного сорбента WorkBeads 40 Ni-NTA;

Lst-NTA-R – рекомбинантный лизоцим с С-концевой 6xHis-tag, выделенный при помощи никель-хелатного аффинного сорбента WorkBeads 40 Ni-NTA, с восстановленной активностью;

Lst-Zn – рекомбинантный лизоцим с ионами  $Zn^{2+}$  в активном центре фермента;

NTA – нитрилотриуксусная кислота;

MRSA – метициллин-устойчивый золотистый стафилококк;

MSSA – метициллин-чувствительный золотистый стафилококк;

PG – пептидогликановые оболочки;

PGE – пептидогликановые оболочки, обработанные ЭДТА;

PMSF - фенилметилсульфонил фторид;

OPS – *O*-фосфосерин;

SDS – додецилсульфат натрия;

TED – трис(карбоксиметил)этилендиамин;

TEPA – тетраметилпентамин;

VRSA – ванкомицин-устойчивый золотистый стафилококк.

# 1 Введение

## 1.1 Актуальность проблемы и степень разработанности темы

*Staphylococcus aureus* является одним из основных госпитальных патогенов и способен вызывать широкий спектр различных заболеваний, таких как кожные и раневые инфекции, острый токсический шок, менингит, эндокардит и сепсис [1,2]. Также *S. aureus* является основным возбудителем остеомиелита – заболевания, связанного с тяжелым поражением костей [2,3]. По статистике от 25 до 30% населения постоянно колонизированы штаммами *S. aureus* и около 60% – временно колонизированы этим патогеном [1,4–6]. При этом повсеместно распространены его различные антибиотикоустойчивые штаммы, в частности метициллин-устойчивый золотистый стафилококк (MRSA).

Мировым стандартом лечения различных заболеваний, вызванных патогенными бактериями, является использование антибиотиков. Их введение в клиническую практику в начале 1940-х годов способствовало резкому улучшению динамики выздоровления пациентов с бактериальными инфекциями, например, вызванными *S. aureus* [7,8]. Однако вместе с этим у патогенных бактерий стала развиваться устойчивость к используемым антибиотикам [7–9], причём не только к конкретным соединениям, но также к целым классам антибиотиков, например, к антибиотикам пенициллинового ряда вследствие использования бактериями  $\beta$ -лактамазы [2,7,10]. Исследование механизмов, обеспечивающих антибиотикорезистентность бактерий, позволило разработать новые полусинтетические антибиотики, способные преодолеть подобные механизмы. Ярким примером является создание метициллина –  $\beta$ -лактаминового антибиотика, устойчивого к действию  $\beta$ -лактамазы [2,7]. В свою очередь это привело к дальнейшему развитию и усилению антибиотикоустойчивости патогенных бактерий, в частности, к появлению штаммов метициллин-устойчивого золотистого стафилококка (MRSA), устойчивых к большинству применяемых на сегодняшний день в клинической практике антибиотиков [7,8]. Циклы разработки новых антибиотиков и появления у бактерий устойчивости к ним повторяются из раза в раз [7,8,11], причём скорость разработки новых антибиотиков существенно ниже, чем скорость приобретения устойчивости к ним. В связи с этим в современном здравоохранении остро стоит глобальная проблема борьбы с антибиотикоустойчивыми штаммами патогенных бактерий, в том числе со штаммами MRSA.

Для решения данной проблемы в настоящее время актуальна задача по разработке новых терапевтических агентов для создания на их основе антибактериальных лекарственных

препаратов, способных бороться с антибиотикоустойчивыми штаммами бактерий, которые при этом не будут приводить к развитию лекарственной устойчивости. Одним из перспективных классов таких соединений являются антибактериальные лизины – ферменты, вызывающие осмотический лизис бактериальных клеток, в том числе клеток антибиотикоустойчивых штаммов, вследствие разрушения различных связей в пептидогликане клеточной стенки бактерии [12–14].

Лизостафин является одним из наиболее хорошо изученных антибактериальных лизинов. Впервые данный фермент был выделен ещё в 1964 году [15], и с тех пор было проведено множество исследований, показывающих его эффективность в отношении различных штаммов *S. aureus*, в том числе MRSA, как против планктонных клеток, так и против клеток в составе биопленок [12,16,25–30,17–24]. Лизостафин состоит из двух доменов, соединённых подвижным линкером. N-концевой каталитический домен принадлежит к семейству цинк-зависимых эндопептидаз M23 и специфично расщепляет поперечные пентаглициновые мостики между стволовыми пептидами (stem peptide) в структуре пептидогликана, в то время как C-концевой пептидогликан-связывающий домен, принадлежащий к семейству SH3b, отвечает за связывание белка с бактериальной клеточной стенкой [24,31]. Важную роль в каталитической активности лизостафина и его гомологов играет каталитический ион  $Zn^{2+}$ , удерживаемый в активном центре каталитического домена фермента [21,32–35]. В ряде исследований было показано, что замена иона  $Zn^{2+}$  на ионы других металлов существенно влияет на активность лизостафина, а также ряда других пептидаз семейства M23 [36–39]. Кроме того было показано, что активный центр этих ферментов способен связывать второй ион металла, что приводит к снижению их активности [36,37]. Для изучения активности лизостафина в большинстве исследований использовали различные турбидиметрические методы, основанные на просветлении клеточной суспензии *S. aureus* под действием белка [20,40]. Однако данные методы позволяют исследовать только кумулятивную (общую) активность лизостафина, существенный вклад в которую вносит не только его каталитический домен, непосредственно разрушающий связи в пептидогликане клеточной стенки бактерии, но и пептидогликан-связывающий домен, отвечающий за связывание с клеточной стенкой. Чтобы нивелировать влияние пептидогликан-связывающего домена на активность лизостафина и, соответственно, исследовать непосредственно каталитическую активность лизостафина в ряде работ в качестве субстрата для действия лизостафина вместо бактериальных клеток использовали различные варианты изолированных субстратов: от немодифицированных олигоглицинов до рекомбинантных химерных белков, в которые встраивали пентаглициновый сайт для расщепления лизостафином [19,20,36]. Однако, несмотря на проведённые исследования, соотношение каталитической и бактериолитической активностей лизостафина систематически до сих пор не изучено.

Подобные данные позволили бы разграничить влияние каталитического и пептидогликан-связывающего домена лизоцифина на его кумулятивную активность, что актуально для разработки эффективных антибактериальных лизинов с требуемыми свойствами для создания на их основе лекарственных препаратов против антибиотикоустойчивых штаммов бактерий, в частности MRSA.

Другой вопрос, связанный с активностью лизоцифина, относится к стратегии получения препаратов чистых рекомбинантных белков. Лизоцифин и его модифицированные варианты обычно очищают хроматографией при помощи катионообменных [15,21,41–44] или металл-хелатных сорбентов [19,21,45–52]. Однако при очистке цинк-зависимого лизоцифина при помощи металл-хелатных аффинных хроматографических сорбентов, вероятно, имеет место взаимодействие его активного центра с ионами металлов, адсорбированными на сорбенте, что может влиять на активность фермента. При этом для выделения вариантов лизоцифина доступны разнообразные варианты металл-хелатных хроматографических сорбентов с различными характеристиками, которые потенциально могут по-разному влиять на активность очищенного фермента. Несмотря на это ранее не проводилось систематического исследования влияния стратегии очистки лизоцифина на его активность.

## 1.2 Цели и задачи

Целью данной работы является исследование соотношения каталитической и бактериолитической активностей вариантов рекомбинантного белка лизоцифина из *Staphylococcus simulans*, полученных на основе биоинженерного подхода с помощью замены нативного иона цинка в активном центре белка на ионы других металлов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать метод определения каталитической активности лизоцифина с использованием пентаглицина в качестве субстрата.
2. Адаптировать для проведения исследований методы определения пептидогликанолитической и бактериолитической активностей лизоцифина на основе снижения мутности суспензии изолированных клеточных оболочек *S. aureus* и интактных бактериальных клеток *S. aureus* соответственно.
3. Исследовать каталитическую, пептидогликанолитическую и бактериолитическую активность вариантов рекомбинантного лизоцифина с ионами различных металлов в активном центре белка.

4. Исследовать соотношения между уровнями пептидогликанолитической и бактериолитической активностей рекомбинантного лизостафина и уровнем его каталитической активности.

5. Исследовать влияние никель-хелатных хроматографических сорбентов, применяемых при очистке рекомбинантных белков, на активность металлсодержащего рекомбинантного белка лизостафина.

### 1.3 Объект и предмет исследования

Объектами исследования были варианты рекомбинантного белка лизостафина из *S. simulans* без и с дополнительной гексагистидиновой меткой (6xHis-tag) на С-конце белка, варианты рекомбинантного лизостафина с ионом цинка, замененным на ионы других металлов в активном центре белка, пентаглициновый пептид, интактные клетки *S. aureus* ATCC 29213 и полученные из них пептидогликановые оболочки.

Предметами исследования были: метод определения каталитической активности рекомбинантного белка лизостафина с использованием изолированного пентаглицина в качестве субстрата при помощи колориметрической реакции с нингидрином, соотношение между уровнем пептидогликанолитической и бактериолитической активности рекомбинантного лизостафина и уровнем его каталитической эффективности и влияние никель-хелатного хроматографического сорбента, использованного для выделения и очистки рекомбинантного лизостафина, на его каталитическую и бактериолитическую активность.

### 1.4 Научная новизна

Впервые разработан метод определения каталитической активности лизостафина с использованием изолированного пентаглицинового пептида в качестве субстрата при помощи хромогенной реакции с нингидрином, который не требует сложных и дорогостоящих реагентов или специального оборудования для своего осуществления.

Впервые охарактеризована широкая панель вариантов рекомбинантного лизостафина с ионом цинка, замененным на двухвалентные ионы других металлов в активном центре белка, с точки зрения их каталитической, пептидогликанолитической и бактериолитической активностей.

Впервые выявлены линейные зависимости уровней пептидогликанолитической и

бактериолитической активностей рекомбинантного лизоцифа от уровня его каталитической эффективности и определен характер этой связи. Показано, что компоненты реакционной смеси, используемой для изучения пептидогликанолитической и бактериолитической активностей рекомбинантного лизоцифа способны значительно влиять на наблюдаемый уровень активности белка.

Впервые продемонстрировано уменьшение уровня активности рекомбинантного лизоцифа при его выделении и очистке с использованием никель-хелатных хроматографических сорбентов с относительно слабым связыванием ионов  $\text{Ni}^{2+}$ . Установлено, что данное уменьшение активности лизоцифа обусловлено взаимодействием ионов  $\text{Ni}^{2+}$ , связанных с сорбентом, с активным центром фермента. Показано, что удаление ионов металлов из активного центра лизоцифа и последующее включение нативного иона  $\text{Zn}^{2+}$  приводит к полному восстановлению активности фермента, на основе чего разработан метод восстановления активности рекомбинантного лизоцифа.

### 1.5 Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты углубляют теоретические представления об активности антибактериального лизоцифа и могут быть распространены в той или иной степени на других представителей семейства эндопептидаз M23, к которому он принадлежит.

Разработанный метод определения каталитической активности лизоцифа может быть использован при научных исследованиях не только лизоцифа, но и других антибактериальных лизоцинов, а также при разработке (для исследования активности различных лекарственных препаратов *in vitro*) и производстве (для контроля качества партий лекарственного препарата) лекарственных препаратов на их основе.

Биоинженерный подход получения панели вариантов рекомбинантного белка с модифицированным активным центром при помощи замены нативного иона металла на ионы других металлов, в совокупности с методом восстановления нативного иона металла в таких белках может быть применён для исследования и модуляции активности не только лизоцинов семейства M23, но и других металлсодержащих белков.

Результаты о характере связи между уровнями бактериолитической, пептидогликанолитической и каталитической активности рекомбинантного лизоцифа углубляют теоретические представления об активности лизоцифа и могут быть использованы при разработке новых антибактериальных препаратов на основе рекомбинантных

и/или химерных лизинов.

Данные о влиянии хроматографического сорбента на активность лизостафина, полученного с его использованием, позволят более тщательно и адекватно планировать проведение теоретических и практических исследований, посвящённых изучению не только лизостафина, но и других антибактериальных лизинов семейства M23, а также, возможно, и других металл-зависимых ферментов. Кроме того, это позволит проводить адекватную оценку и сравнение между собой результатов различных исследований, связанных с одними и теми же объектами.

## 1.6 Методология и теоретические основы исследования

Теоретические основы исследования выведены из анализа различных литературных источников, в том числе приведённых в списке литературы, а также выводов, полученных в результате проведения экспериментальной работы. В исследовании были использованы различные методы биоинженерии, биохимии и физико-химической биологии, отвечающие общепринятым мировым стандартам. Все эксперименты содержат надлежащие контроли и выполнены не менее трёх раз с не менее чем тремя техническими повторностями в каждом эксперименте.

## 1.7 Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный метод на основе хромогенной реакции с нингидрином с использованием изолированного пентаглицина в качестве субстрата позволяет определять уровень каталитической активности рекомбинантного лизостафина.

2. Установленный линейный характер зависимости уровня, как пептидогликанолитической, так и бактериолитической активности лизостафина от уровня его каталитической активности показывает целесообразность улучшения характеристик каталитической части генно-инженерных химерных лизинов на его основе для разработки новых эффективных антибактериальных лекарственных соединений.

3. Использование никель-хелатных хроматографических сорбентов с относительно слабым связыванием ионов  $Ni^{2+}$  частицами сорбента для очистки препаратов белка приводит к существенному уменьшению как каталитической, так и бактериолитической активности лизостафина из-за изменения количества и/или состава каталитических ионов металлов в его

активном центре.

4. Разработанный метод обработки лизоцифина ЭДТА для удаления всех ионов металлов из активного центра фермента с последующим встраиванием в его активный центр нативного иона  $Zn^{2+}$  позволяет восстановить уровень активности рекомбинантного лизоцифина и может быть применим для других цинк-содержащих ферментов.

## 1.8 Степень достоверности данных

Обзор литературы подготовлен с использованием актуальных публикаций и соответствует теме диссертации. Данные были получены с использованием современных методов биоинженерии, биохимии и физико-химической биологии. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Excel (Microsoft, США) с надстройкой Real Statistics Resource Pack (Charles Zaiontz, real-statistics.com). Результаты исследования были представлены на четырёх международных конференциях и по ним опубликованы четыре статьи в международных рецензируемых научных журналах.

## 1.9 Личный вклад автора

Выбор и отработка методик исследований; работа с культурами штаммов-продуцентов *Escherichia coli* BL21 (DE3), выделение и хроматографическая очистка целевых рекомбинантных белков при помощи различных хроматографических сорбентов для получения препаратов различных вариантов рекомбинантного белка лизоцифина; получение препаратов рекомбинантного лизоцифина с ионами различных металлов в активном центре фермента; исследование препаратов лизоцифина с ионами различных металлов в активном центре; изучение каталитической активности при помощи разработанного метода определения каталитической активности лизоцифина с использованием изолированного пентаглицина в качестве субстрата; исследование пептидогликанолитической и бактериолитической активности препаратов лизоцифина с ионами различных металлов в активном центре при помощи турбидиметрических методов с использованием очищенных пептидогликановых оболочек и интактных клеток *S. aureus* соответственно; изучение зависимости уровня пептидогликанолитической и бактериолитической активности от уровня каталитической активности лизоцифина с использованием препаратов лизоцифина с ионами различных металлов в активном центре фермента; исследование каталитической и бактериолитической активности препаратов рекомбинантного лизоцифина, выделенных при помощи различных

хроматографических сорбентов; обработка и оценка полученных результатов исследования, оформление диссертации и автореферата выполнены Шестаком Н.В. самостоятельно.

Плазмиды для экспрессии рекомбинантного лизостафина без и с С-концевой 6xHis-tag были предоставлены с.н.с. к.б.н. Лящуком А.М. (лаб. биологически активных наноструктур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Разработка метода определения каталитической активности лизостафина была проведена совместно с н.с. Гришиным А.В. (лаб. биологически активных наноструктур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

#### 1.10 Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано четыре статьи в международных рецензируемых научных журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science (в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах):

1. Grishin A.V., Lavrova N.V., Lyashchuk A.M., Strukova N.V., Generalova M.S., Ryazanova A.V., **Shestak N.V.**, Boksha I.S., Polyakov N.B., Galushkina Z.M., Soboleva L.A., Vetchinin S.S., Pavlov V.M., Karyagina A.S., Lunin V.G. The influence of dimerization on the pharmacokinetics and activity of an antibacterial enzyme lysostaphin.// *Molecules*. — 2019. — Vol. 24, № 1879. — P. 1—13. JIF (для WoS) = 4.2, (1,50/0,27).

2. Grishin A.V., **Shestak N.V.**, Lavrova N.V., Lyashchuk A.M., L.I. Popova, Strukova N.V., Generalova M.S., Ryazanova A.V., Polyakov N.B., Galushkina Z.M., Soboleva L.A., Boksha I.S., Karyagina A.S., Lunin V.G. Fusion of lysostaphin to an albumin binding domain prolongs its half-life and bactericidal activity in the systemic circulation.// *Molecules*. — 2019. — Vol. 24, № 2892. — P. 1—14. JIF (для WoS) = 4.2, (1,62/0,42).

3. Grishin A.V., Konstantinova S.V., Vasina I.V., **Shestak N.V.**, Karyagina A.S., Lunin V.G. A simple protocol for the determination of lysostaphin enzymatic activity.// *Antibiotics*. — 2020. — Vol. 9, № 917. — P. 1—10. JIF (для WoS) = 4.3, (1,16/0,52).

4. **Shestak N.V.**, Grishin A.V., Lyashchuk A.M., Lunin V.G., Karyagina A.S. The choice of chromatographic resin for the purification of recombinant lysostaphin affects its activity.// *Protein Expression and Purification*. — 2023. — Vol. 207, № 106274. — P. 1—6. JIF (для WoS) = 1.4, (0,69/0,55).

### 1.11 Апробация работы

Результаты работы были представлены на четырех международных конференциях: в секции «Нанобиотехнологии в медицине» на Международном конгрессе «Биотехнологии: состояние и перспективы развития», 25-27 февраля 2019 года, Москва, Россия; на XXIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» 12-22 апреля 2022 года, Москва, Россия; в секции «Нанобиотехнологии в медицине» на Международном конгрессе «Биотехнологии: состояние и перспективы развития», 31 октября - 01 ноября 2022 года, Москва, Россия; на XXXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2024» 12-26 апреля 2024 года, Москва, Россия.

### 1.12 Объём и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из титульного листа, оглавления, списка сокращений и условных обозначений, введения, обзора литературы, материалов и методов, полученных результатов и их обсуждения, заключения, основных результатов и выводов, а также списка литературы. Работа изложена на 139 страницах, иллюстрирована 48 рисунками и 6 таблицами. Список литературы состоит из 200 источников.

## 2 Литературный обзор

### 2.1 Антибиотикоустойчивые штаммы *S. aureus*

Род *Staphylococcus* – это род грамположительных, неподвижных, неспорообразующих микроорганизмов [5]. Представители данного рода широко распространены в природе и большинство из них относится к нормальной микрофлоре человека и животных. Одним из наиболее известных представителей рода *Staphylococcus* является вид *S. aureus*. Это условно-патогенный микроорганизм, который обнаруживается на коже, слизистых оболочках верхних дыхательных путей, нижних отделов мочеполового и желудочно-кишечного тракта человека [5,53], а также на коже и слизистых оболочках различных теплокровных животных и птиц [5,54–56]. По статистике, 25-30% людей постоянно колонизированы штаммами *S. aureus* и около 60% населения являются временными носителями этого патогена [1,4–6].

Штаммы *S. aureus* способны вызывать широкий спектр различных заболеваний, таких как бактериемия [1,4,5,57], инфекционный эндокардит [1,4,58,59], синдром токсического шока [1,4,6,60,61], менингит [1], остеомиелит [1,3,62,63], костно-суставные инфекции [1,4,61,64], инфекции суставных протезов [1], инфекции кожи и мягких тканей [1,57,65]. Кроме того, *S. aureus* может выделять токсины в продукты питания, что приводит к отравлениям, а также способен образовывать стойкие биоплёнки на различном медицинском оборудовании. Существенную опасность для жизни и здоровья населения представляют антибиотикоустойчивые штаммы *S. aureus*.

До открытия антибиотиков смертность пациентов с бактериемией, вызванной *S. aureus*, превышала 80%, и более чем у 70% развивались метастатические инфекции внутренних органов. Внедрение в начале 1940-х годов в клиническую практику первого антибиотика пенициллина резко улучшило прогноз больных стафилококковой инфекцией. Однако всего через два года, в 1942 году, устойчивые к пенициллину штаммы *S. aureus* были обнаружены сначала в больницах, а затем и среди населения. К концу 1960-х годов более 80% всех изолятов *S. aureus* были устойчивы к пенициллину [7,8]. Их устойчивость к пенициллину объяснялась действием фермента  $\beta$ -лактамазы, которая расщепляла  $\beta$ -лактамное кольцо этого антибиотика. В 1959 году был представлен первый полусинтетический антибиотик пенициллинового ряда, названный метициллином, который был устойчив к действию  $\beta$ -лактамазы. Однако вскоре после его введения в медицинскую практику, уже в 1961 году, последовали сообщения об

обнаружении устойчивых к метициллину изолятов *S. aureus*. Было также обнаружено, что эти штаммы устойчивы к другим  $\beta$ -лактамным антибиотикам, включая оксациллин и цефокситин, что серьезно усложняет лечение заболеваний, вызванных такими штаммами бактерий [5,7,66]. Позже штаммы *S. aureus* с таким спектром устойчивости получили обозначение MRSA [5,11,67]. При этом клиническая картина, наблюдаемая у пациентов с заболеваниями, вызванными штаммами MRSA, была намного хуже, чем для заболеваний метициллин-чувствительными штаммами золотистого стафилококка (MSSA) [7]. Общая схема приобретения устойчивости к антибиотикам, которая начинается с появления устойчивых больничных штаммов бактерии с их последующим распространением вне стен лечебных учреждений, остается актуальной и в настоящее время [7,8,11].

В связи с широким распространением штаммов MRSA вызванные ими заболевания лечат при помощи других типов антибиотиков, например, гликопептидного антибиотика ванкомицина. Устойчивость к нему развивается намного медленнее, чем к метициллину, однако, на сегодняшний день уже обнаружены штаммы *S. aureus*, в той или иной степени устойчивые к действию ванкомицина [68–70]. Уже в 2005 году были зарегистрированы случаи инфекций, вызванных ванкомицин-устойчивым золотистым стафилококком (VRSA) [71]. На текущий момент не было обнаружено штаммов *S. aureus* с перекрестной устойчивостью к метициллину и ванкомицину, однако их появление может существенно осложнить и без того серьезную проблему лечения заболеваний, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами патогенных бактерий.

В связи с этим, в последние десятилетия активно ведется разработка новых терапевтических агентов, способных бороться с антибиотикоустойчивыми штаммами *S. aureus*, в том числе штаммами MRSA, применение которых не будет вызывать развития устойчивости патогенных бактерий к ним.

## 2.2 Строение бактериального пептидогликана

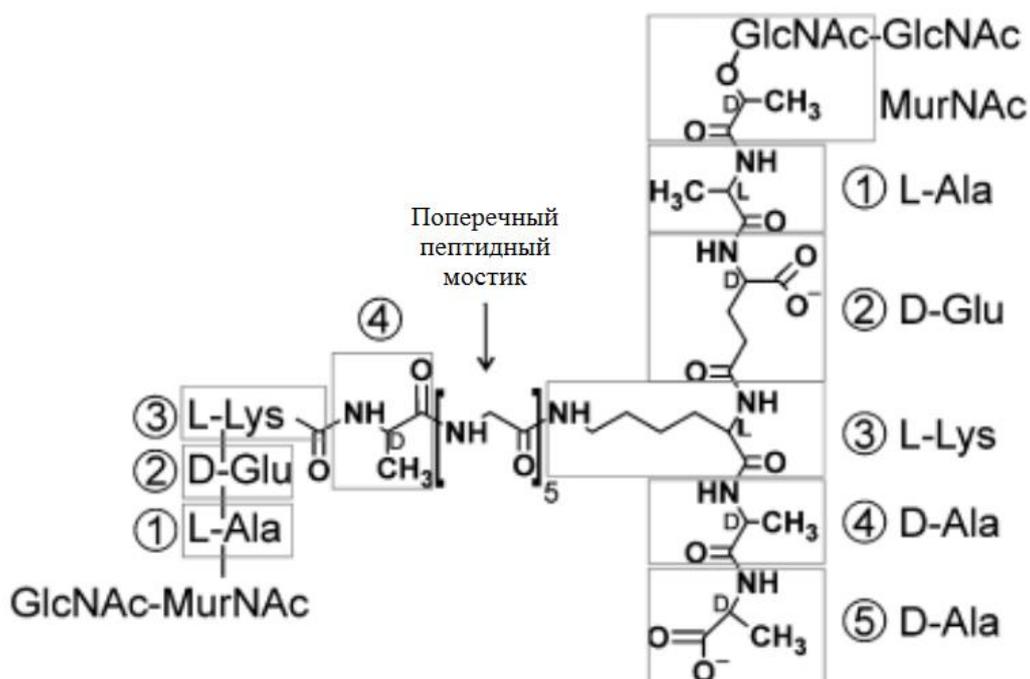
Оболочка бактериальных клеток, защищающая их от окружающей среды, различается у различных бактерий. У грамположительных бактерий она состоит из внутренней мембраны, покрытой сверху толстым слоем пептидогликана (15–80 нм) [72–74]. У грамотрицательных бактерий тонкий пептидогликановый слой (3–10 нм) заключен между внешней и внутренней мембранами клетки [72–74]. Пептидогликан бактериальной клетки обеспечивает её целостность и устойчивость к осмотическому давлению, а также участвует в придании клетке определенной формы и служит основой для прикрепления других компонентов клеточной оболочки, таких

как белки [72,75], тейхоевые кислоты [72,76], внешняя клеточная мембрана [75] или капсула, как например у *Bacillus anthracis* [75].

Пептидогликан представляет собой сложную систему линейных гликановых тяжей различной длины перешитых между собой при помощи коротких пептидов [77]. Гликановые тяжи состоят из перемежающихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединённых между собой  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 гликозидной связью. В каждом остатке N-ацетилмурамовой кислоты к D-лактоильной группе присоединен стволовой пептид (stem peptide) длиной от 3 до 5 аминокислотных остатков (а.о.), различающийся по аминокислотному составу у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Стволовые пептиды сшивают различные гликановые тяжи друг с другом при помощи пептидной связи карбоксильной группы D-Ala в 4 положении одного стволового пептида и боковой аминогруппы диаминовой кислоты в 3 положении другого стволового пептида непосредственно или через поперечный пептидный мостик, обладающий различными длиной и аминокислотным составом [72,74,78].

Структура пептидогликана грамотрицательных бактерий довольно консервативна и строится на основе прямой связи между мезо-2,6-диаминопимелиновой кислотой (Dpm) одного стволового пептида и D-аланином другого (Dpm тип бактериального пептидогликана). Структура пептидогликана грамположительных бактерий, напротив, разнообразна за счет различного состава и длины поперечных пептидных мостиков между остатками L-лизина и D-аланина разных стволовых пептидов (L-Lys тип бактериального пептидогликана) [72,74,78].

У *S. aureus* стволовой пептид состоит из L-аланина, D-изоглутамина, L-лизина, D-аланина и D-аланина, а связаны между собой стволовые пептиды при помощи поперечного пентаглицинового мостика. При этом при формировании сшивки от одного стволового пептида отщепляется концевой (пятый) остаток D-аланина и образуется связь между карбоксильной группой D-аланина в 4 положении, ставшим в нём концевым, и  $\epsilon$ -аминогруппой лизина в 3 положении другого стволового пептида через поперечный пентаглициновый мостик (рисунок 2.1) [72,74,78].



**Рисунок 2.1** – Структура пептидогликана *S. aureus*. *GlcNAc* - *N*-ацетилглюкозамин;  
*MurNAc* - *N*-ацетилмурамовая кислота.

## 2.3 Антибактериальные лизины

### 2.3.1 Общая характеристика

Антибактериальные лизины – это ферменты бактерий и бактериофагов, расщепляющие пептидогликан клеточной стенки бактерий. Бактерии используют данные ферменты гидролиза собственного пептидогликана в процессе жизнедеятельности клетки (например, автолизины *LytM* и *LytU* [20,37,79]) или для борьбы с клетками конкурирующих бактериальных штаммов (например, *S. simulans* использует лизостафин для борьбы с *S. aureus*). Бактериофаги используют данные ферменты на ранней стадии инфекционного цикла для разрушения клеточной стенки и введения вирусной ДНК в клетку (эктолизины) [80] или на поздней стадии для обеспечения выхода новых вирионов из неё (эндолизины) [81,82].

Во множестве экспериментов с использованием *in vivo* моделей сепсиса [13,31,82–85], менингита [82,86], носоглоточной инфекции [31,82,87], пиодермии [82,88], эндофтальмита [31,82,89], пневмонии [82,85,90,91], эндокардита [31,82,92], кожной и вагинальной колонизации [31,82,85,93–95] была показана эффективность лизинов для эрадикации системной и местной инфекции (в т.ч. связанной с формированием биопленок), вызванной как грамположительными патогенными бактериями, например, *MRSA*, *VRSA*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus*

*faecium*, пенициллин-устойчивым *Streptococcus pneumonia*, так и грамотрицательными бактериями, такими как карбапенем-устойчивые *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*.

Благодаря своей способности разрушать клетки бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, лизины считаются перспективными противомикробными энзимотиками с потенциально широким применением в медицине [82,96–98], пищевой промышленности [82,99–102] и биотехнологии [82,103,104]. Привлекательность лизинов в качестве основы новых лекарственных препаратов обусловлена несколькими причинами. Среди них специфичность антибактериального действия лизинов по отношению к патогенным бактериям [85,94,95,105–107] при отсутствии действия на нормальную микрофлору [85,107,108]. Также, это низкий шанс развития устойчивости у бактерий к применяемым антибактериальным лизином, а кроме того, способность убивать патогены, колонизирующие слизистые оболочки [82,107,109,110], в том числе разрушать бактериальные биопленки [85,94,95,105–107]. Помимо этого, ряд *in vitro* и *in vivo* исследований показывает, что вырабатываемые против лизинов антитела обладают слабыми или не обладают нейтрализующими свойствами в их отношении [12,14,82,111,112], Это означает, что лизины могут быть повторно использованы в лечении инфекций, вызванных патогенами, чувствительными к соответствующим лизином. Более того, комбинирование лизинов с существующими антибиотиками демонстрирует синергическое действие и может быть перспективно для лечения различных бактериальных инфекций [105,113].

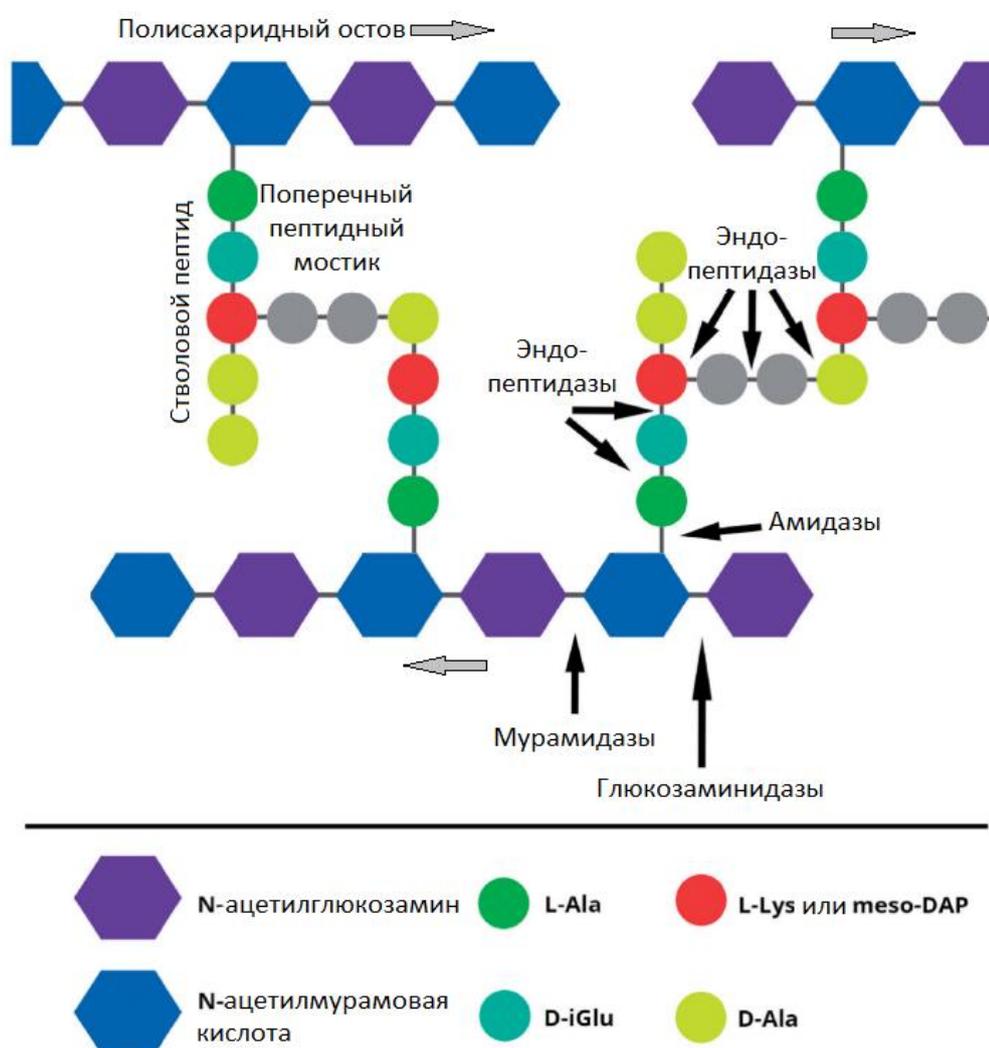
В настоящее время активно исследуется большое количество лизинов в качестве перспективных кандидатов для создания антибактериальных лекарственных препаратов против таких возбудителей заболеваний, как *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* и других бактериальных патогенов [114]. Больше трёх десятков антибактериальных лизинов находятся на стадии доклинических испытаний, а некоторые препараты на их основе перешли уже на I-II фазу клинических исследований, например, SAL200 (N-Rephasin<sup>®</sup>), P128 (StaphTAME), SA.100 (Staphfekt<sup>™</sup>) (все препараты предназначены для борьбы с *S. aureus*) [74,114,115]. Кроме того, уже существует лекарственный препарат Eхеbacase<sup>®</sup> на основе лизина CF-301 (PlySs2) против *S. aureus* и *Streptococcus*, который достиг III фазы клинических испытаний [74,114–116].

### 2.3.2 Структура антибактериальных лизинов

Для антибактериальных лизинов характерно наличие двух основных функций, обычно распределённых между несколькими различными доменами лизинов. В соответствии с ними

выделяют каталитические домены, отвечающие за каталитическое расщепление различных связей в бактериальном пептидогликане, и домены, связывающиеся с клеточной стенкой (cell wall binding domain, CBD), отвечающие за специфичное связывание белка с компонентами клеточной оболочки бактериальной клетки для адресной доставки белка к клетке-мишени [73,82,114,117].

Все лизины в зависимости от типа расщепляемой их каталитическим доменом связи подразделяются на пять классов: три класса лизинов, действующих на гликозидные связи, один класс амидаз и один класс эндопептидаз (рисунок 2.2) [74,107,118–120].



**Рисунок 2.2 – Классы антибактериальных лизинов и расщепляемые ими связи в структуре бактериального пептидогликана.**

К лизидам, расщепляющим гликозидные связи относят:

1. N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы (КФ 3.2.1.52), расщепляющие связь N-ацетилглюкозаминил- $\beta$ -1,4-N-ацетилмурамина на восстанавливаемом конце

N-ацетилглюкозамина;

2. N-ацетил- $\beta$ -D-мурамидазы (КФ 3.2.1.17), также называемые лизоцимами или мурамидазами, гидролизующие N-ацетилмурамоил- $\beta$ -1,4-N-ацетилглюкозаминовою связь;

3. Литические трансгликозилазы (КФ 4.2.2.n1), катализирующие внутримолекулярную реакцию между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином, приводящую к разрыву гликозидной связи между ними (не являются гидролазами из-за отсутствия участия воды в катализируемой реакции).

К классу амидаз относят N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазы (КФ 3.5.1.28) гидролизующие амидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и L-аланином, выступающим первым а.о. стволового пептида (stem peptide).

Эндопептидазы (КФ 3.4.-.-), расщепляющие различные пептидные связи в структуре пептидогликана клеточной стенки бактерий, подразделяются на эндопептидазы, специфичные к стволовым пептидам (например, L-аланоил-D-глутамат-эндопептидазы,  $\gamma$ -D-глутаминил-L-лизин-эндопептидазы) и специфичные к поперечным пептидным мостикам и прямым связям между стволовыми пептидами (например, D-аланил-глицин-эндопептидаза, глицил-глицин-эндопептидазы).

Лизины, действующие против грамположительных бактерий, обычно содержат N-концевой каталитический домен (один или несколько доменов с различной каталитической активностью [82,121–125]) и один или несколько C-концевых CBD [85,94,126,127]. Например, лизин PlyG из бактериофага, атакующего представителей рода *Bacillus*, имеет один каталитический домен, и два отдельных связывающих домена с различными функциями: один домен отвечает за связывание с клеточной стенкой интактной бактерии, а второй отвечает за связывание со спорами этой бактерии [82,128]. Необычную мультимерную структуру имеет лизин PlyC из стрептококкового бактериофага C1, в которой на одну каталитическую субъединицу белка приходится целых восемь субъединиц, связывающихся с клеточной стенкой [82,127,129]. Однако существуют также примеры природных лизинов эффективных против грамположительных бактерий, обладающих отличным от упомянутого выше строением белка. Например, лизины LytM и LytU не обладают отдельным CBD и состоят только из одного каталитического домена [37].

Субстратами CBD являются уникальные и консервативные элементы клеточных стенок, связывание с которыми обеспечивает «закрепление» молекулы лизина на поверхности бактерии и эффективное расщепление пептидогликана при помощи каталитического домена фермента [82,130,131]. Специфичность CBD может варьировать в широких пределах, тем самым

существенно влияя на специфичность действия лизина в целом. Так, например, CBD лизина из бактериофага листерии настолько специфичен к своему субстрату, что способен различать различные серотипы листерий в жидкостях и образцах еды, что придает лизину крайне узкую специфичность [82,132–137]. Примером обратной ситуации является CBD домен LysM, впервые обнаруженный в лизоциме бактериофага бактерии рода *Bacillus*, который, напротив, способен связываться с пептидогликаном нескольких родов бактерий, а именно *Bacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus*, что, соответственно, придает лизину широкую специфичность [82,138,139]. Несмотря на то, что для большинства лизинов CBD жизненно необходим и без него свойства лизина заметно ухудшаются, существуют обратные примеры, когда удаление CBD приводит к улучшению литических свойств лизина, в том числе без потери специфичности [82,140–142]. Например, каталитический домен лизина Ply187 (его N-концевые 157 а.о.) проявляет более высокую амидазную активность, чем целый лизин [82,140].

Важно отметить, что в отличие от грамположительных клеток бактерий, в которых толстый слой пептидогликана экспонирован наружу клетки и доступен для экзогенного литического действия антибактериальных лизинов, у грамотрицательных бактерий внешняя мембрана защищает слой пептидогликана от действия лизинов [73,84,85]. В связи с этим природные и генно-инженерные лизины против грамотрицательных бактерий должны быть способны тем или иным способом преодолевать ее, чтобы достигнуть пептидогликанового слоя грамотрицательных бактерий и разрушить его [85,94,107,143–147]. В следствие этого такие лизины обычно не имеют CBD и представляют собой каталитический домен с положительно заряженной или амфипатической концевой частью, которая позволяет проникать через наружную клеточную мембрану [73,84,85,94,107,147–149]. Например, лизин Pae87 из бактериофага *P. aeruginosa* JG004 содержит каталитический лизоцим-подобный домен и амфипатический С-концевой участок, позволяющий разрушать внешнюю клеточную мембрану клетки [107]. Лизины LysAB3 и LysAB4, гены которых были получены из профаговых регионов *A. baumannii*, обладают глобулярной структурой с двумя положительно заряженным амфипатическими спиральями в С-концевой области белка [73,150]. Другой антибактериальный лизин PlyF307, также действующий против *A. baumannii*, обладает глобулярной структурой с сильно положительно заряженной С-концевой областью белка [73,94]. В другом исследовании на основе геномов бактериофагов *Helicobacter pylori* КНР30 и 1961Р и оптимизированной последовательности трансмембранного пептида холина был синтезирован синтетический лизин, способный распознавать и уничтожать клетки *H. pylori*. Он состоит из каталитического домена с присоединённой через подвижный линкер последовательностью трансмембранного пептида, обеспечивающего проникновение лизина через внешнюю мембрану клетки [151].

Из-за относительной независимости функций доменов в составе лизинов возможно создание генно-инженерных лизинов путем изменения их каталитических и связывающих доменов. Благодаря этому становится возможным улучшать свойства лизинов, включая такие характеристики, как специфичность связывания, спектр антибактериального действия, растворимость, стабильность и активность [82,152].

### 2.3.3 Синтетические антибактериальные лизины

Комбинация различных каталитических доменов и CBD, принадлежащих разным природным лизином, позволяет получать новые генно-инженерные антибактериальные лизины, называемые химеолизинами [82,152]. Такие химеолизины могут обладать улучшенными свойствами, например, повышенной растворимостью, улучшенной биодоступностью, расширенным спектром антибактериального действия, что открывает широкие перспективы для создания на их основе новых лекарственных препаратов [82,152]. Существует большое количество химеолизинов, свойства которых активно исследуются в настоящее время. Например, при присоединении каталитического домена лизина Ply187AN с амидазной активностью к CBD лизина LysK (семейство SH3b, связывающее поперечные пентаглициновые мостики [153]), литическая активность химеолизина Ply187AN-KSH3b возросла в десять раз по сравнению с исходным Ply187AN [82,154]. Другой химеолизин ClyH, состоящий из каталитического домена лизина Ply187 и CBD лизина phiNM3, обладает увеличенной в 3,7-13,6 раза литической активностью против *S. aureus* [82,112]. Кроме того, ClyH может в том числе лизировать *Streptococcus sobrinus*, чего родительские лизины делать не могут. Похожие результаты показывает химеолизин Ply187N-V12C, однако в этом случае химеолизин имеет расширенную литическую активность против *Streptococcus dysgalactiae*, основного патогена, вызывающего мастит у коров [82,155]. При замене CBD лизина Cpl-7 на SH3b CBD из лизостафина наблюдается пятикратное увеличение антибактериальной активности полученного химеолизина против клеток стафилококка, при том, что химерный белок также обладает и значительной активностью против клеток стрептококка [82,156]. При объединении каталитического домена лизина из фага Twort с CBD от лизина phiNM3 был получен хорошо растворимый химерный белок ClyS [14,82,157]. Полученный химерный белок обладал улучшенной растворимостью и при использовании на модели мышиноного сепсиса показал активностью против штаммов MRSA [14,82]. Кроме того, при сравнении с действием мупироцина (антибактериальное средство для наружного применения, в том числе против штаммов MRSA) активность химеолизина ClyS оказалась выше для деколонизации кожных покровов мышей от штаммов MRSA и MSSA [82,157]. В работе [158] авторы улучшили растворимость и антимикробную активность Lys87 путем замены его каталитического домена

на каталитический домен хорошо растворимого энтерококкового лизина. Помимо этого, разработка новых химеолизинов способна помочь преодолеть фаговую устойчивость бактерий, что было показано для химерного лизина PRF-119, который способен бороться с четырьмя фаго-устойчивыми мутантами *S. aureus* [82,159].

Помимо использования частей природных лизинов для придания необходимых свойств полученному химеолизину, можно комбинировать лизины и/или их части с другими веществами, например, антибиотиками, антимикробными пептидами или доменами белков, не относящихся к лизинам. Результат такого слияния называют артилизинами [82]. Это позволяет, например, распространить действие лизинов, эффективных против грамположительных бактерий, на грамотрицательные бактерии, на которые они практически не действуют экзогенно из-за внешней клеточной мембраны [82,160,161]. Наглядным примером является артилизин Art-175, созданный присоединением овечьего миелоидного антимикробного пептида SMAP-29 к N-концу природного лизина KZ144 [82,161]. SMAP-29 представляет собой амфифильный альфа-спиральный антибактериальный полипептид из лейкоцитов овец, принадлежащий к семейству кателицидинов и способный проникать через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий [82,162]. Полученный в результате слияния артилизин Art-175 продемонстрировал высокую антибактериальную активность против штаммов *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью. При этом по отдельности родительские части Art-175 обладали существенными недостатками. Механизм антибактериального действия антимикробных пептидов (к которым относится SMAP-29) основан на непосредственном разрушении наружной и цитоплазматической мембраны клетки путем встраивания в них с формированием каналов или выстиланием поверхности мембраны, приводящим к её разрушению. Также антимикробные пептиды могут действовать на внутриклеточные цели после проникновения через мембраны. Однако при этом они обладают высокой цитотоксичностью для клеток млекопитающих, что не позволяет использовать их в качестве самостоятельного антибактериального агента [82,163,164]. Природная форма лизина KZ144 не способна непосредственно уничтожать клетки *P. aeruginosa*, однако показала свою эффективность против обработанных хлороформом клеток [82,165] или под действием высокого гидростатического давления [82,166]. Под действием хлороформа клетка может сохранить свою целостность, несмотря на то, что лишается своей внешней мембраны. При этом наружу экспонируется пептидогликановый слой, который становится доступен для литического действия лизина. При высоком давлении увеличивается проникающая способность молекул, что так же позволяет лизину проникать через внешнюю клеточную мембрану и воздействовать на пептидогликановый слой клетки. При этом, полученный в результате слияния KZ144 и SMAP-29, артилизин преодолевает недостатки обоих доноров, и не только способен

непосредственно убивать клетки *P. aeruginosa*, но и не проявляет цитотоксических свойств в отношении клеток млекопитающих.

Пример соединения части природного лизина с другим белком, который не является лизином – артилизин, сконструированный путем присоединения домена, связывающего транслокационный рецептор FyuA, к N-концу лизоцима T4 [82,160]. Полученный артилизин является пестицин-подобным гибридным токсином и эффективен против штаммов *Yersinia* и патогенных штаммов *E. coli*. Механизм действия этого артилизина связан с работой транслокационного переносчика внешней мембраны, связанного с FyuA-рецептором. В клетке данный рецептор отвечает за перенос в неё сидерофоров – молекул-переносчиков и аккумуляторов ионов железа, обладающих низкой биодоступностью, но необходимых для жизнедеятельности клетки [167]. При взаимодействии с данным рецептором артилизин способен проникать через внешнюю клеточную мембрану, используя естественную транспортную систему клетки, и достигать её пептидогликанового слоя, который разрушается под действием лизоцима T4 в составе данного артилизина [82,160].

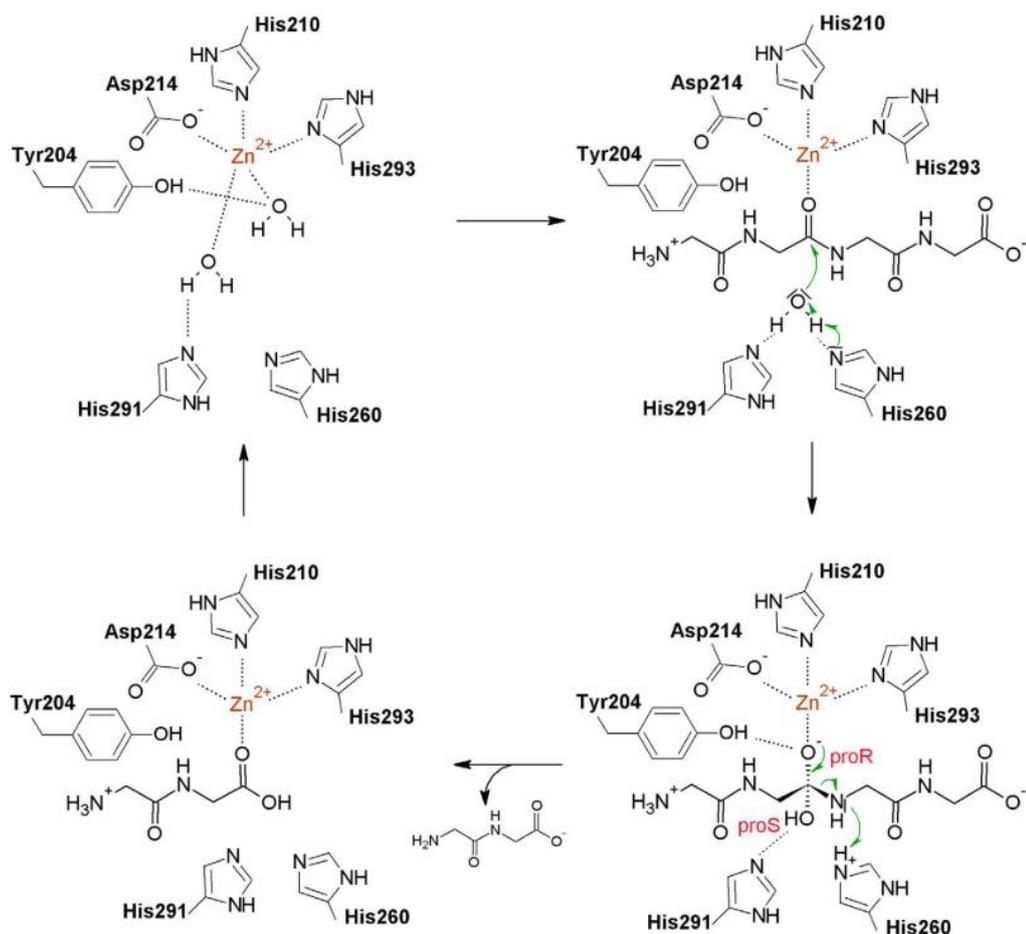
Таким образом, антибактериальные лизины представляют собой большой класс ферментов, обладающих высокой специфичностью и антибактериальной активностью против патогенных микроорганизмов, в том числе устойчивых к действию антибиотиков, а также низкой вероятностью развития устойчивости к ним. Огромное число разнообразных природных лизинов, а также их модульная структура дает широкие возможности для создания биоинженерных лизинов с необходимыми свойствами, позволяя влиять, например, на растворимость белка, его биодоступность или спектр антибактериального действия. Все это позволяет считать лизины перспективными кандидатами для создания лекарственных препаратов для борьбы с устойчивыми к действию антибиотиков патогенными бактериями, в том числе со штаммами MRSA.

## 2.4 Лизостафин из *S. simulans*

### 2.4.1 Общая характеристика, строение и механизм действия лизостафина

Лизостафин (КФ 3.4.24.75) – это антибактериальный лизин, продуцируемый клетками *S. simulans* и принадлежащий семейству пептидаз M23. Представители данного семейства являются пептидогликановыми гидролазами с двумя консервативными каталитическими мотивами:  $H(x)_nD$  и  $HxH$  [74,168]. Большинство их представителей обнаруживается в различных бактериях, однако существует несколько представителей семейства M23, которые

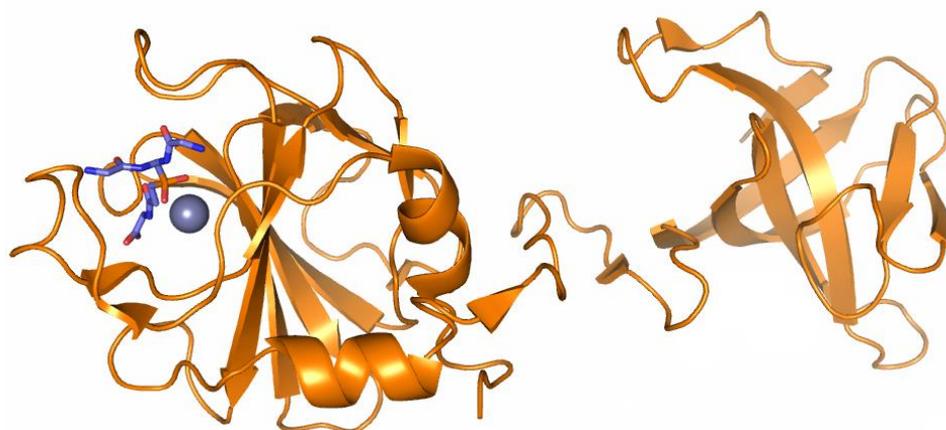
были обнаружены в бактериофагах. Первым открытым белком данного семейства стал  $\beta$ -литический белок из *Lysobacter enzymogenes* (ранее *Achromobacter lyticus*), который лизировал другие бактерии и некоторые почвенные нематоды. Вместе со стафилолизином (LasA) из *P. aeruginosa* и псевдоальтеринном из штамма CF6-2 *Pseudoalteromonas* sp. он формирует подсемейство M23A, характеризующееся высокой толерантностью к аминокислоте в позиции P1', находящейся в сайте расщепления пептидазой P1-P1' [74]. Большинство известных бактериальных и фаговых пептидаз семейства M23 принадлежит к подсемейству M23B и отдает предпочтение глицил-глициновой связи, как, например, лизостафин, обнаруженный в штамме *S. simulans* biovar *staphylolyticus*, специфично разрушающий поперечные пентаглициновые мостики между стволовыми пептидами в составе пептидогликана клеточной стенки клинических и антибиотикоустойчивых изолятов *S. aureus*, в том числе штаммов MRSA [24,31,74]. При этом было показано, что некоторые представители семейства M23B способны проявлять другую специфичность, например, лизин ShyA, проявляющий D,D-эндопептидазную активность, или лизин YebA, разрушающий прямую связь между Dpm (P1) и D-Ala (P1'), характерную для пептидогликана грамотрицательных бактерий. Все ферменты семейства M23 являются цинк-зависимыми пептидазами, причём каталитический ион цинка участвует в нуклеофильной атаке на гидролизуемую связь. На примере лизина LytM, который является гомологом каталитического домена лизостафина, был предположен механизм каталитического действия представителей семейства пептидаз M23B, представленный на рисунке 2.3 [32].



**Рисунок 2.3 – Механизм каталитического расщепления олигоглицинового пептида представителями семейства пептидаз M23B.**

Лизостафин из *S. simulans* обладает двухдоменной архитектурой (рисунок 2.4), в которой N-концевой каталитический домен с ионом Zn<sup>2+</sup> в его активном центре (глицил-глициновая эндопептидазная активность) присоединен через гибкий линкер к С-концевому пептидогликан-связывающему домену, распознающему поперечные пентаглициновые мостики [24,153,169]. Подобное строение лизостафина обеспечивает с одной стороны эффективное связывание лизостафина с клеточной стенкой *S. aureus*, а с другой – высокую подвижность каталитического домена лизостафина относительно его пептидогликан-связывающего домена, что обеспечивает эффективное расщепление бактериального пептидогликана. Лизостафин в клетках *S. simulans* синтезируется в виде неактивного препролизостафина длиной 493 а.о., в котором N-концевые 23 а.о. представляют собой сигнальную последовательность, отвечающую за секрецию лизостафина через клеточную мембрану. После его отщепления в культуральную среду выделяется пролизостафин длиной 457 а.о., содержащий на N-конце 15 тандемных повторов по 13 а.о. в каждом, снижающие активность лизостафина в 4,5 раза [24]. Полнофункциональный зрелый лизостафин длиной 246 а.о состоит из каталитического и пептидогликан-связывающего доменов, соединенных друг с другом через гибкий линкер, [21,31,170] и формируется в

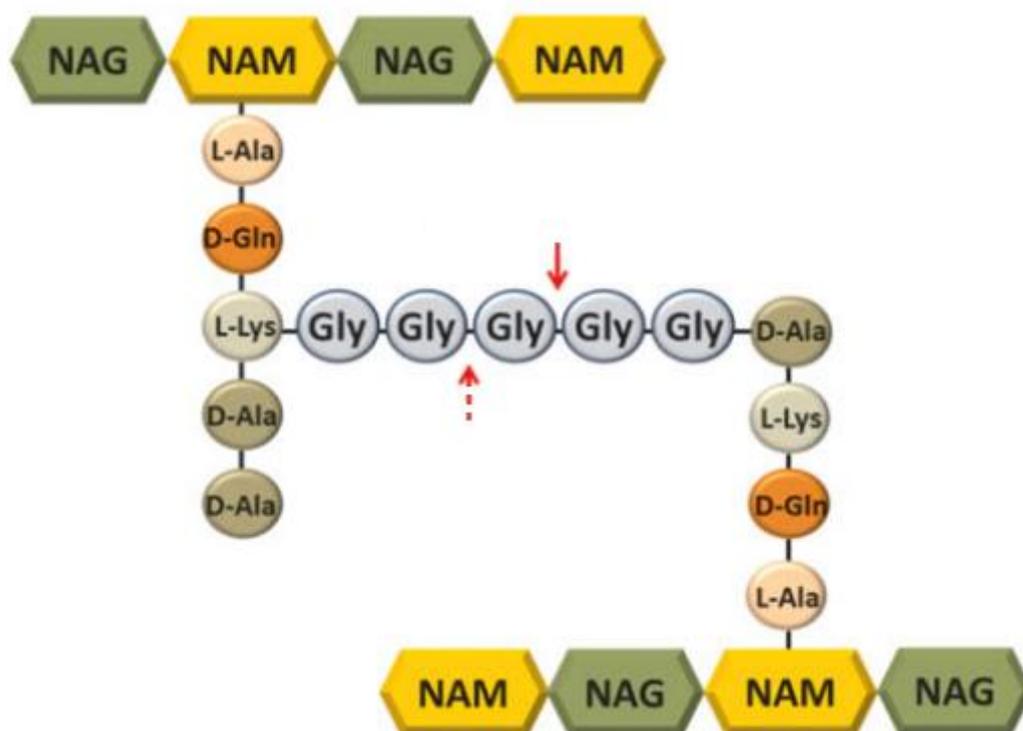
результате действия на пролизостафин цистеиновой протеазы, отщепляющей ингибирующие активность лизостафина N-концевые тандемные повторы. Молекулярный вес зрелого лизостафина составляет около 27 кДа,  $pI = 9,5$ , оптимум работы наблюдается при  $pH = 7,5$  [24,31]. Минимальная ингибирующая концентрация лизостафина против *S. aureus* составляет 0,001 – 0,064 мкг/мл [28,31].



**Рисунок 2.4 – Трёхмерная структура молекулы лизостафина из *S. simulans*.**

*Идентификационный код PDB – 4LXC, каталитический домен (слева) и пептидогликан-связывающий домен (справа). Стрелками обозначены участки  $\beta$ -тяжей, спиральями обозначены  $\alpha$ -спиральные участки белка. Остов белка выделен оранжевым цветом, синим цветом обозначен синтетический аналог субстрата лизостафина в его активном центре, серой сферой показан ион  $Zn^{2+}$ , необходимый для каталитической активности лизостафина.*

Лизостафин расщепляет глицил-глициновую связь между 2 и 3 а.о. (около 60%) и между 3 и 4 а.о. (около 40%) в поперечном пентаглициновом мостике между двумя стволовыми пептидами пептидогликана (рисунок 2.5), что приводит к осмотическому лизису бактериальной клетки и обеспечивает антибактериальное действие лизостафина. При этом показано, что сокращение длины пентаглицинового мостика до одного а.о. или замена некоторых а.о. глицина на другие аминокислоты, например, серин или аланин приводит к снижению активности лизостафина вплоть до нуля [171–173], из чего следует, что лизостафин обладает высокой специфичностью по отношению к расщепляемому субстрату.



**Рисунок 2.5 – Расщепление пептидогликана между 2 и 3 а.о. (около 60%, сплошная красная стрелка) и между 3 и 4 а.о. (около 40%, штриховая красная стрелка) поперечного пентаглицинового мостика.**

Лизостафин не обладает токсичностью по отношению к эукариотическим клеткам [44], а вырабатываемые к нему антитела проявляют низкие нейтрализующие свойства в отношении активности лизостафина [12]. Учитывая, что лизостафин способен эффективно разрушать клетки *S. aureus*, в том числе устойчивые к действию антибиотиков, включая штаммы MRSA, в настоящее время активно изучается возможность применения лизостафина в качестве антистафилококкового агента [42,46,174]. На сегодняшний день уже продемонстрированы примеры успешного применения препаратов на основе лизостафина в различных животных моделях, например, в модели назальной колонизации у хлопковых хомячков [24,27], в модели кератита [12,23] и эндофтальмита у кроликов [22], в модели системной инфекции у мышей [30]. Кроме того, описаны примеры медицинского применения лизостафина при назальной деколонизации [29,175–177].

#### 2.4.2 Методы исследования активности лизостафина

Для исследования свойств, как антибактериальных лизинов в целом, так и лизостафина в частности, а также для разработки на их основе эффективных антибактериальных препаратов нового поколения, необходимы простые и надежные методы точного определения активности изучаемых лизинов. Это необходимо как для сравнения активности различных лизинов и их

вариантов, так и для контроля качества белковых препаратов.

Поскольку антибактериальные лизины, в том числе и лизостафин, эффективно действуют против бактериальных патогенов, то их активность удобно определять по лизису соответствующих бактериальных клеток. Наиболее простым и популярным из них является турбидиметрический метод определения активности, основанный на анализе изменения мутности бактериальной суспензии [178–181]. Для этого готовят суспензию бактериальных клеток, затем добавляют к ней раствор лизостафина и в определённые моменты времени измеряют её оптическую плотность. По мере лизиса бактериальных клеток под действием фермента они перестают рассеивать свет, и оптическая плотность суспензии снижается. Затем полученную бактериолитическую активность выражают в виде уменьшения оптической плотности в единицу времени на линейном участке кривой [178,179] или в виде количества фермента, необходимого для снижения оптической плотности на определённый процент через определённый период времени [178,181]. Несмотря на простоту метода и практически прямое исследование активности лизостафина на клетки целевого патогена, он все же включает в себя работу с живыми клетками патогенных микроорганизмов, которая не всегда возможна из-за ограничений биобезопасности. Адаптация данного метода исследования активности для использования уже убитых клеток патогенов делает его более безопасным, однако, как было показано, приводит к получению результатов более низкого качества [173,182,183]. Не стоит забывать, что лизостафин, как и большинство антибактериальных лизинов, обладает мультидоменной архитектурой, в которой функции каталитического расщепления субстрата и связывания белка с клеточной стенкой бактерии разделены между различными доменами, которые При этом оба домена вносят активный вклад в антибактериальную активность лизостафина. Поскольку в методах, основанных на просветлении клеточной суспензии, невозможно исключить влияние связывания белка с клеточной стенкой при помощи CBD, то наблюдаемый уровень активности представляет собой кумулятивную активность лизостафина. Кроме того, при использовании целых бактериальных клеток на активность исследуемого антибактериального лизина также будет оказывать влияние восприимчивость определённого бактериального штамма к осмотическому лизису. В связи с этим для получения полноценных данных об активности лизинов возникает необходимость использовать также методы прямой оценки их каталитической активности. Для лизостафина это каталитическая активность по отношению к его пентаглициновому субстрату.

В нескольких описанных в литературе методах определения каталитической активности лизостафина использовали пентаглицин или пентаглицин-содержащие субстраты, которые были помечены флуорофором и гасителем [19,20,184]. При ненарушенной структуре

субстратов гаситель и флуорофор сближены в пространстве и наблюдается гашение флуоресценции в результате Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET). При гидролизе субстрата гаситель и флуорофор разобщаются в пространстве и возникает флуоресценция, пропорциональная количеству расщеплённого субстрата [19,184]. По аналогичному принципу в ещё одном методе анализа использовали химически модифицированный флуоресцентным красителем химерный белок, в котором к N-концевым 57 а.о. колицина E9 с мутациями, формирующими пентаглициновый сайт для разрезания лизостафином через линкеры присоединен зеленый флуоресцентный белок [20]. Расщепление этого субстрата контролировали либо с помощью флуоресцентной спектроскопии, либо путем разделения продуктов расщепления на SDS-PAGE. При этом, в методологически близких исследованиях одного и того же белка – лизостафина – были получены значительно различающиеся данные. Так, при использовании в качестве субстрата меченного флуорофором и гасителем пентаглицина значения каталитических параметров составили  $K_M = 200\text{--}300$  мкМ при  $V_{\max} = 63\text{--}76$  пмоль\*с<sup>-1</sup>\*мг(Lst)<sup>-1</sup>, из которой можно вычислить значение  $k_{cat} = 0,0017\text{--}0,0021$  с<sup>-1</sup> [19]. Если вычислить значение соотношения каталитической эффективности  $k_{cat}/K_M$ , то оно составит 7,0–8,5 М<sup>-1</sup>\*с<sup>-1</sup> [19]. При использовании в качестве субстрата зеленого флуоресцентного белка с пентаглициновым линкером и ковалентно присоединённым флуоресцентным красителем были получены значения  $K_M = 65$  мкМ и  $V_{\max} = 10,1$  нМ\*с<sup>-1</sup>, что при преобразовании в  $k_{cat} = 0,05$  с<sup>-1</sup> дает соотношение  $k_{cat}/K_M = 777,0$  М<sup>-1</sup>\*с<sup>-1</sup> [20]. Данные методы были полезны при изучении специфичности последовательности расщепления лизостафина, но они существенно ограничены как крайне низкими концентрациями субстрата из-за проблем с его растворимостью, так и эффектом внутреннего фильтра, возникающим вследствие высокой оптической плотности реакционной среды [19,185]. Кроме того, существенным недостатком данного метода является необходимость получать химически модифицированные субстраты, что удорожает процесс проведения исследований, а также то, что фланкирование пентаглицина флуорофорами или объёмными белковыми доменами может непредсказуемо повлиять на наблюдаемый уровень активности лизостафина.

В другом подходе в качестве субстрата для действия лизостафина использовали N-ацетилированный гексаглицин [186]. Продукты гидролиза окрашивали при помощи хромогенной реакции с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой, которая реагирует со свободными аминогруппами пептидов. В результате гидролиза модифицированного гексаглицина образуются более короткие олигоглицины, при этом формируется новая свободная концевая аминогруппа и только она реагирует с окрашивающим агентом, поскольку

концевая аминогруппа на втором коротком олигоглицине приходит от исходного субстрата, а следовательно, защищена от действия 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты при помощи N-ацетилирования. В результате изменение окраски реакционной смеси свидетельствует о расщеплении исходного субстрата, а её интенсивность пропорциональна количеству окрашенного короткого олигоглицина, и, следовательно, и количеству расщеплённого субстрата. Однако в данном методе для приготовления раствора субстрата используют 1 мМ ЭДТА, которую никак из него впоследствии не удаляют. Кроме того, для получения стабильных воспроизводимых результатов в реакционной смеси субстрата и лизостафина присутствует порядка 0,5 мМ ЭДТА, что может оказывать влияние на наблюдаемый уровень активности цинк-зависимого лизостафина.

Также в литературе описан метод анализа активности лизостафина, основанный на использовании немодифицированного пентаглицина в качестве субстрата для каталитического расщепления при помощи лизостафина. Продукты реакции в виде ди- и триглициновых пептидов определяли с помощью ЯМР [36,37]. При использовании данного метода значение  $k_{cat}$  лизостафина по отношению к изолированному пентаглицину составило  $0,006 \text{ с}^{-1}$  [36]. Данный метод позволяет работать напрямую с субстратом, на который действует лизостафин, однако требует для своей реализации специальное дорогостоящее оборудование, а также некоторые специфические реагенты (такие как, например, тяжеловодородная вода). Кроме того, подготовка проб для проведения анализа представляет собой нетривиальный процесс, при этом задающий ряд ограничений на исследуемые образцы. Все это существенно ограничивает широкое применение этого метода для исследования каталитической активности лизостафина, а при проведении необходимых адаптаций и для исследования других лизинов. Применимость других методов также существенно ограничена требованиями к специализированному оборудованию и/или дорогостоящим модифицированным субстратам для проведения анализа. Кроме того, модифицированные субстраты могут значительно ограничивать возможность их использования, например, из-за низкой растворимости или неизвестного влияния на активность модифицирующих компонентов (например, большого белкового домена). В связи с этим желательна разработка простой и недорогостоящий метод исследования и численной оценки каталитической активности лизостафина с использованием немодифицированного субстрата. Адаптация такого метода для исследования каталитической активности других антибактериальных лизинов может существенно упростить разработку лекарственных препаратов нового поколения, способных бороться с антибиотикоустойчивыми штаммами патогенных бактерий, включая MRSA.

### 2.4.3 Влияние каталитического иона металла на активность лизоцина и других представителей семейства лизоцинов M23

Активным кофактором антибактериальных лизоцинов семейства M23 могут являться ионы не только цинка, но и других металлов, например, ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  или  $\text{Cu}^{2+}$  [36–39,45]. При этом лизоцины с ионами различных металлов демонстрируют различный уровень активности, как в экспериментах с использованием бактериальных клеток [37,45], так и в экспериментах с использованием синтетических изолированных субстратов [36–38]. Кроме того, не только замещение каталитического иона  $\text{Zn}^{2+}$  на другие металлы в активном центре лизоцинов семейства M23, но и связывание второго иона  $\text{Zn}^{2+}$  активным центром ферментов, существенно влияет на их активность [36,37].

Так, например, для стафилококкового автолизина LytU (гомолога каталитического домена лизоцина) проводили исследование его активности в присутствии ионов различных металлов с использованием интактных клеток *S. aureus* и изолированного пентаглицина в качестве субстрата [37]. При этом было показано значительное увеличение активности LytU при добавлении к белку ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$  (в 3,4 и в 8,1 раза относительно белка с ионом  $\text{Zn}^{2+}$ ). На активно делящихся клетках *S. aureus* и клетках в стационарной фазе было показано, что LytU обладает различным уровнем активности в присутствии ионов  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  [37]. Однако в данном исследовании ионы металлов добавляли непосредственно в реакционную смесь в эквимолярном количестве в экспериментах с использованием изолированного пентаглицина и в избытке (50 мкМ ионов металлов при 4 мкМ белка) в экспериментах с использованием бактериальных клеток. В этом же исследовании было показано, что активный центр LytU способен связывать второй ион  $\text{Zn}^{2+}$ , что приводит к снижению его активности. Кроме того было показано, что процесс связывания второго иона цинка является pH-зависимым, причём с повышением pH связывание второго иона цинка усиливается: при низком pH с активным центром белка связывается только один ион  $\text{Zn}^{2+}$ , при повышении pH до 5,2 примерно 50% белка связывает второй ион  $\text{Zn}^{2+}$  своим активным центром, а при pH больше 6,5 весь белок имеет в своем активном центре второй связанный ион  $\text{Zn}^{2+}$  [37]. В связи с этим, добавление ионов металлов в реакционную смесь при нейтральном pH в упомянутые выше экспериментах могло привести к связыванию второго иона металла активным центром, что могло повлиять на активность белка. Кроме того, сам белок содержит каталитические ионы  $\text{Zn}^{2+}$ , которые при проведении эксперимента из белка не удаляли, в связи с чем неизвестно, как и в какой степени добавленные ионы металлов взаимодействовали с активным центром LytU и ионами металлов в нём и, следовательно, как они могли повлиять на его активность.

Похожее исследование было проведено для лизостафина с использованием пентаглицина в качестве субстрата. В нём перед проведением экспериментов с добавлением ионов металлов к реакционной смеси у лизостафина отбирали все связанные с ним ионы металлов при помощи обработки ЭДТА с последующим добавлением ионов  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  в различных соотношениях [36]. При этом активность лизостафина в присутствии ионов  $\text{Mn}^{2+}$  в эквимольном соотношении и при трёхкратном избытке ионов металла практически не различались и составляла около 40% от активности лизостафина с эквимольным количеством ионов  $\text{Zn}^{2+}$ . Для ионов  $\text{Zn}^{2+}$  трёхкратный избыток ионов металла всего на 20% снижает активность лизостафина. При добавлении эквимольного количества ионов  $\text{Cu}^{2+}$  активность лизостафина незначительно отличалась от активности лизостафина с эквимольным количеством ионов  $\text{Zn}^{2+}$ , а при трёхкратном избытке активность лизостафина увеличилась в 1,8 раза. Также для лизостафина, как и для *LytU*, было показано, что связывание второго иона цинка ингибирует его активность [36]. Несмотря на удаление ионов металлов из активного центра лизостафина перед экспериментом при помощи ЭДТА, неизвестно, достаточно ли добавления эквимольного количества иона металла при проведении эксперимента для заполнения всего доступного количества обработанного ЭДТА белка ионами металла за время проведения эксперимента, а при добавлении трёхкратного избытка иона металла при  $\text{pH}=7,2$  высока вероятность встраивания в активный центр лизостафина ещё и второго иона металла, как было показано для *LytU*. В обеих ситуациях неизвестно, сколько ионов металлов находится в активном центре лизостафина и каким образом это связано с наблюдаемым уровнем активности лизостафина.

Сходные исследования проводили для другого представителя семейства антибактериальных лизинов M23, белка *LytM*<sub>185-316</sub> [38], который представляет собой гомолог каталитического домена лизостафина [37]. В данном исследовании для получения белка без ионов металлов его обрабатывали ЭДТА, а затем проводили диализ против буферного раствора с  $\text{pH} 7,5$  для удаления избытка ЭДТА и её комплексов с удалёнными из белка металлами. Однако затем проводили обратное встраивание различных ионов металлов с двукратным избытком ионов металлов относительно количества белка при  $\text{pH}=7,5$  в течение 1 ч при  $37^\circ\text{C}$ , в результате чего высока вероятность встраивания второго иона металла в активный центр *LytM* [38]. Для встраивания в активный центр *LytM* использовали ионы  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ . В качестве субстрата использовали N-(2,4-динитрофенил)-N-тетраглицин-этилендиамин – модифицированный по C-концу тетраглицин, который обладает жёлтой окраской и может быть количественно определен спектрофотометрически при  $\lambda = 360$  нм. При помощи метода тонкослойной хроматографии (ТСХ) было показано, что при таком способе обработки белка восстанавливается активность при добавлении ионов  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ , и

частично восстанавливается при добавлении ионов  $\text{Ni}^{2+}$ , но не восстанавливается при добавлении ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mg}^{2+}$  [38]. Таким же образом было показано, что добавление двукратного избытка тех же ионов металлов к необработанному ЭДТА LytM не приводит к существенным изменениям в активности белка. Однако в том же исследовании приведены результаты высокоэффективной жидкостной хроматографии продуктов реакции модифицированного тетраглицина и вариантов LytM с ионами  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ , которые демонстрируют, что активность LytM с ионами  $\text{Co}^{2+}$  восстанавливается на 63%, с ионами  $\text{Mn}^{2+}$  на 66%, а с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  на 22% от активности LytM с ионами  $\text{Zn}^{2+}$  [38]. То есть LytM с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  все же обладает каталитической активностью в отношении использованного в исследовании модифицированного тетраглицина, но которой недостаточно для выявления при использовании ТСХ. Также стоит упомянуть, что для LytM каталитические параметры составили соответственно  $k_{cat} = 0,003 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_M = 2,3 \text{ мМ}$  и  $k_{cat}/K_M = 1,2 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ .

Помимо сказанного выше стоит отметить, что указанные работы были посвящены исследованию пространственной структуры упомянутых антибактериальных лизинов, и приведённые результаты не являлись итогом систематического изучения соотношения каталитической активности лизостафина или его гомологов с их кумулятивной активностью, учитывающего влияние доменов, ответственных за связывание с пептидогликаном.

#### 2.4.4 Выделение и очистка лизостафина

Для выделения и очистки лизостафина и его доменов наиболее часто используют хроматографические сорбенты для ионообменной хроматографии [15,20,21,41,42,44]. Также активно применяют хроматографические сорбенты для аффинной металл-хелатной хроматографии с использованием сорбентов с ионами  $\text{Ni}^{2+}$  [47–49,51,52],  $\text{Co}^{2+}$  [45,46] или  $\text{Zn}^{2+}$  [19–21,52]. Кроме того, есть упоминания хроматографической очистки антибактериальных лизинов с использованием GST-аффинных сорбентов [36,37], а также примеры очистки с использованием гель-фильтрационной [21,36,52,187] и обращённо-фазовой хроматографии [187].

Особое внимание стоит уделить металл-хелатным аффинным хроматографическим сорбентам, поскольку с одной стороны они являются одними из наиболее популярных сорбентов для выделения лизостафина и его производных, а с другой стороны они содержат ионы различных металлов. Такие сорбенты отличаются по своим характеристикам и могут содержать ионы переходных металлов, например,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Ni}^{2+}$ , причём в зависимости от выбранного металла будет различаться сила удерживания иона металла на сорбенте (например, для связывания с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  достаточно одного остатка гистидина,

чего недостаточно для связывания с ионами  $\text{Co}^{2+}$  или  $\text{Ni}^{2+}$ ) [188]. При этом чем выше сила удерживания иона металла, тем ниже селективность сорбента, но тем больше его ёмкость. Кроме ионов металлов сорбенты для металл-хелатной аффинной хроматографии различаются металл-хелатными группами, которые ковалентно пришиты к частицам сорбента и непосредственно удерживают ионы металлов на них. Наиболее часто используют сорбенты, содержащие остатки иминодиуксусной кислоты (IDA). Данный хелатирующий агент формирует три координационные связи с ионом металла (две через кислород и одну через азот), что обеспечивает относительно слабое связывание иона металла, и, следовательно, более высокую селективность при меньшей ёмкости сорбента. Хелатирующая группа на основе нитрилтриуксусной кислоты (NTA) обладает дополнительной координирующей связью при помощи карбоксильного кислорода, что увеличивает силу удерживания иона металла и соответственно более слабое удержание белка на сорбенте. Существуют также и другие хелатирующие группы, относящиеся, как IDA и NTA, к карбоксиметилированным аминам, например, тетрадентатный карбоксиметиласпартат (CM-Asp), пентадентатный тетраметилепентамин (TEPA) или трис(карбоксиметил)этилендиамин (TED) [188] (рисунок 2.6). Помимо них используют функциональные группы, не относящиеся к карбоксиметилированным аминам. Например, к таким соединениям относятся бидентатный 8-гидроксихинолин (8-HQ) [188,189], тридентатные *O*-фосфосерин (OPS) и активный азокраситель «жёлтый светопроочный 2КТ» [188,190] (рисунок 2.7). Все эти хелатирующие группы обладают определённым сродством к ионам металлов, которые они удерживают на сорбенте для взаимодействия с молекулами белков. Однако в случае низкодентатных сорбентов и низко аффинных ионов металлов может возникнуть ситуация, когда аффинность белка к хелатированному иону металла окажется выше, чем аффинность хелатирующей группы сорбента, и в таком случае ион металла может перейти с сорбента к белку. Если таким белком окажется цинк-зависимый лизоцим, это может привести к замещению каталитического иона  $\text{Zn}^{2+}$  на ионы металла с сорбента и/или встраиванию второго иона металла в активный центр белка, что может повлиять на уровень его активности.

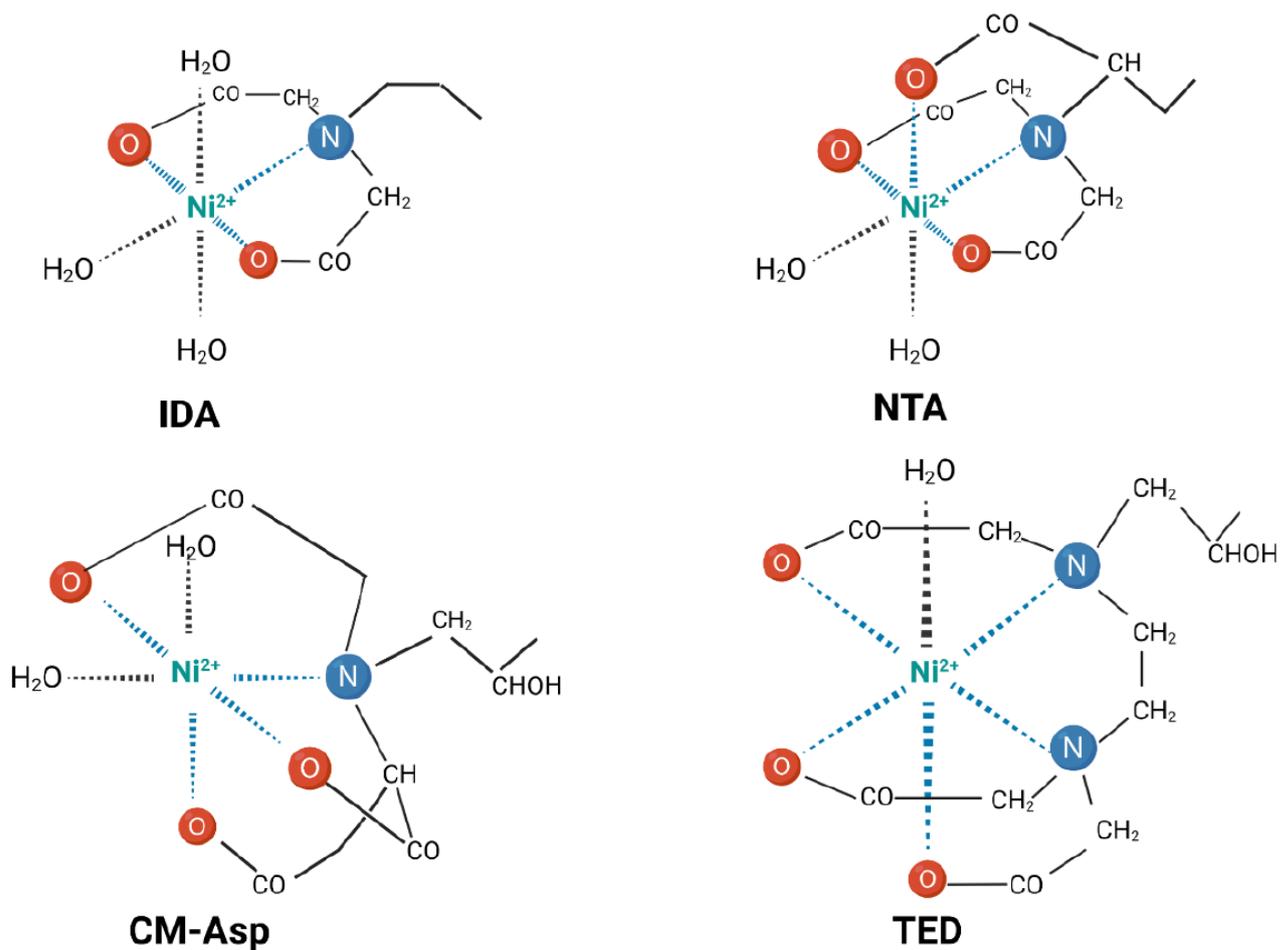


Рисунок 2.6 – Структуры некоторых основных хелатирующих групп, относящихся к группе карбоксиметилированных аминов.

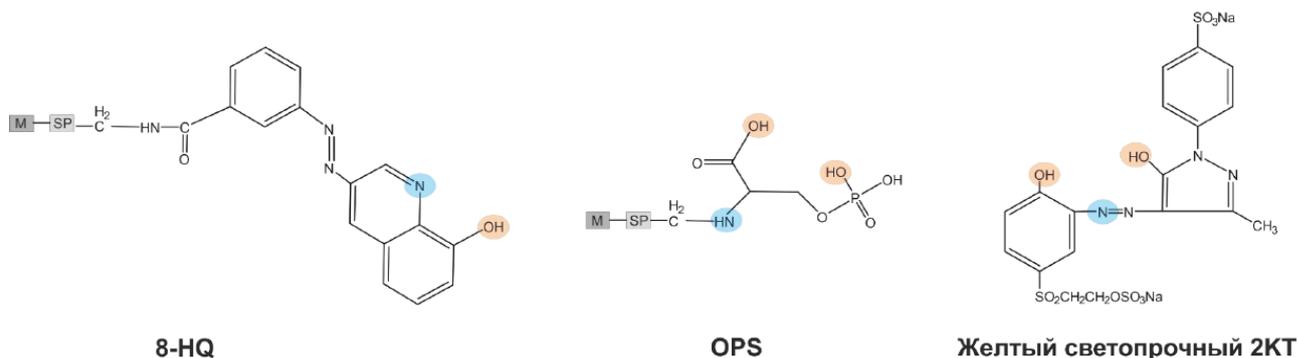


Рисунок 2.7 – Структуры хелатирующих групп, не относящихся к группе карбоксиметилированных аминов.

Например, было показано, что каталитический домен лизостафина, очищенный на никель-хелатном сорбенте, имеет резко сниженную каталитическую активность по сравнению с полноразмерным лизостафином, очищенным с помощью катионообменной хроматографии [191], что может свидетельствовать об изменении состава и/или количества каталитических

ионов металлов в активном центре лизоцима. Другие существующие данные об активности лизоцима были получены при помощи различных методов с использованием различных субстратов и выражены различными способами, а препараты белков были получены при помощи различных хроматографических методов (зачастую многостадийных [36,45,153]), что делает затруднительным формулирование каких-то определённых выводов о влиянии способа выделения лизоцима на его активность.

Таким образом, ранее систематически не изучалось влияние того или иного способа выделения рекомбинантного лизоцима на уровень его активности. Особенного внимания заслуживает исследование влияния на активность лизоцима хроматографических сорбентов для аффинной металл-хелатной хроматографии. Результаты такого исследования могут внести существенные изменения в существующие подходы к получению рекомбинантных антибактериальных лизоцимов.

### 3 Материалы и методы

#### 3.1. Материалы и оборудование

##### *Материалы:*

Агар-агар (AppliChem GmbH, Германия), NaCl (Диа-М, Россия), дрожжевой экстракт (Диа-М, Россия), бакто-пептон (Диа-М, Россия), ампициллин (ОАО «Синтез», Россия), бактериальная культура *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, США), фосфатный буферный раствор (рН 7,5, Диа-М, Россия), глицерин (Диа-М, Россия), изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (Helicon, Россия), лизоцим (Диа-М, Россия), тритон X-100 (MP Biomedicals, США), фенолметилсульфонил фторид (PMSF), (Sigma, США), MgCl<sub>2</sub> (Диа-М, Россия), бензоназа (Диа-М, Россия), WorkBeads 40S (Bio-works Technologies AB, Швеция), WorkBeads NiMAC (Bio-works Technologies AB, Швеция), WorkBeads 40 Ni-NTA (Bio-works Technologies AB, Швеция), WorkBeads 40 Ni-IDA (Bio-works Technologies AB, Швеция), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES) (Диа-М, Россия), набор маркеров Pierce Unstained Protein Ladder (14,4 - 116 кДа) (Thermo Scientific, США), додецилсульфат натрия (SDS, Диа-М, Россия), этиловый спирт (Диа-М, Россия), ледяная уксусная кислота (Диа-М, Россия), бромфеноловый синий (Диа-М, Россия), краситель Кумасси R 250 (Диа-М, Россия), набор BSA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США), диглицин (Sigma, США), триглицин (Sigma, США), пентаглицин (sc-471644A, Santa Cruz Biotechnology, США), нингидрин (Диа-М, Россия), диметилсульфоксид (ДМСО, Диа-М, Россия), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА, Диа-М, Россия), силикагель Sorbifil (фракция силикагеля 5–17 мкм, толщина функционального слоя 90–120 мкм) (Имид, Россия), клетки *S. aureus* ATCC 29213, сердечно-мозговой агар ВНИ (Sifin Diagnostics, Германия), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Германия), бычий сывороточный альбумин (BSA, Merck KGaA, Германия), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Merck KGaA, Германия), CaCl<sub>2</sub> (Merck KGaA, Германия), CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Merck KGaA, Германия), CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Merck KGaA, Германия), MgSO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Германия), MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (Merck KGaA, Германия), NiSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Merck KGaA, Германия), натрий-ацетатный буферный раствор (рН 4,0) (Merck KGaA, Германия), протеиназа К (Panreac/Applichem, Германия/Испания), микрококковая нуклеаза (N3755, Sigma, США), Трис-НСl (Merck KGaA, Германия), кристаллический фиолетовый (Merck KGaA, Германия), β-меркаптоэтанол (Ferak, Германия), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Германия), имидазол (Merck KGaA, Германия), центрифужные фильтры Amicon Ultra-4 10K (Merck Millipore, Ирландия).

### ***Оборудование:***

Водяная баня WB-4MS (Biosan, Латвия), денситометр Den-1B McFarland Densitometer (Biosan, Латвия), источник тока Эльф-8 (ДНК-Технология, Россия), камера для вертикального электрофореза (Helicon, Россия), ледогенератор кубикового льда СВ-184 (Brema, Италия), ламинарный шкаф (бокс) второго класса биозащиты Herasafe KS (Thermo Scientific, США), магнитная мешалка MR Hei-Mix S (Heidolph, Германия), микроскоп Axio Imager (Zeiss, Германия), микропланшетный спектрофотометр Multiscan FC (Thermo Scientific, США), спектрофотометр Ultrospec 1100 pro (Amersham Biosciences, Великобритания), вортекс для пробирок Heidolph Reax top (Heidolph, Германия), шейкер для пробирок Multi Reax (Heidolph, Германия), портативный pH-метр HI-8314 (Hanna Instruments, Германия), термостат ТВ-80-1 (MedLife, Германия), термостат твердотельный «Термит» (ДНК-Технология, Россия), термостатируемая качалка Environmental shaker-incubator Es-20/60 (Biosan, Латвия), хроматографическая система ÄKTA start (Cytiva, США), центрифуга Sigma 6k-15 (Sigma, Япония), центрифуга Sigma 8K (Sigma, Япония), центрифуга Heraeus Fresco 21 Refrigerated Micro Centrifuge (Thermo Scientific, США), электропоратор Micro Pulser и кюветы для электропорации (Bio-Rad, США), ультразвуковой гомогенизатор FS 250N (Henan Chuanghe Laboratory Equipment, Китай).

## 3.2 Методы<sup>1</sup>

### 3.2.1 Нарботка биомассы для выделения рекомбинантных белков

Плазмиды pL330 и pL908 для экспрессии рекомбинантного лизостафина без и с С-концевой гексагистидиновогой меткой (6xHis-tag) соответственно получены и любезно предоставлены с.н.с. лаборатории биологически активных наноструктур «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, к.б.н. Лящуком Александром Михайловичем.

Штаммы-продуценты вариантов рекомбинантного лизостафина без и с 6xHis-tag получали с помощью стандартной методики электропорации путем трансформирования компетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, США) плазмидами pL330 [192] и pL908 [193] соответственно. Нарботку биомассы штаммов-продуцентов проводили идентично следующим образом. Среду LB с добавлением 150 мкг/мл ампициллина использовали для культивации ночной культуры штамма-продуцента в течение 14-18 ч на термостатируемой качалке при 37°C и 90 об/мин. Ночную культуру использовали для инокуляции свежей среды LB с тем же антибиотиком, разделённой по 200 мл в колбы объёмом 500 мл (по 2 мл ночной культуры на колбу). Культуру инкубировали в течение 3 ч при 37°C, 180 об/мин и индуцировали синтез белка добавлением раствора изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозиды до конечной концентрации 0,25 мМ. После внесения индуктора культуру инкубировали ещё 3 ч при 37°C и 180 об/мин. Биомассу штамма-продуцента осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 10000 g. Супернатант сливали, клеточный осадок замораживали и хранили при -20°C.

---

<sup>1</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Grishin A.V., Lavrova N.V., Lyashchuk A.M., Strukova N.V., Generalova M.S., Ryazanova A.V., **Shestak N.V.**, Boksha I.S., Polyakov N.B., Galushkina Z.M., Soboleva L.A., Vetchinin S.S., Pavlov V.M., Karyagina A.S., Lunin V.G. The influence of dimerization on the pharmacokinetics and activity of an antibacterial enzyme lysostaphin.// *Molecules*. — 2019. — Vol. 24, № 1879. — P. 1—13. JIF (для WoS)=4.2, (1,50/0,27); Grishin A.V., **Shestak N.V.**, Lavrova N.V., Lyashchuk A.M., L.I. Popova, Strukova N.V., Generalova M.S., Ryazanova A.V., Polyakov N.B., Galushkina Z.M., Soboleva L.A., Boksha I.S., Karyagina A.S., Lunin V.G. Fusion of lysostaphin to an albumin binding domain prolongs its half-life and bactericidal activity in the systemic circulation.// *Molecules*. — 2019. — Vol. 24, № 2892. — P. 1—14. JIF (для WoS)=4.927, (1,62/0,42); Grishin A.V., Konstantinova S.V., Vasina I.V., **Shestak N.V.**, Karyagina A.S., Lunin V.G. A simple protocol for the determination of lysostaphin enzymatic activity.// *Antibiotics*. — 2020. — Vol. 9, № 917. — P. 1—10. JIF (для WoS)=4.3, (1,16/0,52); **Shestak N.V.**, Grishin A.V., Lyashchuk A.M., Lunin V.G., Karyagina A.S. The choice of chromatographic resin for the purification of recombinant lysostaphin affects its activity.// *Protein Expression and Purification*. — 2023. — Vol. 207, № 106274. — P. 1—6. JIF (для WoS)=1.4, (0,69/0,55).

### 3.2.2 Выделение рекомбинантного лизостафина без 6xHis-tag при помощи катионообменной хроматографии

Биомассу штамма-продуцента *E. coli* BL21 (DE3) [pL330] ресуспендировали в 50 мМ фосфатном буферном растворе (pH 7,5) с 50 мМ NaCl (отношение биомассы к объёму буферного раствора 1:10), затем добавляли к ней 1 мМ PMSF, 100 мкг/мл лизоцима, 0,1% (об./об.) Triton X-100, 2 мМ MgCl<sub>2</sub> и 40 ед./мл бензоназы. Полученную суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и обрабатывали четырёхсекундными импульсами с четырёхсекундными интервалами между ними в течение 4 мин с использованием ультразвукового гомогенизатора FS-250N (Henan Chuanghe Laboratory Equipment, Китай) с амплитудой 40%. Клеточный лизат центрифугировали при 10000 g и 10°C в течение 15 мин, осадок отбрасывали и снова центрифугировали надосадочную жидкость. Супернатант, полученный после второго центрифугирования, использовали для хроматографической очистки целевого рекомбинантного лизостафина при помощи катионообменной хроматографии.

Колонку с катионообменным сорбентом WorkBeads 40S (Bio-works Technologies AB, Швеция) уравнивали 50 мМ фосфатного буферного раствора, 50 мМ NaCl (pH 7,5) и наносили на неё супернатант после второго центрифугирования клеточного лизата, содержащий целевой рекомбинантный лизостафин без 6xHis-tag. Затем хроматографическую колонку промывали 10 объёмами 50 мМ фосфатного буферного раствора с 50 мМ NaCl (pH 7,5) и элюировали целевой белок градиентом 50–500 мМ NaCl в 50 мМ фосфатного буферного раствора (pH 7,5).

Фракции, содержащие целевой белок в максимальной концентрации с минимальным содержанием примесей, объединяли и проводили их диализ против 20 мМ HEPES (pH 7,5) в течение ночи при перемешивании на магнитной мешалке при 4°C, центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин, разделяли на аликвоты и хранили при -80°C.

### 3.2.3 Разрушение биомассы штамма-продуцента рекомбинантного лизостафина с 6xHis-tag и его осаждение при помощи сульфата аммония

Биомассу штамма-продуцента *E. coli* BL21 (DE3) [pL908] ресуспендировали в 50 мМ фосфатном буферном растворе (pH 7,5) с 50 мМ NaCl (отношение биомассы к объёму буферного раствора 1:10), затем добавляли к ней 1 мМ PMSF, 100 мкг/мл лизоцима, 0,1% (об./об.) Triton X-100, 2 мМ MgCl<sub>2</sub> и 40 ед./мл бензоназы. Полученную суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и обрабатывали четырёхсекундными импульсами с четырёхсекундными интервалами между ними в течение 4 мин с использованием ультразвукового гомогенизатора с амплитудой 40%. Клеточный лизат центрифугировали при

10000 g и 10°C в течение 15 мин, осадок отбрасывали и снова центрифугировали надосадочную жидкость. К супернатанту, полученному после второго центрифугирования, добавляли сухой  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до 40% насыщения, тщательно перемешивали суспензию до его растворения и инкубировали полученную смесь при комнатной температуре в течение 2 ч. Белки осаждали центрифугированием при 10000 g и 10°C в течение 20 мин.

3.2.4 Хроматографическая очистка рекомбинантного лизоцима с 6xHis-tag с использованием катионообменного сорбента

Осаждённые в соответствии с методикой 3.2.3 белки растворяли в 50 мМ фосфатном буферном растворе (pH 7,5) с 50 мМ NaCl. Для этого использовали объём буферного раствора равный объёму супернатанта после второго центрифугирования клеточного лизата, из которого при помощи  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  осаждали целевой рекомбинантный лизоцим с 6xHis-tag. Полученный раствор наносили на катионообменный сорбент WorkBeads 40S (Bio-works Technologies AB, Швеция) и уравновешенный тем же буферным раствором. После нанесения хроматографическую колонку промывали 5 объёмами буферного раствора и элюировали целевой белок градиентом 50-500 мМ NaCl в 50 мМ фосфатном буферном растворе (pH 7,5). Фракции, содержащие рекомбинантный лизоцим с 6xHis-tag с наименьшим количеством примесных белков, объединяли и обессоливали при помощи диализа против 20 мМ HEPES (pH 7,5) при перемешивании на магнитной мешалке при 4°C в течение ночи, центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин. Целевой белок в супернатанте концентрировали при помощи центрифужных фильтров Amicon Ultra-4 10K (Merck Millipore Ltd., Ирландия). Полученный раствор препарата рекомбинантного лизоцима с 6xHis-tag, выделенного при помощи катионообменного хроматографического сорбента (Lst-Cex), разделили на аликвоты и хранили при -80°C.

3.2.5 Хроматографическая очистка рекомбинантного лизоцима с 6xHis-tag с использованием металл-хелатных аффинных сорбентов

Хроматографическую очистку рекомбинантного лизоцима с 6xHis-tag проводили с использованием металл-хелатных аффинных сорбентов: WorkBeads NiMAC (Lst-NiMAC), WorkBeads 40 Ni-NTA (Lst-NTA), WorkBeads 40 Ni-IDA (Lst-IDA, Bio-works Technologies AB, Швеция), или Zn-NTA (Lst-NTA-Zn), полученный путем замены ионов никеля в WorkBeads 40 Ni-NTA ионами цинка в соответствии с протоколом производителя.

Осаждённые в соответствии с методикой 3.2.3 белки растворяли в 40 мМ имидазола с 100 мМ NaCl (pH 8,0). Для этого использовали объём буферного раствора равный объёму супернатанта после второго центрифугирования клеточного лизата, из которого при помощи

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  осаждали целевой рекомбинантный лизоафин с 6xHis-tag. Полученный раствор наносили на соответствующий металл-хелатный аффинный хроматографический сорбент, уравновешенный тем же буфером. После нанесения хроматографическую колонку сначала промывали 5 объемами того же буферного раствора, а затем 5 объемами буферного раствора, содержащего 40 мМ имидазола и 300 мМ NaCl (pH 8,0). Целевой белок элюировали градиентом имидазола 40-1000 мМ (pH 8,0) в присутствии 300 мМ NaCl. Фракции, содержащие рекомбинантный лизоафин с 6xHis-tag с наименьшим количеством примесей, объединяли и проводили диализ против 20 мМ HEPES (pH 7,5) при перемешивании на магнитной мешалке при 4°C в течение ночи, центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин и концентрировали на центрифужных фильтрах Amicon Ultra-4 10K (Merck Millipore Ltd., Ирландия). Полученные растворы препаратов рекомбинантного лизоафина с 6xHis-tag, выделенные при помощи металл-хелатных аффинных хроматографических сорбентов (Lst-NiMAC, Lst-NTA, Lst-IDA и Lst-NTA-Zn) делили на аликвоты и хранили при -80°C.

### 3.2.6 Электрофорез в полиакриламидном геле

Фракции, полученные в результате хроматографической очистки рекомбинантных белков, а также готовые препараты лизоафина анализировали методом электрофореза в денатурирующих условиях с SDS по методу Лэммли [194]. Электрофорез в ПААГ проводили с использованием 12% разделяющего и 5% концентрирующего полиакриламидного геля. В качестве маркеров молекулярных масс использовали набор белков Unstained Protein Molecular Weight Marker (14,4 - 116,0 кДа) (Biorad, США). Разделение проводили с помощью аппарата для электрофореза (Helicon, Россия) при силе тока 30 мА для концентрирующего геля и 45 мА для основного геля. Гель окрашивали в течение 10 мин в горячем растворе красителя (500 мг/л Кумасси R 250, 25% этилового спирта, 10% ледяной уксусной кислоты) и затем отмывали в смеси для отмывки (10% ледяной уксусной кислоты, 10% этилового спирта).

### 3.2.7 Определение концентрации лизоафина

Концентрацию лизоафина определяли с помощью коммерческого набора BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя.

### 3.2.8 Разработка метода определения каталитической активности лизоафина

В публикации [195] использовался промежуточный вариант метода определения каталитической активности лизоафина, который доработан при подготовке диссертации и приведен далее.

Раствор пентаглицина (sc-471644A, Santa Cruz Biotechnology, Inc., США) готовили путем

его суспендирования в воде Milli-Q в концентрации 5 мМ с последующим растворением при помощи нагревания при 99°C в течение 20 мин на водяной бане. Полученный раствор делили на аликвоты и хранили при -80°C. Перед экспериментом аликвоты пентаглицина размораживали при 99°C в течение 20 мин в твердотельном термостате «Термит» (ДНК-Технология, Россия) и охлаждали на воздухе до комнатной температуры.

Для определения каталитической активности лизостафина приготовили смесь, содержащую 4 мМ пентаглицина, 20 мМ HEPES (pH 7,5) и 5 мкМ лизостафина. Аналогичный раствор 4 мМ пентаглицина в 20 мМ HEPES (pH 7,5) без лизостафина выступал в качестве контроля самопроизвольного расщепления пентаглицина. Раствор 5 мкМ лизостафина в 20 мМ HEPES (pH 7,5) без пентаглицина выступал в качестве контроля влияния лизостафина на окраску реакционной смеси. Каждый раствор разделили на аликвоты объемом 20 мкл в микроцентрифужные пробирки объемом 0,5 мл по четыре на каждую временную точку и инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Пробы отбирали сразу после смешивания (пробы 0 ч) и через 8, 24, 32 и 48 ч после начала реакции. Для остановки реакции и сохранения отобранных проб для последующего анализа их замораживали при -80°C. После окончания эксперимента все полученные пробы окрашивали при помощи нингидрина. Для этого нингидрин (Диа-М, Россия) растворяли в ДМСО в концентрации 10% (масс./об.), делили на аликвоты и хранили при -20°C. Замороженные аликвоты реакционной смеси размораживали при 99°C в течение 10 мин и добавляли к ним по 100 мкл рабочего раствора нингидрина (0,4% (масс./об.) в смеси 80% ДМСО/20% воды, содержащей 20 мМ HEPES (pH 7,5)). Образцы тщательно перемешивали и инкубировали при 85°C в течение 15 мин. Затем их охлаждали до комнатной температуры, добавляли к ним по 200 мкл дистиллированной воды и тщательно перемешивали. По 100 мкл полученной смеси переносили в 96-луночный планшет и измеряли оптическую плотность при 595 нм с помощью микропланшетного спектрофотометра Multiscan FC (Thermo Scientific, США).

Также с использованием разработанного метода провели исследование каталитической активности лизостафина для смесей 4 мМ пентаглицина с 0, 1, 3 и 5 мкМ лизостафина, а также для 0, 2, 3 и 4 мМ пентаглицина с 5 мкМ лизостафина.

3.2.9 Использование разработанного метода определения каталитической активности для лизостафина с заведомо низкой каталитической активностью

Для определения каталитической активности лизостафина с заведомо низкой каталитической активностью рекомбинантный лизостафин обрабатывали 5 мМ ЭДТА в течение 3 ч при 37°C для удаления иона цинка из активного центра каталитического домена

лизостафина с последующим диализом против 20 мМ HEPES (pH 7,5) для удаления избытка ЭДТА. В качестве контроля аналогично обработали рекомбинантный лизостафин, но без добавления ЭДТА. Затем в соответствии с разработанным методом исследовали смесь 4 мМ пентаглицина с 3 мкМ контрольного и обработанного ЭДТА вариантов лизостафина и инкубировали в течение 30 ч с последующей окраской при помощи нингидрина. Отбор проб проводили сразу после смешивания (пробы 0 ч) и по окончании эксперимента (30 ч). Эксперимент повторили три раза.

### 3.2.10 Исследование реакции гидролиза пентаглицина лизостафином при помощи тонкослойной хроматографии

Контроль протекания реакции гидролиза пентаглицина лизостафином осуществляли при помощи ТСХ. ТСХ проводили на алюминиевой пластине с силикагелем Sorbifil (фракция силикагеля 5–17 мкМ, толщина функционального слоя 90–120 мкм, ООО «Имид», Россия) в смеси уксусной кислоты, н-бутанола и воды в соотношении 5:2:1. Пробы реакционной смеси, содержащей 4 мМ пентаглицина, 20 мМ HEPES (pH 7,5) и 5 мкМ лизостафина, отобранные сразу после смешивания (пробы 0 ч) и через 4, 8, 24, 32, 48 и 56 ч после начала реакции, размораживали при 99°C в течение 10 мин, охлаждали до температуры окружающей среды и наносили на ТСХ-пластину пять капель по 1 мкл, давая пластине высохнуть после нанесения каждой капли. После проведения хроматографии пластину для ТСХ погружали в 0,2% раствор нингидрина в этаноле и нагревали при 99°C для проявления окраски олигоглициновых пептидов.

### 3.2.11 Построение калибровочной кривой для пересчета оптической плотности окрашенной нингидрином реакционной смеси в количество нерасщеплённого пентаглицина и численная оценка каталитической активности лизостафина

Для пересчета оптической плотности окрашенной нингидрином реакционной смеси в количество нерасщеплённого пентаглицина использовали зависимость оптической плотности окрашенных нингидрином смесей олигоглицинов от количества пентаглицина в них. Поскольку интенсивность окраски реакционной смеси, окрашенной нингидрином, зависит от количества расщеплённого лизостафином пентаглицина и под действием лизостафина одна молекула пентаглицина расщепляется на одну молекулу диглицина и одну молекулу триглицина, то смешав в необходимой пропорции ди-, три- и пентаглицин можно имитировать процесс гидролиза пентаглицина под действием лизостафина. Для этого пентаглицин, диглицин и триглицин (Sigma, США) смешивали в соответствующих пропорциях для имитации процесса гидролиза пентаглицина с начальной концентрацией 4 мМ. При этом 4 мМ пентаглицина

имитирует начальные условия в реакционной смеси и не содержит ди- и триглицина. Конечный вариант реакционной смеси, имитирующий полный гидролиз исходного пентаглицина на ди- и триглицин, содержит 4 мМ диглицина и 4 мМ триглицина и не содержит пентаглицина. Промежуточные точки, имитирующие состояние реакционной смеси в некоторые моменты времени, содержат смесь ди-, три- и пентаглицина из расчета, что за каждый моль «расщепленного» пентаглицина, который не добавляется в смесь, в неё добавляют по 1 молю «продуцированного» ди- и триглицина (например, 3 мМ пентаглицина, 1 мМ диглицина и 1 мМ триглицина или 1,5 мМ пентаглицина, 2,5 мМ диглицина и 2,5 мМ триглицина). Точки калибровочной кривой были сформированы с шагом 0,5 мМ «расщепленного» пентаглицина. Полученные смеси олигоглицинов делили на аликвоты объемом 20 мкл, замораживали при -80°C, затем размораживали и окрашивали, как описано выше. В результате получили зависимость оптической плотности окрашенных нингидрином смесей олигоглицинов от количества пентаглицина в них.

Для численной оценки параметров каталитической реакции между пентаглициноном и лизостафином использовали зависимость концентрации нерасщепленного пентаглицина от времени, для описания которой подбирали значения параметров  $k_{cat}$  и  $K_M$  лизостафина для уравнения (3.1), полученного из уравнения Михаэлиса–Ментен для скорости ферментативной реакции при помощи скрипта на языке программирования Python с применением метода нелинейной регрессии.

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_{cat} \times E_0 \times \frac{[S]}{[S] + K_M}, \quad (3.1)$$

где  $[S]$  — концентрация пентаглицина, М;

$E_0$  — концентрация лизостафина, М;

$k_{cat}$  — каталитическая константа, с<sup>-1</sup>;

$K_M$  — константа Михаэлиса, М;

$t$  — время, с.

Для получения параметра каталитической эффективности  $k_{cat}/K_M$  рекомбинантного лизостафина использовали модуль Solver для программы Microsoft Excel и полученное упрощением уравнения (3.1) уравнение (3.2), которое трансформировали в экспоненциальное уравнение (3.3).

$$\frac{d[S]}{dt} = -E_0 \times \frac{k_{cat}}{K_M} \times [S] , \quad (3.2)$$

$$[S] = [S]_0 \times e^{-E_0 \times \frac{k_{cat}}{K_M} \times t} , \quad (3.3)$$

где  $[S]_0$  — начальная концентрация пентаглицина, М;

$k_{cat}/K_M$  — каталитическая эффективность,  $M^{-1} \cdot c^{-1}$ .

3.2.12 Сравнение каталитической активности лизостафина по отношению к пентаглицину, находящемуся в составе клеточной стенки бактерии, и к свободному пентаглицину

Для оценки каталитической активности лизостафина по отношению к пентаглицину, находящемуся в составе клеточной стенки стафилококка, измеряли скорость снижения мутности суспензий клеток стафилококка с разной исходной плотностью клеток под действием лизостафина. Для приготовления суспензии клеток *S. aureus* колонии *S. aureus* ATCC 29213, выращенные в течение ночи на сердечно-мозговом агаре ВНИ (Sifin Diagnostics GmbH, Германия), высевали в среду, содержащую 20 г/л пептона, 5 г/л NaCl и 2,5 г/л  $K_2HPO_4$ , и культивировали при 37°C и 110 об/мин в течение ночи. Клетки *S. aureus* осаждали центрифугированием при 1900 g в течение 5 мин, супернатант удаляли, клеточный осадок ресуспендировали в 20 mM HEPES, 150 mM NaCl (pH 7,5). Ресуспендированные клетки повторно осаждали центрифугированием при 1900 g в течение 5 мин, супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 20 mM HEPES, 150 mM NaCl (pH 7,5) с 0,1% (масс./об.) BSA до мутности бактериальной суспензии равной 8,0, 6,0, 4,0, 2,0 и 1,0 по МакФарланду с использованием денситометра Den-1B McFarland Densitometer (Biosan, Латвия). Каждую полученную клеточную суспензию переносили в 96-луночный планшет (по 180 мкл на лунку), добавляли 20 мкл 300 нМ раствора лизостафина в том же буферном растворе, и измеряли оптическую плотность реакционной смеси в течение 1 ч с интервалом в 1 мин при  $\lambda = 550$  нм с помощью микропланшетного спектрофотометра при 37°C и встряхивании между измерениями. В конечной реакционной смеси концентрация лизостафина составила 30 нМ.

Скорость просветления суспензии стафилококковых клеток при различной исходной плотности клеток была рассчитана путем аппроксимации кривых пятипараметрическим логистическим уравнением и определением значения скорости просветления клеточной суспензии в точке перегиба. Мутность в единицах по МакФарланду можно преобразовать в концентрацию бактериальных клеток из расчета, что 0,5 по МакФарланду соответствует  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Концентрацию бактериальных клеток *S. aureus*, в свою очередь,

преобразовывали в концентрацию поперечных мостиков пентаглицина, при условии, что на одну клетку приходится  $\approx 6 \times 10^5$  пентаглициновых мостиков [153]. Предполагая наличие прямой зависимости между количеством гидролизованного пентаглицина и лизисом клеток, полученные значения скоростей просветления клеточной суспензии аналогично преобразовывали в значения скоростей гидролиза поперечных мостиков пентаглицина и по их зависимости от исходной концентрации поперечных мостиков пентаглицина для уравнения Михаэлиса-Ментен (3.4) были определены кажущиеся каталитические параметры лизостафина: каталитическая константа  $k_{cat}$ , константа Михаэлиса  $K_M$  и каталитическая эффективность  $k_{cat}/K_M$  по отношению к пентаглицину, встроенному в клеточную стенку. Все расчеты проводились с помощью программы Microsoft Excel.

$$v = v_{max} \times \frac{[S]}{[S] + K_M}, \quad (3.4)$$

где  $v$  — скорость ферментативной реакции,  $M \cdot c^{-1}$ ;

$v_{max}$  — максимальная скорость ферментативной реакции равная  $k_{cat} \cdot E_0$ ,  $M \cdot c^{-1}$ .

### 3.2.13 Получение вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента

Для получения вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента раствор рекомбинантного лизостафина без 6xHis-tag смешивали с 1 М раствором HEPES (pH 7,5) до концентрации 20 мМ, и затем добавляли к нему 100 мМ раствор ЭДТА (pH 8,0) до концентрации 10 мМ. Полученный раствор инкубировали при 45°C в течение 1 ч и проводили его диализ против 20 мМ HEPES (pH 7,5) для удаления ЭДТА в течение ночи при перемешивании на магнитной мешалке при 4°C. Утром меняли буферный раствор на дистиллированную воду и проводили диализ ещё в течение суток, со сменой воды на свежую через 12 ч. Раствор лизостафина без ионов в активном центре белка центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин, супернатант после центрифугирования разделяли на аликвоты. Часть аликвот сохраняли при -80°C (вариант лизостафина Lst (EDTA)), а к остальным аликвотам добавляли натрий-ацетатный буферный раствор (pH 4,0) до концентрации 50 мМ для снижения pH раствора до 4,0 и добавляли 1 М раствор ZnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub> или NiSO<sub>4</sub> до конечной концентрации 5 мМ для встраивания в активный центр лизостафина соответственно ионов Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> или Ni<sup>2+</sup>. Полученные растворы инкубировали при 45°C в течение 1 ч и проводили их диализ против 50 мМ натрий-ацетатного буферного раствора в течение ночи при перемешивании на магнитной мешалке при 4°C для удаления избытка ионов металлов. Утром меняли буферный раствор на дистиллированную воду

и продолжали диализ растворов белков при перемешивании на магнитной мешалке при 4°C ещё сутки, со сменой воды на диализе на свежую через 12 ч. Полученные варианты лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента (соответственно Lst-Zn, Lst-Ca, Lst-Co, Lst-Cu, Lst-Mg, Lst-Mn и Lst-Ni) центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин, супернатанты разделяли на аликвоты и хранили при -80°C.

3.2.14 Определение каталитической активности вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента

Каталитическую активность вариантов лизостафина Lst (EDTA), Lst-Zn, Lst-Ca, Lst-Co, Lst-Cu, Lst-Mg, Lst-Mn и Lst-Ni исследовали и численно оценивали в соответствии с разработанным методом определения каталитической активности лизостафина с использованием изолированного пентаглицина в качестве субстрата при 4 мМ пентаглицина в 20 мМ HEPES (pH 7,5) и 1 мкМ белка. Эксперимент повторяли не менее трёх раз.

3.2.15 Выделение пептидогликановых оболочек

Пептидогликановые оболочки *S. aureus* (PG) выделяли с использованием стандартного подхода, который включает кипячение клеток стафилококка в растворе SDS с последующей обработкой нуклеазами и неспецифическими протеазами [196]. Культуру *S. aureus* ATCC 29213 культивировали в течение ночи при 37°C и 110 об/мин в пептонном бульоне (20 г/л пептона, 5 г/л NaCl, 2,5 г/л K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Клетки осаждали центрифугированием при 4000 g и 20°C в течение 5 мин, супернатант сливали, а клеточный осадок ресуспендировали в 20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 1% SDS (pH 7,5). Клеточную суспензию кипятили в течение 20 мин на магнитной мешалке с подогревом для лизиса клеток и денатурации белков, после чего при температуре окружающей среды суспензию перемешивали в течение ночи для выхода клеточного содержимого из PG. Полученные PG осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин, супернатант удаляли, а осаждённые PG ресуспендировали в 20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl и 1% SDS (pH 7,5). Затем PG осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин и ресуспендировали в 10 мМ Трис-HCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub> и 0,5% SDS (pH 8,0). Добавляли протеиназу К (Panreac/Applichem, Германия/Испания) до конечной концентрации 50 мкг/мл и инкубировали PG в течение ночи при 37°C и 110 об/мин для гидролиза белков, ковалентно связанных с пептидогликаном. Для удаления протеиназы К и SDS из суспензии PG десять раз повторяли цикл центрифугирования при 5000 g в течение 5 мин с последующим ополаскиванием осадка водой и ресуспендированием его в воде. После этого PG центрифугировали и ресуспендировали в 10 мМ Трис-HCl и 5 мМ CaCl<sub>2</sub> (pH 9,0). Для инактивации остаточной протеиназы К и стерилизации суспензии её нагревали до кипения на магнитной мешалке с подогревом при

постоянном перемешивании суспензии PG. Затем суспензию PG охлаждали до температуры окружающей среды и добавляли микрококковую нуклеазу (N3755, Sigma, США) до конечной концентрации 0,5 ед./мл. Для деградации ДНК и РНК PG инкубировали в течение 3 дней при 37°C и 100 об/мин. После этого PG промывали 3 раза водой с помощью их центрифугирования при 5000 g в течение 5 мин, промывания осадка дистиллированной водой и последующего ресуспендирования осадка в воде. После последней промывки PG ресуспендировали в воде, нагревали до кипения для инактивации остаточной нуклеазы, охлаждали, делили на аликвоты и хранили при -20°C.

### 3.2.16 Подготовка к эксперименту суспензии пептидогликановых оболочек

Для разрушения крупных агрегатов перед проведением эксперимента аликвоты PG размораживали и обрабатывали четырёхсекундными импульсами с четырёхсекундными интервалами между ними в течение 4 мин с использованием ультразвукового гомогенизатора FS-250N (Henan Chuanghe Laboratory Equipment, Китай) с амплитудой 40%. Контроль отсутствия агрегатов PG, а также соответствия PG по размеру и форме исходным клеткам *S. aureus* осуществляли при помощи микроскопа Axio Imager (Zeiss, Германия). Для этого по 10 мкл пробы суспензии PG до и после обработки ультразвуком наносили на предметное стекло, распределив пробы по его поверхности. Для получения образца суспензии интактных клеток *S. aureus* единичную колонию клеток с чашки Петри с агаром ВНИ переносили в 10 мкл стерильного 0,9% раствора NaCl, тщательно перемешивали и распределяли по поверхности предметного стекла. Образцы высушивали в стерильных условиях и фиксировали в пламени спиртовой горелки. Затем на зафиксированный образец для его окрашивания наносили 0,4% водный раствор кристаллического фиолетового, выдерживали в течение 2 мин и промывали дистиллированной водой. Окрашенные образцы исследовали в проходящем белом свете при итоговом увеличении x1000.

### 3.2.17 Определение пептидогликанолитической активности вариантов лизоафрина Lst-Zn или Lst (EDTA) с использованием пептидогликановых оболочек

Определение пептидогликанолитической активности вариантов лизоафрина Lst-Zn или Lst (EDTA) проводили с использованием суспензии PG. Для этого обработанную ультразвуком суспензию PG разводили в 20 mM HEPES, 150 mM NaCl (pH 7,5) с 0,1% (масс./об.) BSA до мутности равной 4,0 по МакФарланду. Затем в 96-луночной планшете к 180 мкл полученной суспензии PG добавляли по 20 мкл пробы анализируемого варианта лизоафрина Lst-Zn или Lst (EDTA) в том же буферном растворе с концентрацией белка равной 100, 50, 25 и 12,5 нМ в конечной реакционной смеси (по 3 повтора на каждую концентрацию каждого варианта

лизостафина). Оптическую плотность реакционной смеси измеряли в течение 1 ч с интервалом в 1 мин при  $\lambda = 550$  нм с помощью микропланшетного спектрофотометра при 37°C и встряхивании между измерениями. Эксперимент повторяли три раза.

### 3.2.18 Обработка пептидогликановых оболочек для удаления ионов металлов

Для удаления ионов металлов к обработанной ультразвуком суспензии PG добавляли раствор 1 М HEPES (pH 7,5) и 100 мМ ЭДТА (pH 8,0) до конечных концентраций, равных 20 мМ и 10 мМ соответственно, инкубировали при комнатной температуре при перемешивании на шейкере для пробирок Multi Reax (Heidolph, Германия) в течение 1 ч. Проводили диализ инкубированной суспензии против 20 мМ HEPES, 1 мМ ЭДТА (pH 7,5) в течение ночи на магнитной мешалке при 4°C. Утром заменяли буферный раствор для диализа на 20 мМ HEPES (pH 7,5), вечером заменяли буферный раствор для диализа на дистиллированную воду, а затем каждые 12 ч ещё трижды меняли воду для диализа на свежую. Обработанную ЭДТА суспензию PG (PGE) разделили на аликвоты и хранили при 4°C.

### 3.2.19 Обработка бычьего сывороточного альбумина для удаления ионов металлов

Аналогично обработке PG для удаления ионов металлов провели обработку BSA для удаления из него ионов металлов. Для этого к 10% раствору BSA добавили 1 М HEPES (pH 7,5) до 20 мМ и 100 мМ ЭДТА до 10 мМ, инкубировали при комнатной температуре с перемешиванием на шейкере для пробирок в течение 1 ч. Инкубированный раствор BSA диализовали в течение ночи на магнитной мешалке при 4°C против 20 мМ HEPES, 1 мМ ЭДТА (pH 7,5). Утром заменяли буферный раствор для диализа на 20 мМ HEPES (pH 7,5), вечером заменяли буферный раствор для диализа на дистиллированную воду, а затем каждые 12 ч ещё трижды меняли воду для диализа на свежую. Обработанный ЭДТА раствор BSA (BSA-E) делили на аликвоты и хранили при -20°C.

3.2.20 Адаптация метода определения пептидогликанолитической активности для вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента

Для адаптации метода определения пептидогликанолитической активности для вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента провели эксперименты по расщеплению вариантами лизостафина Lst-Zn и Lst (EDTA) суспензии PG и PGE с добавлением BSA или BSA-E. Для этого обработанную ультразвуком суспензию PG развели в 20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl (pH 7,5) с 0,1% (масс./об.) BSA или BSA-E до мутности равной 4,0 по МакФарланду. Для суспензии PGE приготовили аналогичные разведения в тех же буферных растворах. Действие различных концентраций вариантов лизостафина Lst-Zn или

Lst (EDTA), разведённых в 20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl (pH 7,5) с 0,1% (масс./об.) необходимого для каждой смеси BSA или BSA-E, изучали на каждом из полученных вариантов суспензии PG с BSA, PG с BSA-E, PGE с BSA и PGE с BSA-E. Для этого в 96-луночном планшете к 180 мкл разведённых суспензий PG и PGE добавляли по 20 мкл пробы анализируемого варианта лизоцифа Lst-Zn или Lst (EDTA) в соответствующих буферных растворах с концентрацией белка равной 100, 50, 25 и 12,5 нМ в конечной реакционной смеси (по 3 повтора на каждую концентрацию каждого варианта лизоцифа для каждого варианта смеси PG и PGE). Контролем выступал соответствующий буферный раствор без добавления белка. Оптическую плотность реакционной смеси измеряли в течение 1 ч с интервалом в 1 мин при  $\lambda = 550$  нм с помощью микропланшетного спектрофотометра при 37°C и встряхивании между измерениями.

### 3.2.21 Исследование и численная оценка пептидогликанолитической активности вариантов лизоцифа с ионами различных металлов в активном центре фермента

Исследование пептидогликанолитической активности вариантов лизоцифа Lst-Ca, Lst-Co, Lst-Cu, Lst-Mg, Lst-Mn, Lst-Ni, Lst-Zn и Lst (EDTA) проводили, как описано ранее, с использованием суспензии PGE в присутствии 0,1% (масс./об.) BSA-E. Концентрации каждого белка после смешивания с суспензией PGE в конечной реакционной смеси составляли 20, 10, 5 и 2,5 нМ для вариантов лизоцифа Lst-Ca, Lst-Co, Lst-Cu, Lst-Mg, Lst-Zn и Lst (EDTA); 160, 80, 40 и 20 нМ для варианта Lst-Mn и 40, 20, 10 и 5 нМ для варианта Lst-Ni (по 3 повтора на каждую концентрацию каждого варианта лизоцифа). Контролем выступал буферный раствор без добавления белка. Эксперимент повторили четыре раза.

Численно оценивали пептидогликанолитическую активность каждого варианта рекомбинантного лизоцифа с ионами различных металлов в активном центре фермента по скорости просветления суспензии PGE в присутствии BSA-E при 20 нМ белка. Для этого для каждой концентрации каждого варианта лизоцифа определяли соответствующую ей скорость просветления суспензии PGE в присутствии BSA-E. При высоких концентрациях активного рекомбинантного лизоцифа кривые зависимостей оптической плотности реакционной смеси от времени имели сигмовидную форму и их аппроксимировали пятипараметрической логистической кривой. За скорость просветления суспензии PGE ( $\Delta A_{550}/\text{мин}$ ) для таких кривых принимали величину их наклона в точке перегиба функции (определяемой как точка, в которой вторая производная пятипараметрической логистической функции равна нулю). При низких концентрациях и/или низкой активности фермента форма кривой зависимости оптической плотности реакционной смеси от времени приближается к прямой линии. В таком случае четко определить точку перегиба логистической функции не

представляется возможным, и такие кривые были аппроксимированы линейной функцией для расчета её наклона [179], который и принимали за скорость просветления суспензии PGE. При этом концентрации вариантов лизостафина были подобраны таким образом, чтобы скорость просветления суспензии PGE зависела линейно от концентрации белка в реакционной смеси.

По полученной зависимости скорости просветления суспензии PGE от концентрации варианта лизостафина рассчитывали скорость просветления PGE при 20 нМ соответствующего белка, из которой вычитали скорость естественного просветления суспензии PGE (усреднённый наклон контрольных кривых без добавления белка в реакционную смесь). Все расчеты проводились с помощью программы Microsoft Excel.

3.2.22 Исследование и численная оценка пептидогликанолитической активности вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента в присутствии соответствующих ионов металлов

Исследование пептидогликанолитической активности вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента проводили, как описано ранее, с использованием суспензии PGE в присутствии BSA-E, смешанной с 5 мМ, 1 мМ, 200 мкМ, 40 мкМ, 8 мкМ, 1,6 мкМ и 0 мкМ соответствующего иона металла. Контрольными образцами в данных экспериментах для каждого варианта лизостафина выступали варианты лизостафина Lst-Zn и Lst (EDTA), а также буферный раствор без добавления белка в аналогичных условиях, кроме Lst-Zn для которого контролями выступали только вариант лизостафина Lst (EDTA) и буферный раствор без добавления белка.

Для проведения данных экспериментов суспензию PGE развели в 20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl (pH 7,5) с 0,1% (масс./об.) BSA-E до мутности равной 4,0 – 4,1 по МакФарланду и разделили полученную суспензию на аликвоты. В аликвоты разведённой суспензии PGE внесли соответственно 1,1% (об./об.) 500 мМ, 100 мМ, 20 мМ, 4 мМ, 800 мкМ и 160 мкМ водного раствора CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub> или ZnSO<sub>4</sub> для добавления в реакционную смесь соответствующего иона металла. Контролем выступал вариант суспензии PGE с добавлением 1,1% воды (т.е. без добавления ионов металлов). Полученные варианты суспензий PGE тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин перед смешиванием в 96-луночном планшете 180 мкл инкубированной суспензии PGE с 20 мкл анализируемых проб. Анализируемые пробы в эксперименте представляли собой растворы варианта лизостафина с соответствующим ионом металла, контрольных вариантов лизостафина Lst-Zn и Lst (EDTA) в 20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl (pH 7,5) с 0,1% (масс./об.) BSA-E, а также буферный раствор без добавления белка. Концентрация вариантов лизостафина в конечной

реакционной смеси составила 50 нМ (по 3 повтора на каждую концентрацию иона металла для тестирования действия каждого из трёх вариантов лизоцифина и контрольного образца без добавления белка). Эксперимент повторили три раза.

Исследование пептидогликанолитической активности вариантов лизоцифина Lst-Co и Lst-Mn проводили, как описано ранее, с использованием PGE в присутствии BSA-E и с предварительным добавлением 200 мкМ соответствующих ионов металлов к суспензии PGE при концентрации белка равной 20, 10, 5 и 2,5 нМ (для Lst-Co) и 80, 40, 20 и 10 нМ (для Lst-Mn) в конечной реакционной смеси. Эксперимент повторили четыре раза. Аналогично численно оценивали их пептидогликанолитическую активность в присутствии 200 мкМ соответствующего иона металла в виде скорости просветления суспензии PGE в присутствии BSA-E и 200 мкМ ионов металлов при 20 нМ соответствующего белка.

3.2.23 Исследование и численная оценка бактериолитической активности рекомбинантного лизоцифина с ионами различных металлов в активном центре фермента

В публикациях [192,195] использовался промежуточный вариант метода определения и численной оценки бактериолитической активности рекомбинантного лизоцифина, который был впоследствии доработан при подготовке диссертации.

Исследование бактериолитической активности вариантов лизоцифина с ионами различных металлов в активном центре фермента проводили с использованием суспензии интактных клеток *S. aureus* в присутствии BSA-E.

Колонии *S. aureus* ATCC® 29213, выращенные в течение ночи на агаре ВНИ, использовали для инокуляции среды, содержащей 20 г/л пептона, 5 г/л NaCl и 2,5 г/л K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, которую культивировали при 37°C и 110 об/мин в течение ночи.

Из полученной культуры клетки *S. aureus* осаждали центрифугированием при 1900 g в течение 5 мин, супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl (pH 7,5). Ресуспендированные клетки повторно осаждали центрифугированием при 1900 g в течение 5 мин, супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl (pH 7,5) с 0,1% (масс./об.) BSA-E и разводили в том же буферном растворе до мутности бактериальной суспензии равной 4,0 по МакФарланду. Затем в 96-луночном планшете к 180 мкл полученной клеточной суспензии добавляли 20 мкл анализируемых проб (по 3 повтора на каждую концентрацию каждого варианта лизоцифина). Анализируемые пробы представляют собой растворы вариантов лизоцифина в том же буферном растворе с различными концентрациями белка. После смешивания анализируемых

проб с клеточной суспензией концентрации белков в реакционной смеси составили соответственно 20, 10, 5 и 2,5 нМ для вариантов лизостафина Lst-Ca, Lst-Co, Lst-Cu, Lst-Mg, Lst-Zn и Lst (EDTA), и 40, 20, 10 и 5 нМ для вариантов лизостафина Lst-Mn и Lst-Ni. Оптическую плотность реакционной смеси измеряли в течение 1 ч с интервалом в 1 мин при  $\lambda = 550$  нм с помощью микропланшетного спектрофотометра при 37°C и встряхивании между измерениями.

Численную оценку бактериолитической активности вариантов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента проводили аналогично оценке их пептидогликанолитической активности и выражали её в виде скорости просветления клеточной суспензии *S. aureus* в присутствии BSA-E при 20 нм соответствующего белка.

### 3.2.24 Исследование и численная оценка бактериолитической активности вариантов лизостафина Lst-Co и Lst-Mn в присутствии соответствующих ионов металлов

Исследование бактериолитической активности вариантов лизостафина Lst-Co и Lst-Mn в присутствии соответствующих ионов металлов провели аналогично исследованию их пептидогликанолитической активности в сходных условиях (PGE заменили на интактные клетки *S. aureus*) с использованием в качестве контролей вариантов Lst-Zn и Lst (EDTA) и буферного раствора без добавления белка.

Для этого к суспензии интактных клеток *S. aureus* разведённых до мутности 4,0 по МакФарланду в 20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl (pH 7,5) с 0,1% (масс./об.) BSA-E предварительно добавили  $\text{CoCl}_2$  (ионы  $\text{Co}^{2+}$ ) или  $\text{MnCl}_2$  (ионы  $\text{Mn}^{2+}$ ) до 1 мМ, 200 мкМ, 40 мкМ, 8 мкМ, 1,6 мкМ и 0,32 мкМ. Концентрация вариантов лизостафина в конечной реакционной смеси составила 50 нМ (по 3 повтора на каждую концентрацию иона металла для тестирования действия каждого из трёх вариантов лизостафина и контрольных образцов без добавления белка). Эксперимент повторили три раза.

Аналогично для вариантов лизостафина Lst-Co и Lst-Mn провели исследование бактериолитической активности с использованием суспензии интактных клеток *S. aureus* в присутствии BSA-E и с добавлением 1,6 мкМ ионов  $\text{Co}^{2+}$  и 8 мкМ ионов  $\text{Mn}^{2+}$  соответственно при концентрациях белков равных 20, 10, 5 и 2,5 нМ (Lst-Co) и 80, 40, 20 и 10 нМ (Lst-Mn). Эксперимент повторили три раза. Численно оценивали бактериолитическую активность вариантов рекомбинантного лизостафина Lst-Co и Lst-Mn в присутствии 1,6 мкМ ионов  $\text{Co}^{2+}$  и 8 мкМ ионов  $\text{Mn}^{2+}$  по скорости просветления суспензии интактных клеток *S. aureus* в присутствии BSA-E и в присутствии 1,6 мкМ ионов  $\text{Co}^{2+}$  и 8 мкМ ионов  $\text{Mn}^{2+}$  при 20 нм соответствующего белка.

3.2.25 Исследование и численная оценка каталитической и бактериолитической активности препаратов рекомбинантного лизоцифина с 6xHis-tag, выделенных с использованием различных хроматографических сорбентов

Исследование каталитической активности препаратов рекомбинантного лизоцифина с 6xHis-tag, выделенных с использованием различных хроматографических сорбентов, (до и после восстановления их активности) проводили в соответствии с разработанным методом определения каталитической активности лизоцифина с использованием 4 мМ пентаглицина и 1 мкМ белка и выражением численной оценки их каталитической активности в виде каталитической эффективности  $k_{cat}/K_M$ . Эксперимент повторили от четырёх до шести раз.

Исследование бактериолитической активности препаратов рекомбинантного лизоцифина с 6xHis-tag, выделенных с использованием различных хроматографических сорбентов, (до и после восстановления их активности) проводили в соответствии с разработанным методом определения бактериолитической активности лизоцифина с использованием суспензии интактных клеток *S. aureus* в присутствии 0,1% (масс./об.) BSA и концентрациями препаратов лизоцифина в конечной реакционной смеси 20, 10, 5 и 2,5 нМ для всех препаратов лизоцифина, кроме препаратов Lst-NTA и Lst-IDA до восстановления их активности, для которых концентрации составили 80, 40, 20 и 10 нМ соответственно. Контролем выступал буферный раствор без добавления белка. Эксперимент повторили от трёх до шести раз.

Численную оценку бактериолитической активности препаратов рекомбинантного лизоцифина с 6xHis-tag, выделенных с использованием различных хроматографических сорбентов, (до и после восстановления их активности) проводили в соответствии с разработанным методом определения бактериолитической активности лизоцифина и выражали в виде скорости просветления суспензии интактных клеток *S. aureus* в присутствии BSA при 20 нм соответствующих белков.

### 3.2.26 Восстановление активности рекомбинантного лизоцифина

Для восстановления каталитической активности раствор рекомбинантного лизоцифина (концентрация 0,5-2,0 мг/мл) в 20 мМ HEPES (pH 7,5) смешивали с 100 мМ раствором ЭДТА (pH 8,0) до конечной концентрации ЭДТА равной 25 мМ. Полученный раствор инкубировали при 45°C в течение 1 ч и проводили диализ против 20 мМ HEPES (pH 7,5) для удаления ЭДТА. После этого добавляли ZnSO<sub>4</sub> до конечной концентрации 25 мМ и снижали pH до 4,0 добавлением 1 М натрий-ацетатного буферного раствора (pH 4,0) до концентрации 50 мМ. Полученный раствор инкубировали при 45°C в течение 1 ч, и проводили диализ сначала в

течение ночи на магнитной мешалке при 4°C против 50 мМ натрий-ацетатного буферного раствора для удаления избытка цинка. Утром меняли буферный раствор для диализа на 20 мМ HEPES (pH 7,5), а затем каждые 12 ч ещё дважды меняли буферный раствор для диализа на свежий раствор 20 мМ HEPES (pH 7,5). Полученный препарат лизостафина с восстановленной активностью центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин, супернатант разделяли на аликвоты и хранили при -80°C.

### 3.2.27 Статистический анализ

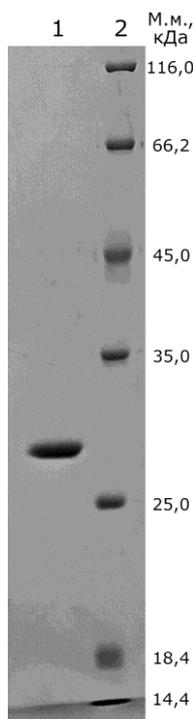
Статистический анализ экспериментальных данных проводили в программе Excel (Microsoft, США) с надстройкой Real Statistics Resource Pack (Charles Zaiontz, [real-statistics.com](http://real-statistics.com)) с использованием однофакторного дисперсионного анализа с постобработкой по Тьюки. Различия считались значимыми при  $p$ -значении  $<0,01$  при изучении влияния хроматографического сорбента на активность лизостафина и при  $p$ -значении  $<0,05$  в остальных случаях.

## 4 Результаты и их обсуждение

### 4.1 Разработка метода определения каталитической активности лизостафина с использованием пентаглицина<sup>2</sup>

#### 4.1.1 Получение рекомбинантного белка лизостафина из *S. simulans*

Разработку метода определения каталитической активности лизостафина проводили с использованием рекомбинантного лизостафина из *S. simulans*, полученного с помощью стандартных биоинженерных подходов и выделенного ионообменной хроматографией с использованием катионообменного сорбента WorkBeads 40S (Bio-works Technologies AB, Швеция). Чистота полученного препарата лизостафина составляет >95% (рисунок 4.1), выход белка составляет около 6 мг белка из 1 г биомассы штамма-продуцента.

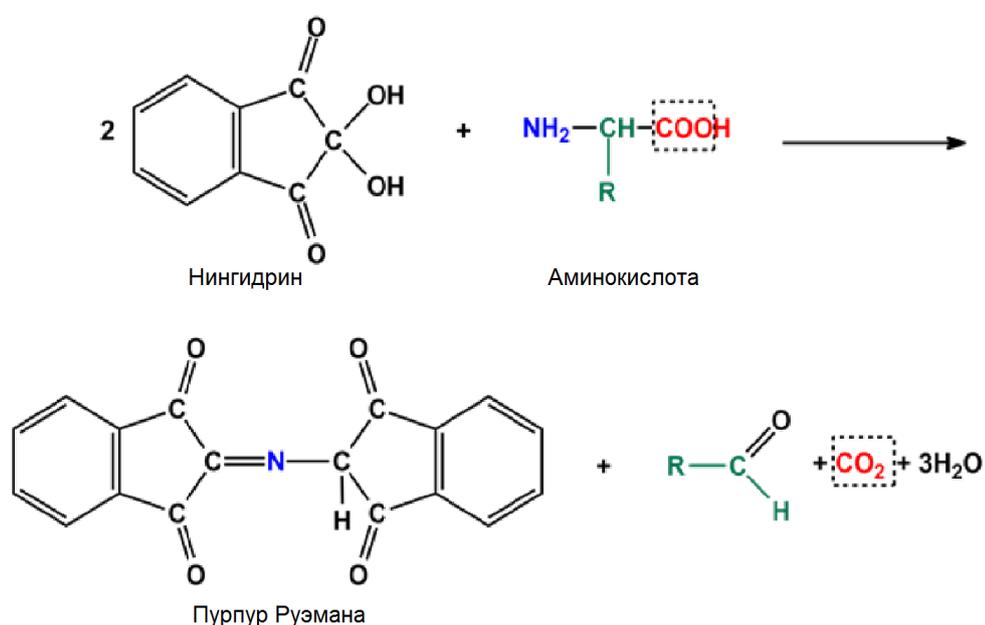


**Рисунок 4.1** – Анализ чистоты препарата рекомбинантного лизостафина при помощи электрофореза в 12% ПААГ. (1) – Препарат рекомбинантного лизостафина; (2) – Маркер молекулярных масс Unstained Protein Molecular Weight Marker (14,4 - 116,0 кДа).

<sup>2</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Grishin A.V., Konstantinova S.V., Vasina I.V., **Shestak N.V.**, Karyagina A.S., Lunin V.G. A simple protocol for the determination of lysostaphin enzymatic activity.// Antibiotics. — 2020. — Vol. 9, № 917. — P. 1—10. JIF (для WoS)=4.3, (1,16/0,52).

#### 4.1.2 Разработка метода определения каталитической активности лизостафина с использованием пентаглицина в качестве субстрата и хромогенной реакции с нингидрином

Каталитический домен лизостафина расщепляет пентаглициновый пептид между вторым и третьим или третьим и четвертым остатками глицина [19], в обоих случаях образуя ди- и триглициновые пептиды (рисунок 2.5). Поскольку каждая молекула ди-, три- или пентаглицина имеет N-концевую аминогруппу, общее количество аминогрупп в реакционной смеси увеличивается на одну для каждой расщеплённой молекулы пентаглицина. Это увеличение числа аминогрупп можно обнаружить при помощи хромогенной реакции нингидрина со свободными аминогруппами аминокислот и пептидов с образованием сине-фиолетового пурпура Руэмана (рисунок 4.2). Эффект дополнительно усиливается более эффективной реакцией нингидрина с пептидами при уменьшении их длины.



**Рисунок 4.2 – Схема хромогенной реакции концевой аминогруппы  $\alpha$ -аминокислоты с нингидрином.**

В результате проведённых предварительных изысканий были подобраны условия, обеспечивающие стабильно воспроизводимые результаты анализа активности рекомбинантного лизостафина с использованием пентаглицина в качестве субстрата и хромогенной реакции между нингидрином и оставшимся пентаглицином и продуктами реакции в форме ди- и триглицина. Также был определен способ численной оценки каталитической активности лизостафина (см. пункт 4.1.4), выраженный в виде каталитической эффективности  $k_{cat}/K_M$ , определенной из уравнения Михаэлиса-Ментен, описывающего полученные экспериментальные данные.

Протокол разработанного метода включает в себя:

I) Получение проб для изучения протекания реакции между пентаглицином и лизостафином:

- 1) Приготовить 5 мМ исходный раствор пентаглицина в воде путем нагревания суспензии порошка пентаглицина при 99°C в течение 20 мин.
- 2) Смешать исходный раствор пентаглицина, необходимый исходный буферный раствор и исходный раствор лизостафина.
- 3) Разделить реакцию смесь на аликвоты по 20 мкл в микроцентрифужные пробирки объёмом 0,5 мл, и инкубировать аликвоты при температуре 37°C. В необходимые моменты времени переместить аликвоты в морозильную камеру при температуре -80°C для остановки реакции и сохранения образцов для последующего анализа.

II) Анализ полученных проб реакционной смеси:

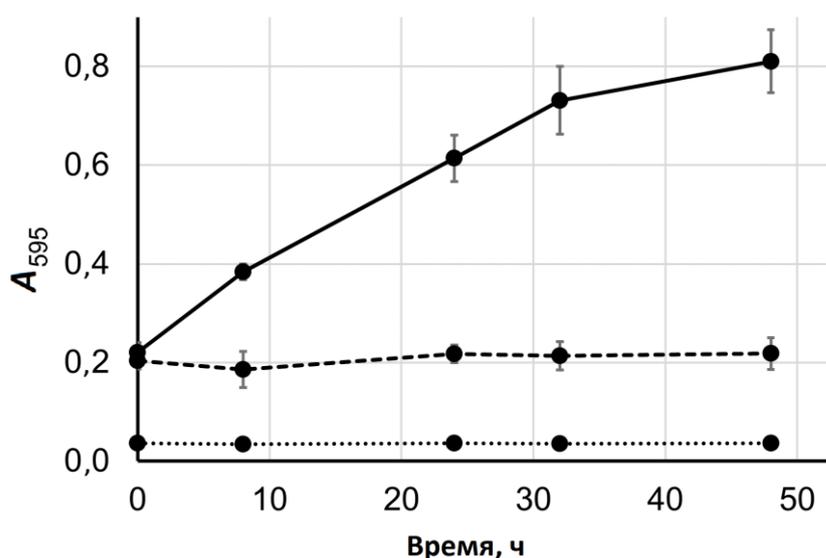
- 4) Разморозить пробы для анализа при комнатной температуре, прогреть их при 99°C в течение 10 мин, добавить 100 мкл 0,4% нингидрина в 20 мМ HEPES (pH 7,5) в смеси 80% ДМСО/20% воды и тщательно перемешать при помощи вортекса.
- 5) Инкубировать образцы при 85°C в течение 15 мин. Цвет образцов должен стать голубым.
- 6) Охладить образцы до комнатной температуры, добавить 200 мкл воды и тщательно перемешать при помощи вортекса. Цвет образцов должен стать фиолетовым.
- 7) Перенести по 100 мкл каждого образца в лунки 96-луночного планшета и измерить оптическую плотность при 595 нм с помощью микропланшетного спектрофотометра.

III) Численная оценка параметров каталитической реакции между пентаглицином и лизостафином:

- 8) Пересчитать при помощи калибровочной кривой оптическую плотность реакционной смеси, окрашенной нингидрином, в оставшееся количество пентаглицина в растворе для каждой временной точки.
- 9) Описать полученную зависимость количества непрореагировавшего пентаглицина в растворе от времени при помощи экспоненциальной зависимости.
- 10) Определить значение каталитической эффективности  $k_{cat}/K_m$ .

#### 4.1.3 Применимость разработанного метода определения каталитической активности лизостафина с использованием пентаглицина в качестве субстрата и хромогенной реакции с нингидрином

Для изучения пригодности разработанного метода для определения каталитической активности лизостафина проанализировали смесь 4 мМ пентаглицина с 5 мкМ лизостафина. Аналогичный раствор 4 мМ пентаглицина без лизостафина выступал в качестве контроля самопроизвольного расщепления пентаглицина. Раствор 5 мкМ лизостафина (без пентаглицина) выступал в качестве контроля влияния лизостафина на окраску реакционной смеси. Результаты зависимости оптической плотности реакционной смеси, окрашенной нингидрином, от времени для этих смесей представлены на рисунке 4.3.

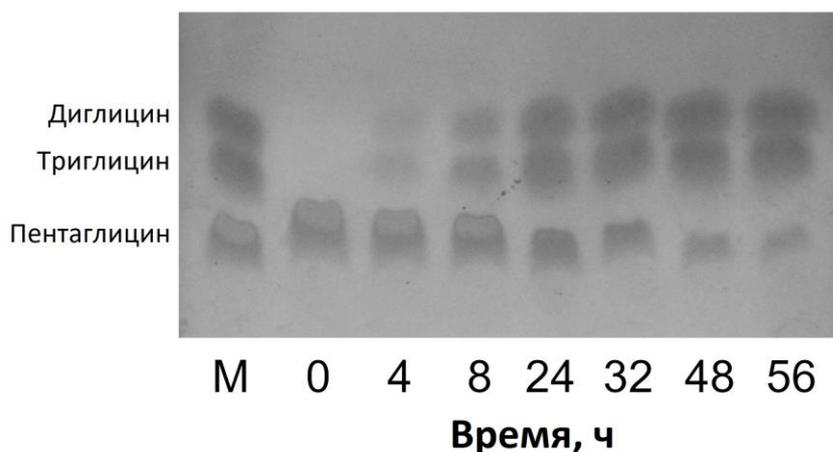


**Рисунок 4.3 – Гидролиз пентаглицина лизостафином, контролируемый хромогенной реакцией с нингидрином.** Смесь 4 мМ пентаглицина в 20 мМ HEPES (pH 7,5) с 5 мкМ лизостафина (сплошная линия) или без лизостафина (штриховая линия), и раствор 5 мкМ лизостафина (без пентаглицина) в 20 мМ HEPES (pH 7,5) (пунктирная линия). Показаны средние результаты шести (5 мкМ лизостафина), двух (без лизостафина) или одного (без пентаглицина) независимых экспериментов; планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

В присутствии лизостафина за 48 ч оптическая плотность смеси пентаглицина с лизостафином увеличилась с  $0,220 \pm 0,020$ , что соответствует 4 мМ не гидролизованного пентаглицина, до  $0,810 \pm 0,064$  (рисунок 4.3, сплошная линия). Напротив, оптическая плотность пентаглицина в отсутствие лизостафина не менялась с течением временем (рисунок 4.3, штриховая линия). При этом непосредственно лизостафин не влиял на интенсивность окраски — в отсутствие пентаглицина оптическая плотность лизостафина не отличалась от оптической

плотности пустых лунок и не менялась со временем (рисунок 4.3, пунктирная линия).

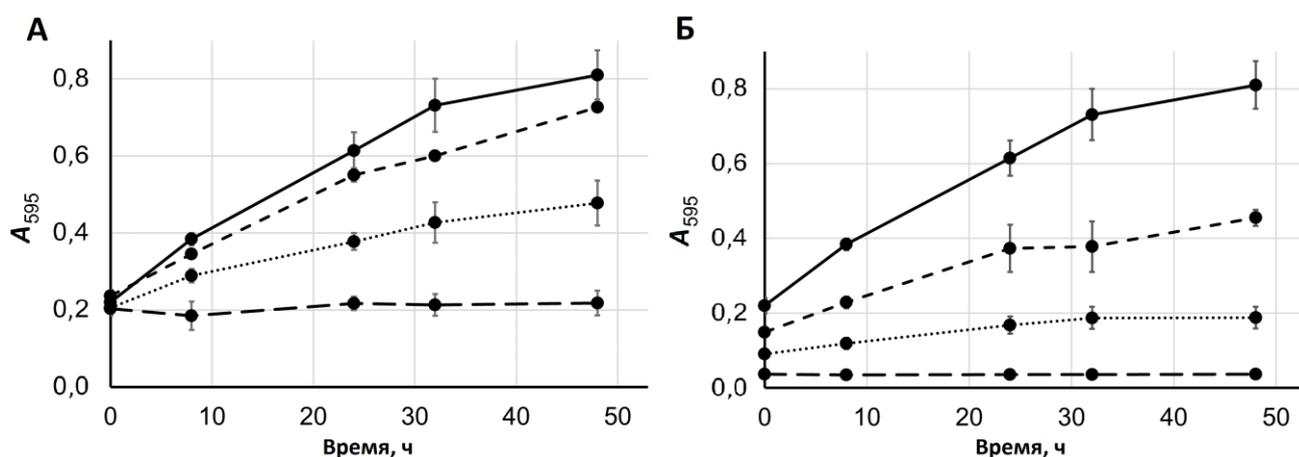
Чтобы убедиться, что увеличение интенсивности окраски действительно было связано с расщеплением пентаглицина на ди- и триглицин, пробы смеси 4 мМ пентаглицина с 5 мкМ лизостафина, после инкубации при 37°C в течение различных промежутков времени проанализировали с помощью тонкослойной хроматографии в смеси уксусной кислоты, н-бутанола и воды в соотношении 5:2:1 и окраски нингидрином (рисунок 4.4). Маркером выступала смесь 3 мМ ди-, три- и пентаглицина. Согласно полученным данным количество пентаглицина уменьшалось (уменьшение интенсивности окраски части пробы, соответствующей пентаглицину), а количество ди- и триглицина увеличивалось по мере протекания реакции (увеличивалась интенсивность окраски частей пробы, соответствующей ди- и триглицину), что соответствует увеличению интенсивности окраски образцов, обработанных нингидрином. Незначительные отклонения по длинам пробега пентаглицина, возникшие, вероятно, из-за того, что анализируемые пробы были нанесены не ровно на одну линию, не мешают качественно оценить степень протекания реакции между пентаглицинном и лизостафином при помощи окраски проб нингидрином.



**Рисунок 4.4 – Анализ протекания гидролиза пентаглицина под действием лизостафина с помощью тонкослойной хроматографии. М – маркер (смесь 3 мМ ди-, три- и пентаглицина).**

Для того, чтобы показать, что разработанный метод способен определять скорость протекания реакции между пентаглицинном и лизостафином, 4 мМ пентаглицина инкубировали с 1, 3 и 5 мкМ лизостафина или без добавления лизостафина в течение 48 ч. Исследование интенсивности окраски обработанных нингидрином образцов представлено на рисунке 4.5 (А) и показывает, что увеличение концентрации лизостафина приводит к более высокой скорости реакции между пентаглицинном и лизостафином. А именно, отсутствует изменение оптической плотности без добавления лизостафина, а в присутствии лизостафина скорость реакции в течение первых 8 ч составила  $0,0104 \pm 0,0031$  (3)  $\Delta A_{595} \cdot \text{ч}^{-1}$  при 1 мкМ белка,

$0,0176 \pm 0,0070$  (3)  $\Delta A_{595} \cdot \text{ч}^{-1}$  при 3 мкМ лизостафина и  $0,0204 \pm 0,0035$  (6)  $\Delta A_{595} \cdot \text{ч}^{-1}$  при 5 мкМ лизостафина. Здесь и далее приведены данные, усреднённые по нескольким независимым экспериментам вместе с полученными значениями стандартных отклонений. В скобках приведено количество проведённых независимых экспериментов. При этом разница между скоростями реакции при трёх концентрациях лизостафина была статистически значимой (при однофакторном дисперсионном анализе  $p$ -значение = 0,034).



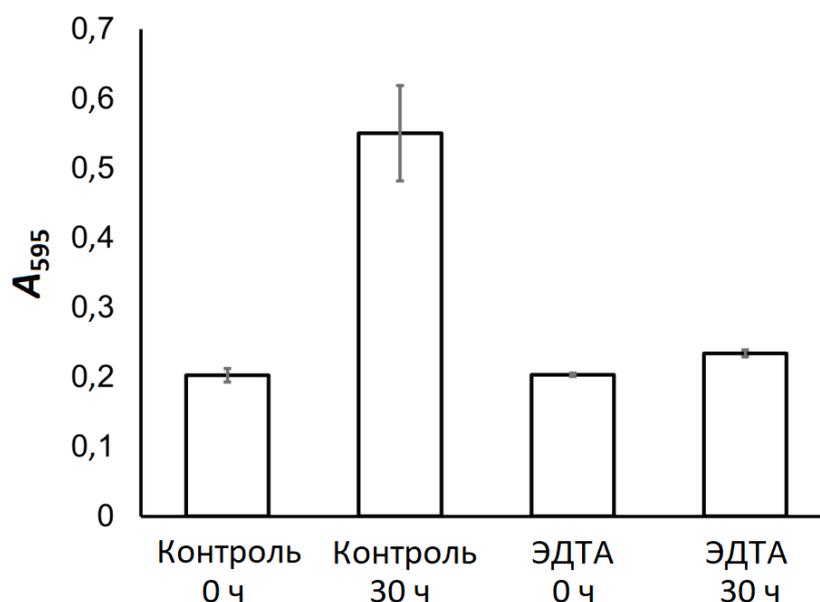
**Рисунок 4.5 – Зависимость скорости расщепления пентаглицина от концентрации лизостафина и пентаглицина.** (А) Смесь 4 мМ пентаглицина в 20 мМ НЕРЕС, (рН 7,5) с 1 мкМ (пунктирная линия), 3 мкМ (линия с коротким штрихом) или 5 мкМ (сплошная линия) лизостафина или без лизостафина (линия с длинным штрихом). Показаны средние результаты шести (5 мкМ лизостафина), трёх (1 и 3 мкМ лизостафина) и двух (без лизостафина) независимых экспериментов; планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение; (Б) Смесь 0 мМ (линия с длинным штрихом), 2 мМ (пунктирная линия), 3 мМ (линия с коротким штрихом) или 4 мМ (сплошная линия, как на рисунке 4.3) пентаглицина в 20 мМ НЕРЕС, (рН 7,5) с 5 мкМ лизостафина. Показаны средние результаты шести (4 мМ пентаглицина), трёх (2 и 3 мМ пентаглицина) и одного (без пентаглицина) независимых экспериментов; планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

При инкубировании 5 мкМ лизостафина с различными концентрациями пентаглицина (рисунок 4.5 (Б)), как и ожидалось, начальная и максимальная интенсивность окраски, а также начальная скорость реакции увеличивались одновременно с увеличением исходной концентрации пентаглицина. При этом скорость реакции в течение первых 8 ч составила  $0,0036 \pm 0,0007$  (3)  $\Delta A_{595} \cdot \text{ч}^{-1}$  при 2 мМ пентаглицина и  $0,0099 \pm 0,0006$  (3)  $\Delta A_{595} \cdot \text{ч}^{-1}$  при 3 мМ пентаглицина (разница между скоростями реакции при 2, 3 и 4 мМ пентаглицина была статистически значимой, при однофакторном дисперсионном анализе  $p$ -значение =  $2,4 \times 10^{-5}$ ).

Поскольку в зависимости скорости реакции в течение первых 8 ч от исходной

концентрации субстрата нет выхода на плато с постоянной начальной скоростью реакции при увеличении концентрации субстрата, то это свидетельствует о том, что при использованных концентрациях субстрата он был в недостатке. К сожалению, достичь более высоких концентраций пентаглицина не удалось из-за его низкой растворимости в воде. Несмотря на это ограничение, разработанный метод применим для исследования каталитической активности лизостафина.

Также была изучена возможность применения разработанного метода для исследования активности лизостафина с заведомо низким уровнем активности. Для этого рекомбинантный лизостафин обрабатывали ЭДТА с целью удаления иона цинка из активного центра каталитического домена фермента, что, как следует из литературных данных, приводит к существенному снижению его каталитической активности [170]. В качестве сравнения использовали лизостафин, обработанный аналогично, но без добавления ЭДТА (контрольный лизостафин). Оптическая плотность окрашенных нингидрином проб в начальный момент времени для обоих вариантов лизостафина составляла  $0,20 \pm 0,01$ , а через 30 ч инкубации для образцов с контрольным лизостафином она достигла  $0,55 \pm 0,07$ , в то время как для образцов с лизостафином, обработанным ЭДТА, она увеличилась только до  $0,23 \pm 0,01$  (рисунок 4.6). Это указывает на то, что обработка ЭДТА почти полностью ингибирует каталитическую активность лизостафина, а разработанный метод применим для изучения вариантов лизостафина с различным уровнем каталитической активности.



**Рисунок 4.6 – Сравнение каталитической активности контрольного и обработанного ЭДТА вариантов лизостафина. Показаны средние результаты трёх независимых экспериментов, планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

#### 4.1.4 Численная оценка параметров реакции гидролиза пентаглицина лизостафином

Разработанный метод определения каталитической активности лизостафина демонстрирует скорость расщепления пентаглицина лизостафином при помощи окраски продуктов реакции и непрореагировавшего субстрата с использованием нингидрина. Для того чтобы охарактеризовать активность фермента обычно используют такие параметры, как каталитическая константа  $k_{cat}$  и константа Михаэлиса  $K_M$  из уравнения Михаэлиса-Ментен (4.1) для скорости ферментативной реакции.

$$v = v_{max} \times \frac{[S]}{[S] + K_M}, \quad (4.1)$$

где  $v$  — скорость ферментативной реакции,  $M \cdot c^{-1}$ ;

$v_{max}$  — максимальная скорость ферментативной реакции равная  $k_{cat} \cdot E_0$ ,  $M \cdot c^{-1}$ ;

$k_{cat}$  — каталитическая константа,  $c^{-1}$ ;

$E_0$  — концентрация лизостафина,  $M$ ;

$[S]$  — концентрация пентаглицина,  $M$ ;

$K_M$  — константа Михаэлиса,  $M$ .

Поскольку ранее было показано, что в проведённых экспериментах субстрат находился в недостатке относительно количества лизостафина, то уравнение (4.1) невозможно использовать для определения параметров  $k_{cat}$  и  $K_M$ . В связи с этим была предпринята попытка описать полученные экспериментальные данные расщепления пентаглицина лизостафином для определения значения параметров  $k_{cat}$  и  $K_M$  при помощи следующего из уравнения (4.1) и равенства (4.2) уравнения (4.3), которое показывает зависимость скорости изменения концентрации субстрата  $\frac{d[S]}{dt}$  от его текущей концентрации в реакционной смеси.

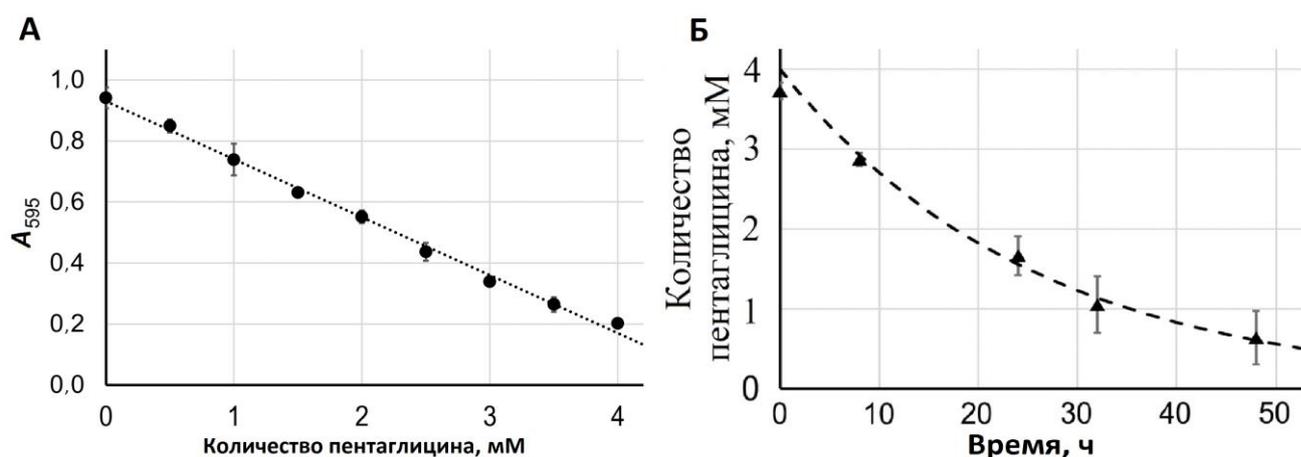
$$v = -\frac{d[S]}{dt}, \quad (4.2)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_{cat} \times E_0 \times \frac{[S]}{[S] + K_M}, \quad (4.3)$$

где  $t$  — время,  $c$ .

Для этого необходимо знать концентрацию субстрата, оставшуюся в реакционной смеси в каждый момент времени протекания реакции. Известно, что расщепление одной молекулы пентаглицина продуцирует появление одной молекулы диглицина и одной молекулы триглицина. Кроме того, показано, что интенсивность окраски пробы пропорциональна количеству

олигоглицинов в ней. Исходя из этого, была построена калибровочная кривая, имитирующая процесс гидролиза пентаглицина, благодаря которой будет возможно пересчитать оптическую плотность реакционной смеси в количество нерасщеплённого пентаглицина (рисунок 4.7 (А)). Для этого смешивали соответствующие количества пентаглицина, диглицина и триглицина из уже упомянутого соотношения расщепления 1 моля пентаглицина на 1 моль диглицина и 1 моль триглицина и того, что стартовое количество пентаглицина в реакционной смеси составляло 4 мМ. То есть, при 4 мМ пентаглицина не добавляли ди- и триглицины, при 3 мМ пентаглицина добавляли по 1 мМ ди-и триглицинов, при 2 мМ пентаглицина – по 2 мМ ди- и триглицинов и т.д. Полученные смеси олигоглицинов подготавливали и окрашивали нингидрином, аналогично пробам реакционных смесей в разработанном методе определения каталитической активности лизостафина. Вклад в окраску проб, вносимый лизостафином при окраске нингидрином, как было показано ранее, отсутствует, что позволяет использовать полученную калибровочную кривую зависимости оптической плотности окрашенных нингидрином смесей олигоглицинов от количества пентаглицина в них для определения содержания пентаглицина в анализируемых пробах реакционных смесей.



**Рисунок 4.7 – Калибровочная кривая оптической плотности окрашенной нингидрином смеси олигоглицинов от концентрации пентаглицина (А) и её применение (Б). (А)**

*Калибровочная кривая зависимости оптической плотности обработанных нингидрином смесей ди-, три- и пентаглицинов от концентрации пентаглицина. Показаны средние результаты трёх независимых экспериментов; планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение; (Б) Зависимость преобразованных в концентрацию пентаглицина при помощи калибровочной кривой (рисунок 4.7 (А)) данных оптической плотности реакции 4 мМ пентаглицина с 5 мкМ лизостафина (рисунок 4.3, сплошная линия) от времени и график соответствующего ей упрощённого уравнения Михаэлиса-Ментен (штриховая линия).*

Как видно из рисунка 4.7 (А), полученная калибровочная кривая демонстрирует

линейный рост оптической плотности при уменьшении концентрации пентаглицина и увеличении концентрации ди- и триглицина во всем диапазоне концентраций, использованных в анализе. Используя полученную калибровочную кривую, значения оптической плотности могут быть непосредственно преобразованы в концентрации пентаглицина, что было сделано для экспериментальных данных зависимости интенсивности окраски проб реакционной смеси 4 мМ пентаглицина с 5 мкМ лизостафина от времени (рисунок 4.7 (Б)).

Для определения каталитических параметров  $k_{cat}$  и  $K_M$  лизостафина мы попытались подобрать значения параметров уравнения (4.3) для зависимости концентрации пентаглицина от времени с использованием нелинейной регрессии.

Однако в результате были получены нереалистичные значения  $k_{cat}$  и  $K_M$ , которые составили  $1,1 \times 10^{11} \text{ c}^{-1}$  и  $1,2 \times 10^{10} \text{ M}$  соответственно. Исходя из того, что субстрат находился в реакционной смеси в недостатке, то, вероятно, значение  $K_M$  лизостафина по отношению к изолированному пентаглицину было намного выше, чем концентрация пентаглицина, доступная в эксперименте, то есть ( $K_M \gg [S]$ ). В этом случае отношение  $\frac{[S]}{[S]+K_M}$  становится неотличимо от отношения  $\frac{[S]}{K_M}$  и уравнение (4.3) сводится к уравнению (4.4).

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_{cat} \times E_0 \times \frac{[S]}{[S] + K_M} \approx -k_{cat} \times E_0 \times \frac{[S]}{K_M} = -E_0 \times \frac{k_{cat}}{K_M} \times [S], \quad (4.4)$$

При интегрировании полученного уравнения (4.4) концентрация пентаглицина, использованного в качестве субстрата, в реакционной смеси описывается экспоненциальным уравнением (4.5).

$$[S] = [S]_0 \times e^{-E_0 \times \frac{k_{cat}}{K_M} \times t}, \quad (4.5)$$

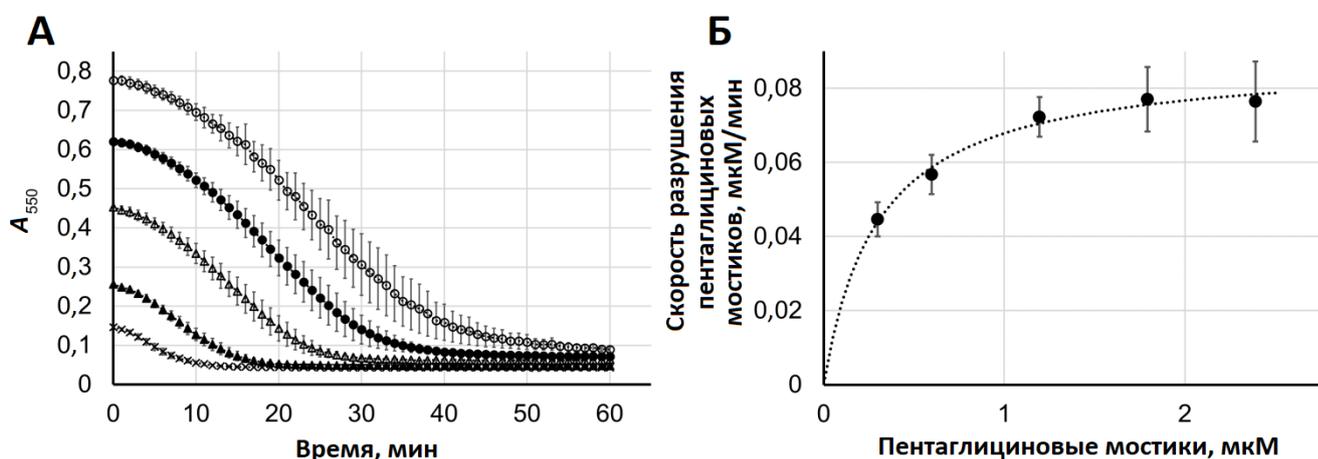
где  $[S]_0$  — начальная концентрация пентаглицина, М;

**$k_{cat}/K_M$  – каталитическая эффективность,  $\text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ .**

Из уравнения (4.5) невозможно определить значения отдельных параметров  $k_{cat}$  и  $K_M$ , однако возможно определить значение параметра каталитической эффективности  $k_{cat}/K_M$ , которое также может быть использовано для описания активности ферментов. Для использованных экспериментальных данных (рисунок 4.6 (Б)) значение каталитической эффективности составило  $8,8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ , что на четыре порядка ниже значения  $k_{cat}/K_M$  «среднего фермента» равного  $\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  [197] и свидетельствует о достаточно низкой эффективности гидролиза изолированного пентаглицинового пептида.

#### 4.1.5 Сравнение каталитической активности лизостафина по отношению к пентаглицину, находящемуся в составе клеточной стенки бактерии, и к свободному пентаглицину

Несмотря на низкую эффективность гидролиза изолированного пентаглицинового пептида, лизостафин способен быстро лизировать интактные клетки *S. aureus* даже в крайне низких концентрациях. Было интересно сравнить между собой значения каталитической эффективности лизостафина по отношению к поперечным пентаглициновым мостикам в структуре пептидогликана *S. aureus* (т.е. пентаглицину, встроенному в клеточную стенку бактерии), и к свободному пентаглицину. Для этого исследовали скорость снижения мутности суспензии стафилококковых клеток под действием лизостафина при разной исходной плотности клеток. Исследование проводили с использованием суспензии клеток *S. aureus* ATCC 29213 с исходной плотностью 8,0, 6,0, 4,0, 2,0 и 1,0 по МакФарланду при 30 нМ лизостафина (рисунок 4.8 (А)).



**Рисунок 4.8 – Расчет параметров каталитической активности рекомбинантного лизостафина с использованием пентаглицина, встроенного в клеточную стенку бактерии.** (А) Исходная плотность клеточной суспензии по МакФарланду равная 8,0 (светлые кружки), 6,0 (закрашенные кружки), 4,0 (светлые треугольники), 2,0 (закрашенные треугольники) и 1,0 (крестики). Показаны средние результаты трёх независимых экспериментов, планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение; (Б) Зависимость скорости гидролиза поперечных мостиков пентаглицина (полученная из скорости снижения мутности суспензии стафилококковых клеток при различной исходной плотности клеток) от исходной концентрации поперечных мостиков пентаглицина. График соответствующего ей уравнения Михаэлиса-Ментен (пунктирная линия). Показаны средние результаты трёх независимых экспериментов, планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

Мутность в единицах по МакФарланду пропорциональна концентрации жизнеспособных бактериальных клеток: 0,5 ед. эквивалентно  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. С учетом того, что на одну

клетку приходится  $\approx 6 \times 10^5$  пентаглициновых мостиков [153], исходную мутность реакционной смеси в единицах по МакФарланду можно преобразовать в концентрацию поперечных мостиков пентаглицина. Предполагая наличие прямой зависимости между количеством гидролизованного пентаглицина и лизисом клеток, скорость снижения мутности можно аналогично преобразовать в скорость расщепления пентаглициновых поперечных мостиков. Скорость снижения мутности суспензии клеток стафилококка при различной исходной плотности клеток была рассчитана путем аппроксимации кривых пятипараметрическим логистическим уравнением и определением скорости просветления клеточной суспензии в точке перегиба. Полученные значения скоростей просветления клеточной суспензии были преобразованы в скорости гидролиза поперечных мостиков пентаглицина и нанесены на график в зависимости от исходной концентрации поперечных мостиков пентаглицина (рисунок 4.8 (Б)). Используя уравнение Михаэлиса-Ментен (4.1) для зависимости скорости гидролиза поперечных мостиков пентаглицина от исходной концентрации поперечных мостиков пентаглицина определили значения параметров  $k_{cat}$  и  $K_M$ . График полученного уравнения Михаэлиса-Ментен представлен пунктирной линией на рисунке 4.8 (Б). Поскольку в данном методе, во-первых, невозможно напрямую измерить количество существующих и расщеплённых пентаглициновых фрагментов, а во-вторых, невозможно нивелировать влияние, оказываемое пептидогликан-связывающим доменом лизостафина, на расщепление поперечных пентаглициновых мостиков в пептидогликане клеточной оболочки, то полученные значения  $k_{cat}$  и  $K_M$  являются кажущимися по отношению к поперечным пентаглициновым мостикам в пептидогликане.

Кажущиеся значения каталитических параметров лизостафина по отношению к пентаглицину, встроенному в клеточную стенку, составили соответственно  $k_{cat} = 0,062 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_M = 302 \text{ нМ}$  и  $k_{cat}/K_M = 2,1 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ . Полученное значение каталитической эффективности рекомбинантного лизостафина по отношению к пентаглицину, встроенному в клеточную стенку, в 23000 раз превышает значение каталитической эффективности рекомбинантного лизостафина по отношению к изолированному пентаглицину ( $8,8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ). Поскольку пентаглицин в структуре пептидогликана клеточной стенки бактерии связывает между собой два стволовых пептида, присоединённых к гликановым тяжам [198], то его конформационная подвижность в структуре пептидогликана будет заведомо более ограничена по сравнению с высокой гибкостью изолированного пентаглицина. В связи с этим, вероятно, существующие конформации пентаглицина в структуре пептидогликана более благоприятны для каталитического действия лизостафина. Также, возможно, каталитический домен лизостафина дополнительно взаимодействует с остатками стволовых пептидов, что оказывает

положительное влияние на эффективность каталитического расщепления пентаглицина [199]. Оба эти эффекта способны приводить к увеличению сродства пентаглицина, встроенного в клеточную стенку, к каталитическому домену лизостафина и, таким образом, к более низкому значению  $K_M$ , по сравнению с изолированным пентаглицином. Однако маловероятно, что увеличение аффинности каталитического домена лизостафина к встроенному в клеточную стенку пентаглицину только за счет этих двух факторов достаточно для объяснения наблюдаемых отличий.

Наиболее вероятным объяснением подобного резкого различия в каталитической эффективности является влияние пептидогликан-связывающего домена лизостафина при его связывании с клеточной стенкой. При использовании суспензии клеток *S. aureus* пентаглициновые пептиды в реакционной смеси сосредоточены в клеточной стенке бактерии в виде зон с локально высокой концентрацией пентаглицина, в отличие от равномерного распределения субстрата по реакционному объёму, характерного для раствора изолированного пентаглицина. Пептидогликан-связывающий домен лизостафина направляет лизостафин в эти зоны с высокой локальной концентрацией субстрата, тем самым существенно повышая кажущуюся каталитическую эффективность фермента. В принципе само по себе такое сосредоточение субстрата и фермента в ограниченном объёме клеточной стенки должно влиять только на кажущуюся  $K_M$ , но не на  $k_{cat}$ . Это подтверждает очень низкая кажущаяся  $k_{cat}$  лизостафина, рассчитанная по скорости лизиса клеток ( $0,062 \text{ с}^{-1}$ ), а высокая каталитическая эффективность была обусловлена малой кажущейся  $K_M = 302 \text{ нМ}$ .

Не менее интересные результаты были получены при сравнении полученных результатов каталитической активности рекомбинантного лизостафина ( $k_{cat}$ ,  $K_M$  и  $k_{cat}/K_M$ ) с данными, описанными в литературных источниках, полученными при использовании других методов. Так, при использовании пентаглицина, меченного флуорофором и гасителем, для анализа активности лизостафина при помощи FRET в зависимости от метода анализа данных были получены значения  $K_M = 200\text{--}300 \text{ мкМ}$  при  $V_{\max} = 63\text{--}76 \text{ пмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{мг(Lst)}^{-1}$ , из которой можно вычислить значение  $k_{cat} = 0,0017\text{--}0,0021 \text{ с}^{-1}$  [19]. Если вычислить значение соотношения каталитической эффективности  $k_{cat}/K_M$ , то оно составит от  $7,0\text{--}8,5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , что хорошо согласуется с полученным нами ранее значением каталитической эффективности лизостафина с использованием пентаглицина в качестве субстрата, равным  $8,8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ . Схожие результаты каталитической константы расщепления пентаглицина лизостафином ( $k_{cat} = 0,006 \text{ с}^{-1}$ ) были получены при использовании в другом исследовании не модифицированного пентаглицинового пептида в качестве субстрата и метода ЯМР для анализа продуктов его гидролиза [36]. В то же время, это значение было выведено просто из начальной скорости гидролиза при единственной

концентрации субстрата равной 1 мМ и, возможно, не совсем корректно.

В то же время, в другом исследовании в качестве субстрата использовали зеленый флуоресцентный белок с пентаглициновым линкером и ковалентно присоединённым флуоресцентным красителем для реализации механизма FRET [20]. В результате были получены значения  $K_M = 65$  мкМ и  $V_{\max} = 10,1$  нМ\*с<sup>-1</sup>, что при преобразовании в  $k_{cat} = 0,05$  с<sup>-1</sup> дает соотношение  $k_{cat}/K_M = 777,0$  М<sup>-1</sup>\*с<sup>-1</sup> [20]. При сравнении с полученными данными значения  $k_{cat}$  хорошо согласуются, однако значение каталитической эффективности отличается на несколько порядков от описанных выше результатов, как для изолированного пентаглицина, так и для пентаглицина, встроенного в клеточную стенку. Это, вероятно, обусловлено использованием пентаглицина, фланкированного объёмными белковыми доменами, что непредсказуемым образом могло повлиять на активность лизостафина при использовании такого субстрата.

Косвенно полученные данные подтверждают результаты исследования белка LytM<sub>185-316</sub> [38], являющегося гомологом каталитического домена лизостафина, согласно которым значения каталитических параметров LytM<sub>185-316</sub> для модифицированного тетраглицина в качестве субстрата составили  $k_{cat} = 0,003$  с<sup>-1</sup>,  $K_M = 2,3$  мМ и  $k_{cat}/K_M = 1,2$  М<sup>-1</sup>\*с<sup>-1</sup>, что адекватно согласуется с данными, полученными в результате разработки метода определения каталитической активности лизостафина с использованием изолированного пентаглицина в качестве субстрата.

Несмотря на имеющиеся различия, все данные свидетельствуют о малом количестве каталитических циклов за единицу времени и низкой каталитической эффективности лизостафина в отношении изолированного пентаглицина. Эти свойства могли развиваться, чтобы уменьшить нецелевое расщепление и токсичность фермента по отношению к клеткам природного продуцента *S. simulans*, при этом пептидогликан-связывающий домен усиливает активность лизостафина по отношению к его природному субстрату — пептидогликану клеточной стенки *S. aureus*.

Таким образом, в результате проведённых исследований был разработан простой и недорогостоящий метод определения каталитической активности лизостафина, основанный на хромогенной реакции концевых аминокислот пептидов с нингидрином, с использованием немодифицированного пентаглицина в качестве субстрата. В отличие от ранее опубликованных анализов, разработанный метод требует только недорогих, легкодоступных реагентов и основного лабораторного оборудования и позволяет изучать активность лизостафина на немодифицированном пентаглицине. При необходимости разработанный метод может быть

адаптирован для исследования других эндопептидаз при помощи замены расщепляемого пептида, что, в том числе, позволит сравнивать активность различных эндопептидаз между собой. Кроме того, разработанный метод с использованием изолированного пентаглицина в качестве субстрата позволяет определять значения каталитических параметров лизостафина независимо от влияния пептидогликан-связывающего домена и лизостафин-индуцированного процесса лизиса клетки.

Также разработанный метод определения каталитической активности лизостафина не требует сложных специфических условий для проведения реакции между лизостафином и пентаглицином, а значит, может быть использован для анализа влияния условий протекания реакции (например, pH буферного раствора, концентрация NaCl) на активность лизостафина.

Немаловажно, что при разработке данного метода анализа каталитической активности лизостафина было показано резкое различие между каталитической эффективностью лизостафина в отношении изолированного пентаглицина и пентаглицина, встроенного в клеточную стенку бактерии, что подчеркивает относительный вклад каталитических и пептидогликан-связывающих доменов в кумулятивную бактериолитическую активность. Исходя из этого, использование разработанного метода позволяет упростить разграничение влияния каталитического и пептидогликан-связывающего домена, что имеет решающее значение для понимания взаимосвязей структура-активность антибактериальных лизинов и их рационального дизайна.

#### 4.2 Исследование соотношения между каталитической, пептидогликанолитической и бактериолитической активностью вариантов рекомбинантного лизостафина с различным уровнем каталитической активности

Эффективный и рациональный дизайн антибактериальных препаратов на основе лизостафина, как уже было сказано выше, требует разграничить влияние, оказываемое на активность лизостафина, его каталитическим и пептидогликан-связывающим доменами. Для этого необходимо систематически изучить каталитическую активность лизостафина с использованием изолированного пентаглицина в качестве субстрата и его кумулятивную активность с использованием клеточных стенок *S. aureus* в качестве субстрата со сложной пространственной организацией, а затем сравнить их между собой. Чтобы осуществить данное исследование, необходимо получить препараты вариантов рекомбинантного лизостафина с различным уровнем каталитической активности при постоянном пептидогликан-связывающем

домене. Это можно реализовать, например, путем внесения мутаций в аминокислотную последовательность каталитического домена лизостафина [37], особенно в аминокислотные остатки, формирующие его активный центр. Однако большая часть мутаций, способных изменять активность ферментов – это мутации, вносимые в консервативные остатки активного центра лизостафина, которые не просто изменяют уровень активности белка, а полностью её нивелируют, что не дает получить белки именно с разным уровнем активности. Кроме того, изменение аминокислотных остатков каталитического центра лизостафина может оказать влияние как на каталитическую константу лизостафина  $k_{cat}$ , так и на параметры связывания активного центра белка с его субстратом, выраженные в виде  $K_M$ .

С другой стороны, из литературных источников известно, что кофактором антибактериальных лизинов семейства M23 могут являться не только ионы цинка, но и ионы других металлов, например,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  или  $Cu^{2+}$  [36–38,45]. При этом они демонстрируют различный уровень активности, как в экспериментах с использованием бактериальных клеток [37,45], так и в экспериментах с использованием синтетических изолированных субстратов [36–38]. Однако, использованные в этих работах методы получения вариантов белков с различными ионами металлов упускают те или иные аспекты, существенно влияющие на интерпретацию полученных результатов. Кроме того, в данных исследованиях не проводилось систематического изучения соотношения каталитической активности лизостафина и других лизинов с их кумулятивной активностью, учитывающей влияние доменов, ответственных за связывание с пептидогликаном.

Таким образом, для проведения систематического исследования взаимосвязи между каталитической, пептидогликанолитической и бактериолитической активностью вариантов рекомбинантного лизостафина было решено использовать варианты белка с различным уровнем активности вследствие различий в ионах металла, связанных в активном центре рекомбинантного лизостафина.

#### 4.2.1 Получение вариантов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре белка

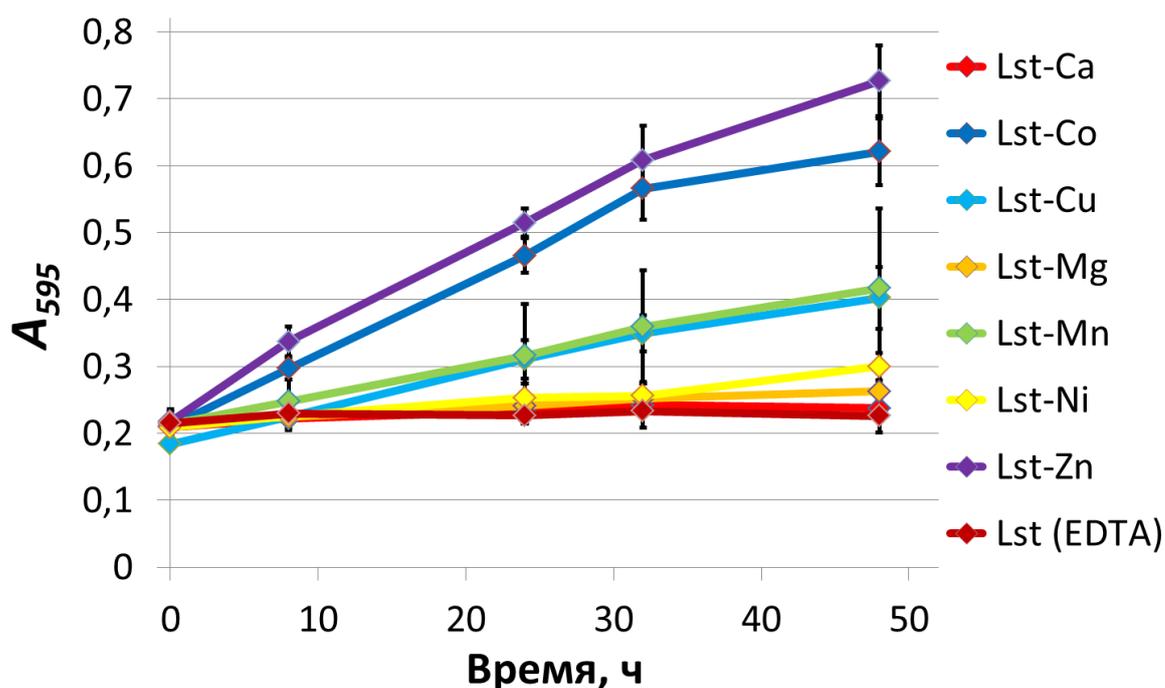
Для получения препаратов вариантов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента рекомбинантный лизостафин, выделенный при помощи катионообменной хроматографии, обработали ЭДТА в течение нескольких суток для гарантированного удаления всех ионов металлов в активном центре лизостафина. Затем раствор лизостафина разделили на аликвоты, часть из которых сохранили для дальнейших экспериментов в качестве препарата варианта лизостафина Lst (EDTA) без металла в активном

центре фермента (отрицательный контроль не обладающий каталитической активностью). Оставшиеся аликвоты смешивали с солями различных металлов для получения вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента. Внедрение ионов металлов проводили при рН 4,0 с инкубацией в течение длительного промежутка времени, чтобы с одной стороны исключить встраивание второго иона металла, а с другой – обеспечить встраивание ионов металлов с более низкой аффинностью к лизостафину (по сравнению с ионом цинка). В результате были получены препараты рекомбинантного лизостафина с ионами кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ , Lst-Ca), кобальта ( $\text{Co}^{2+}$ , Lst-Co), меди ( $\text{Cu}^{2+}$ , Lst-Cu), магния ( $\text{Mg}^{2+}$ , Lst-Mg), марганца ( $\text{Mn}^{2+}$ , Lst-Mn), никеля ( $\text{Ni}^{2+}$ , Lst-Ni) и нативного цинка ( $\text{Zn}^{2+}$ , Lst-Zn) в активном центре белка.

Полученные препараты лизостафина Lst (EDTA), Lst-Ca, Lst-Co, Lst-Cu, Lst-Mg, Lst-Mn, Lst-Ni и Lst-Zn использовались для дальнейшего изучения их каталитической, пептидогликанолитической и бактериолитической активности.

4.2.2 Исследование каталитической активности вариантов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре белка с использованием пентаглицина в качестве субстрата

Для изучения каталитической активности вариантов рекомбинантного лизостафина Lst (EDTA), Lst-Ca, Lst-Co, Lst-Cu, Lst-Mg, Lst-Mn, Lst-Ni и Lst-Zn использовали разработанный ранее метод определения каталитической активности лизостафина с 4 мМ пентаглицина в качестве субстрата при 1 мкМ белка. Зависимость оптической плотности окрашенных нингидрином реакционных смесей от времени представлена на рисунке 4.9.



**Рисунок 4.9 – Зависимость оптической плотности окрашенных нингидрином реакционных смесей от времени для вариантов лизостафина с ионами различных металлов. Показаны средние результаты для шести-восьми независимых экспериментов для каждого варианта белка, планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

Средние значения рассчитанной для каждого варианта лизостафина каталитической эффективности  $k_{cat}/K_M$  приведены в таблице 1 и представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение, в скобках указано количество независимых экспериментов.

**Таблица 1 – Каталитическая эффективность вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента**

Вариант лизостафина	$k_{cat}/K_M, M^{-1} \cdot c^{-1}$
Lst (EDTA)	$0,03 \pm 0,03$ (6)
Lst-Ca	$0,27 \pm 0,18$ (6)
Lst-Co	$6,19 \pm 0,88$ (6)
Lst-Cu	$2,45 \pm 0,54$ (6)
Lst-Mg	$0,44 \pm 0,36$ (6)
Lst-Mn	$1,80 \pm 0,88$ (8)
Lst-Ni	$0,82 \pm 0,19$ (6)
Lst-Zn	$8,06 \pm 1,26$ (6)

Полученные кривые выступают дополнительным подтверждением того, что

разработанный метод определения каталитической активности лизостафина применим для анализа активности вариантов лизостафина с различным уровнем активности.

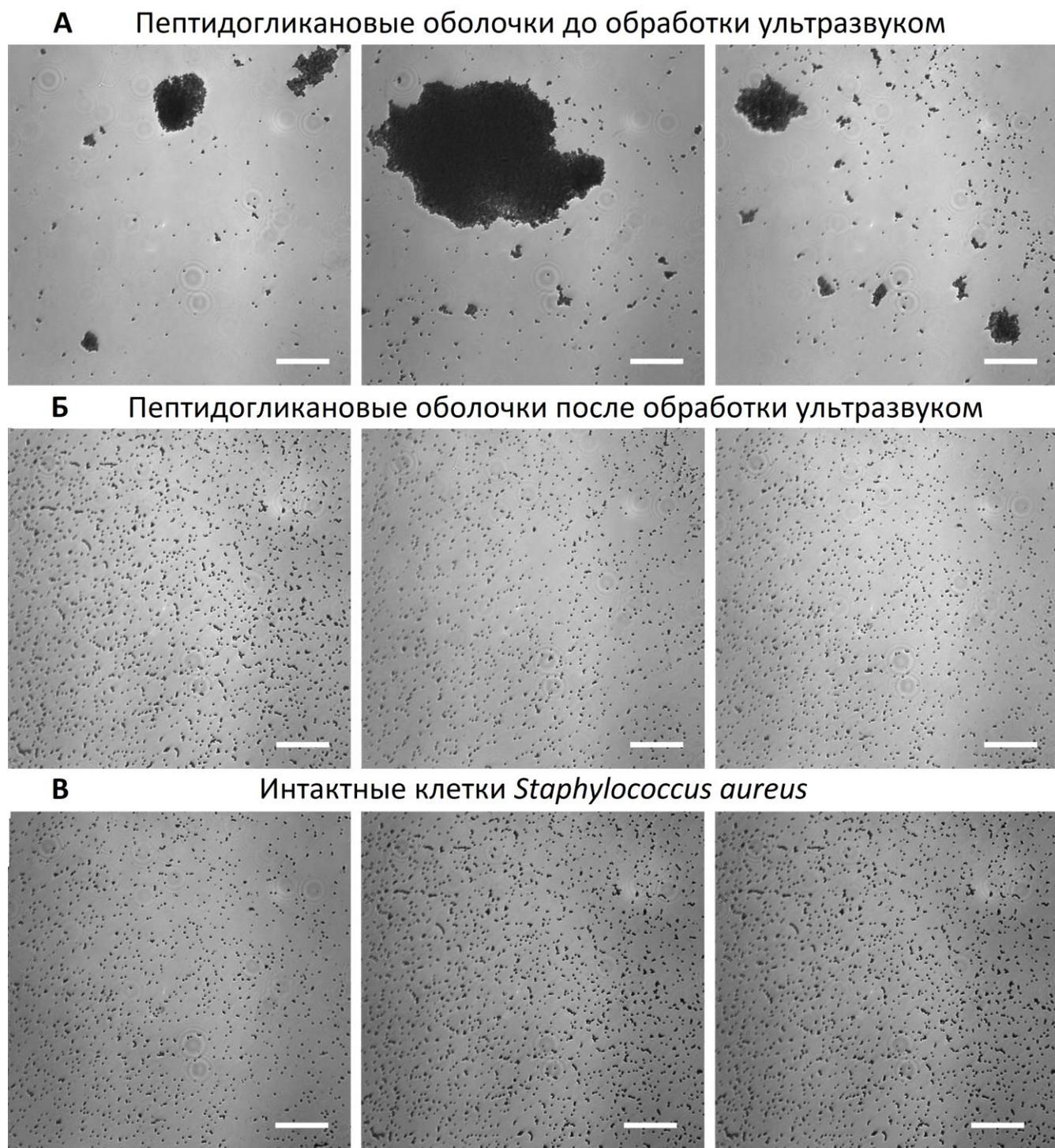
Как и ожидалось, наибольшей каталитической активностью с использованием изолированного пентаглицина в качестве субстрата обладал вариант лизостафина с нативным ионом цинка в активном центре фермента. Остальные варианты обладают меньшим уровнем каталитической активности вплоть до её полного отсутствия у лизостафина Lst (EDTA), выступавшего в качестве отрицательного контроля.

4.2.3 Получение пептидогликановых оболочек *S. aureus* для исследования с их использованием пептидогликанолитической активности вариантов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре белка

Стоит отметить, что активность лизинов, как уже было сказано ранее, преимущественно изучают по просветлению клеточной бактериальной суспензии под действием фермента. При этом стоит учитывать, что вариант лизостафина Lst (EDTA) не имеет ионов металлов в активном центре фермента, а варианты лизостафина Lst-Ca, Lst-Co, Lst-Cu, Lst-Mg, Lst-Mn, Lst-Ni и Lst-Zn имеют в своей структуре ионы различных металлов, обладающих различным сродством к белку, в то время как интактные клетки *S. aureus* содержат в себе ионы различных металлов, необходимые для жизнедеятельности клетки и способные встраиваться в активный центр лизостафина и/или заменять собой уже присутствующие там ионы металлов. Это может внести изменение в наблюдаемый уровень активности вариантов лизостафина и, как следствие, приведет к получению недостоверных результатов. В связи с этим в дополнение к бактериолитической активности с использованием интактных клеток *S. aureus* было принято решение исследовать их пептидогликанолитическую активность с использованием пептидогликановых оболочек (PG) *S. aureus*. Это позволит максимально контролируемо изучить пептидогликанолитическую активность вариантов лизостафина по отношению к пентаглицину, встроенному в клеточную стенку, и сравнить её с каталитической активностью по отношению к изолированному пентаглицину в качестве субстрата.

Для получения PG клетки *S. aureus* ATCC 29213 кипятили в растворе SDS с последующей последовательной обработкой микрококковой нуклеазой и неспецифической протеиназой К. Полученные PG после получения частично слипаются в крупные агрегаты, что делает часть субстрата недоступной для действия лизостафина (рисунок 4.10 (А)). Для обеспечения присутствия в реакционной смеси отдельных частиц PG, доступных для действия лизостафина, перед экспериментом раствор PG обрабатывали при помощи ультразвука. Было продемонстрировано, что в итоге получают отдельные сферические PG с размером частиц,

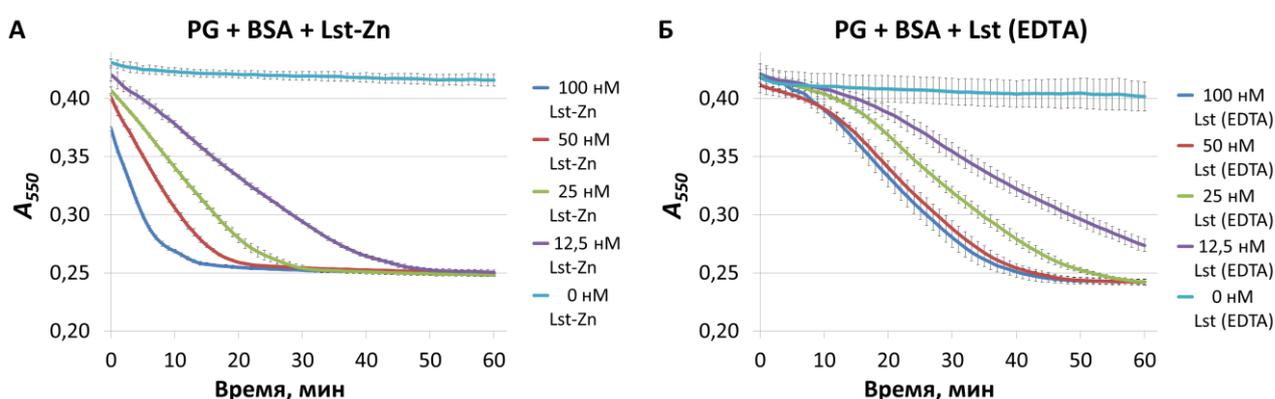
сопоставимым с размером intactных клеток, из которых их получали (рисунок 4.10 (Б, В)).



**Рисунок 4.10 – Микроскопические изображения окрашенных кристаллическим фиолетовым препаратов PG до (А) и после (Б) обработки ультразвуком и intactных клеток *S. aureus* (В). Масштабный отрезок составляет 20 мкм.**

#### 4.2.4 Адаптация метода исследования пептидогликанолитической активности вариантов рекомбинантного лизоцистина с ионами различных металлов в активном центре белка

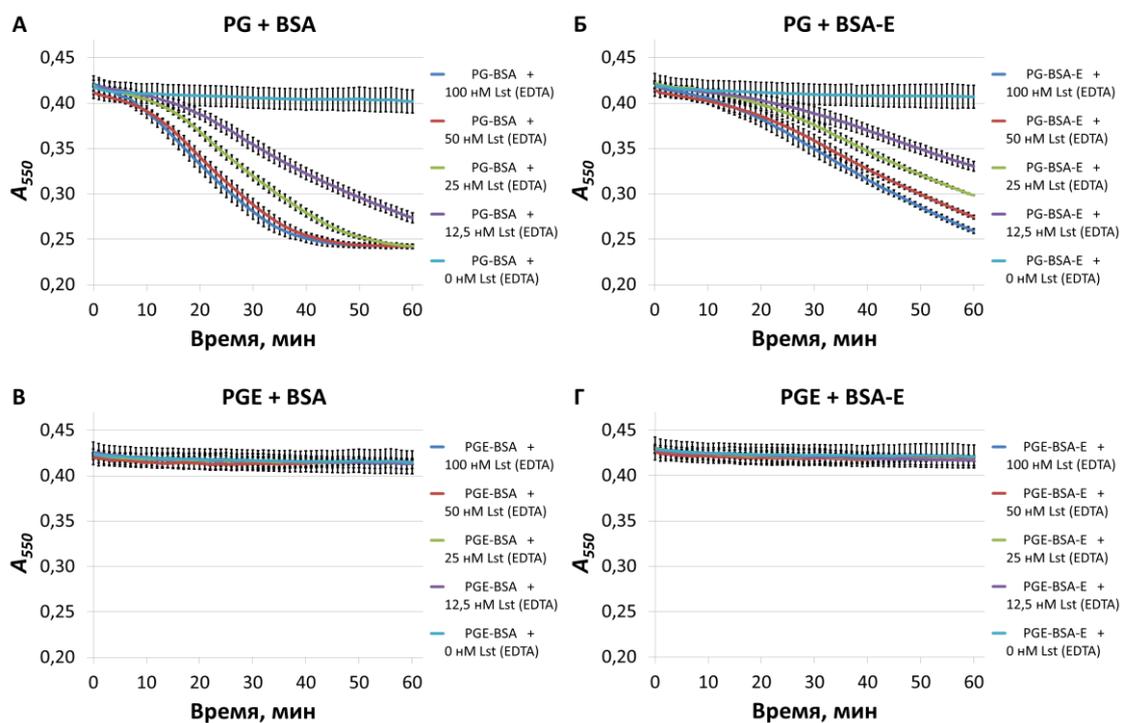
Была проведена адаптация метода определения активности лизоцистина путем измерения снижения мутности реакционной смеси для исследования пептидогликанолитической активности вариантов лизоцистина с ионами различных металлов в активном центре белка с использованием PG. В результате проведенных экспериментов для вариантов лизоцистина Lst-Zn и Lst (EDTA) было установлено, что в реакционной среде присутствуют некоторое количество ионов металлов, которые способны связываться с активным центром лизоцистина Lst (EDTA), тем самым увеличивая его активность (рисунок 4.11). Источником ионов может выступать BSA, присутствующий в реакционной смеси для предотвращения адгезии лизоцистина на стенках и дне лунок планшета, и/или PG, в которых, возможно, сохраняется некоторое остаточное количество ионов металлов.



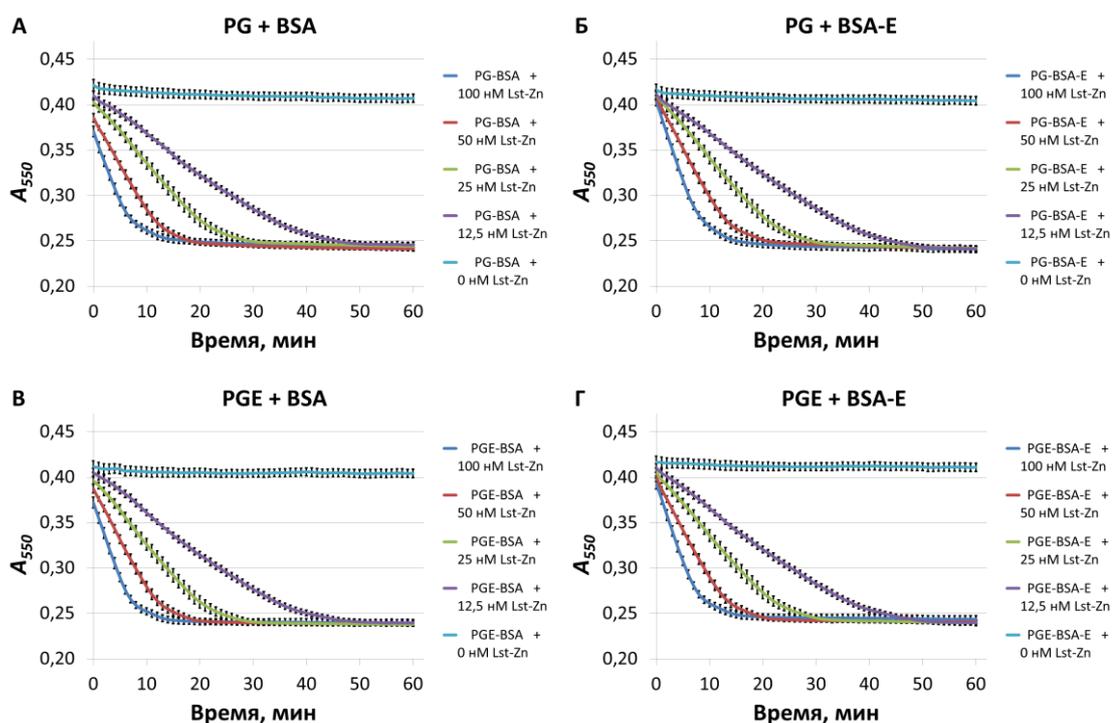
**Рисунок 4.11 – Кривые изменения оптической плотности суспензии PG от времени под действием вариантов лизоцистина Lst-Zn (А) и Lst (EDTA) (Б) при 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ белка в реакционной смеси и без добавления белка в присутствии BSA. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

Для проверки этого предположения и нивелирования влияния ионов металлов, присутствующих в препаратах BSA и PG, на наблюдаемую активность вариантов лизоцистина BSA и PG обрабатывали ЭДТА (BSA-E и PGE). При использовании комбинаций растворов BSA и BSA-E и суспензий PG и PGE для определения пептидогликанолитической активности вариантов лизоцистина Lst (EDTA) (рисунок 4.12) и Lst-Zn (рисунок 4.13) было установлено, что, как в BSA, так и в PG содержится некоторое количество ионов металлов, причём в PG их содержится намного больше, чем в BSA, и эти ионы способны взаимодействовать с активным центром лизоцистина и изменять его активность. Обработка компонентов реакционной смеси при помощи ЭДТА позволяет удалить из неё все лишние ионы металлов, которые могут влиять

на наблюдаемый уровень активности различных вариантов лизоцифина. При этом, проведённая обработка компонентов реакционной смеси никак не влияет на активность варианта лизоцифина Lst-Zn (рисунок 4.13).



**Рисунок 4.12 – Кривые изменения оптической плотности суспензии PG (А, Б) или PGE (В, Г) от времени для варианта лизоцифина Lst (EDTA) в присутствии BSA (А, В) или BSA-E (Б, Г) при 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ белка в реакционной смеси и без добавления белка. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

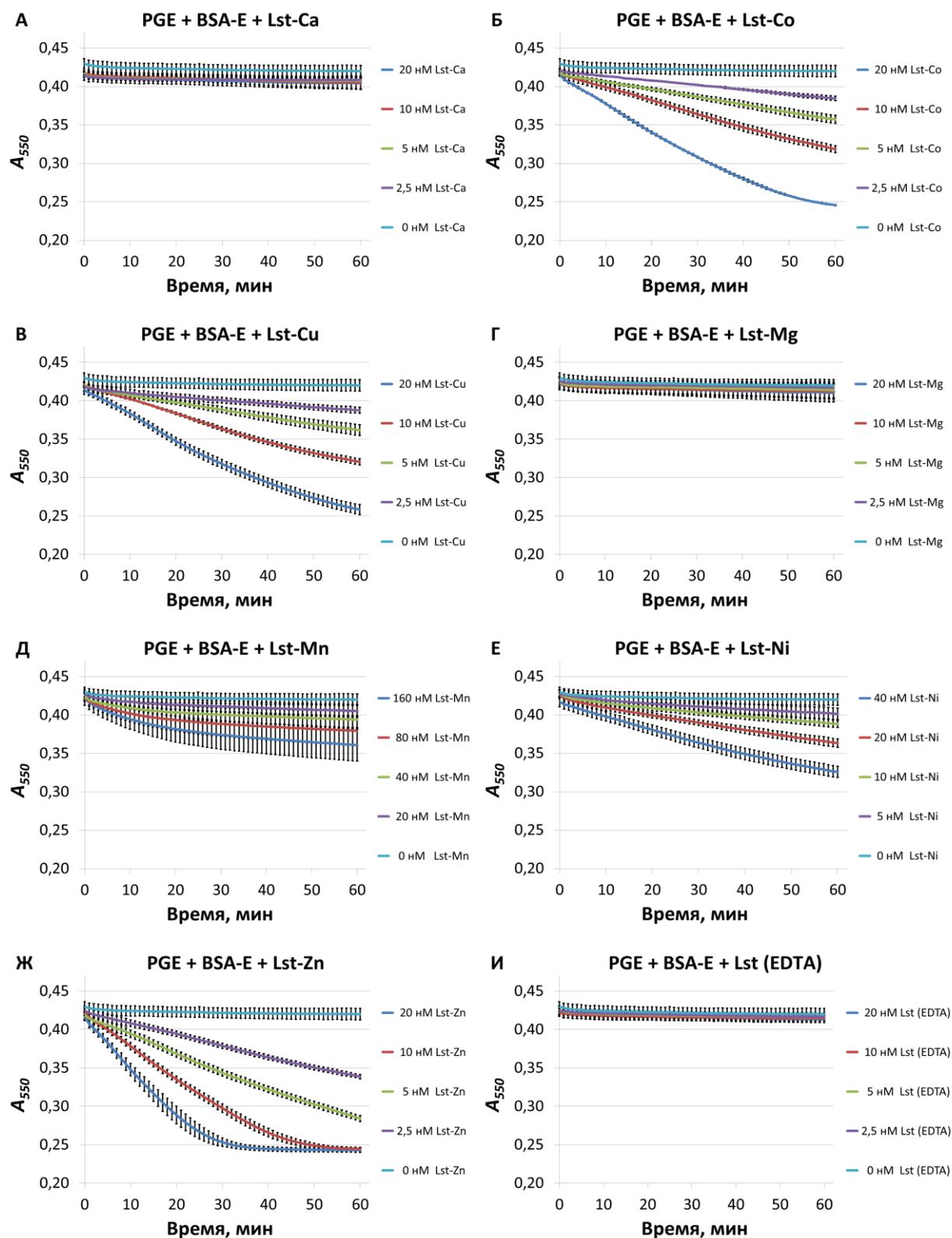


**Рисунок 4.13 – Кривые изменения оптической плотности суспензии PG (А, Б) или PGE (В, Г) от времени для варианта лизостафина Lst-Zn в присутствии BSA (А, В) или BSA-E (Б, Г) при 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ белка в реакционной смеси и без добавления белка. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

Таким образом изучать пептидогликанолитическую активность вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента целесообразно с использованием с использованием PGE в присутствии BSA-E.

#### 4.2.5 Исследование пептидогликанолитической активности вариантов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре белка

Результаты, полученные при исследовании пептидогликанолитической активности вариантов лизостафина Lst-Ca, Lst-Co, Lst-Cu, Lst-Mg, Lst-Mn, Lst-Ni, Lst-Zn и Lst (EDTA) с использованием PGE в присутствии BSA-E при различной концентрации белка, представлены на рисунке 4.14.



**Рисунок 4.14 – Кривые изменения оптической плотности суспензии PGE в присутствии BSA-E от времени для вариантов лизостафина Lst-Ca (А), Lst-Co (Б), Lst-Cu (В), Lst-Mg (Г), Lst-Mn (Д), Lst-Ni (Е), Lst-Zn (Ж) и Lst (EDTA) (И) при различной концентрации белка. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

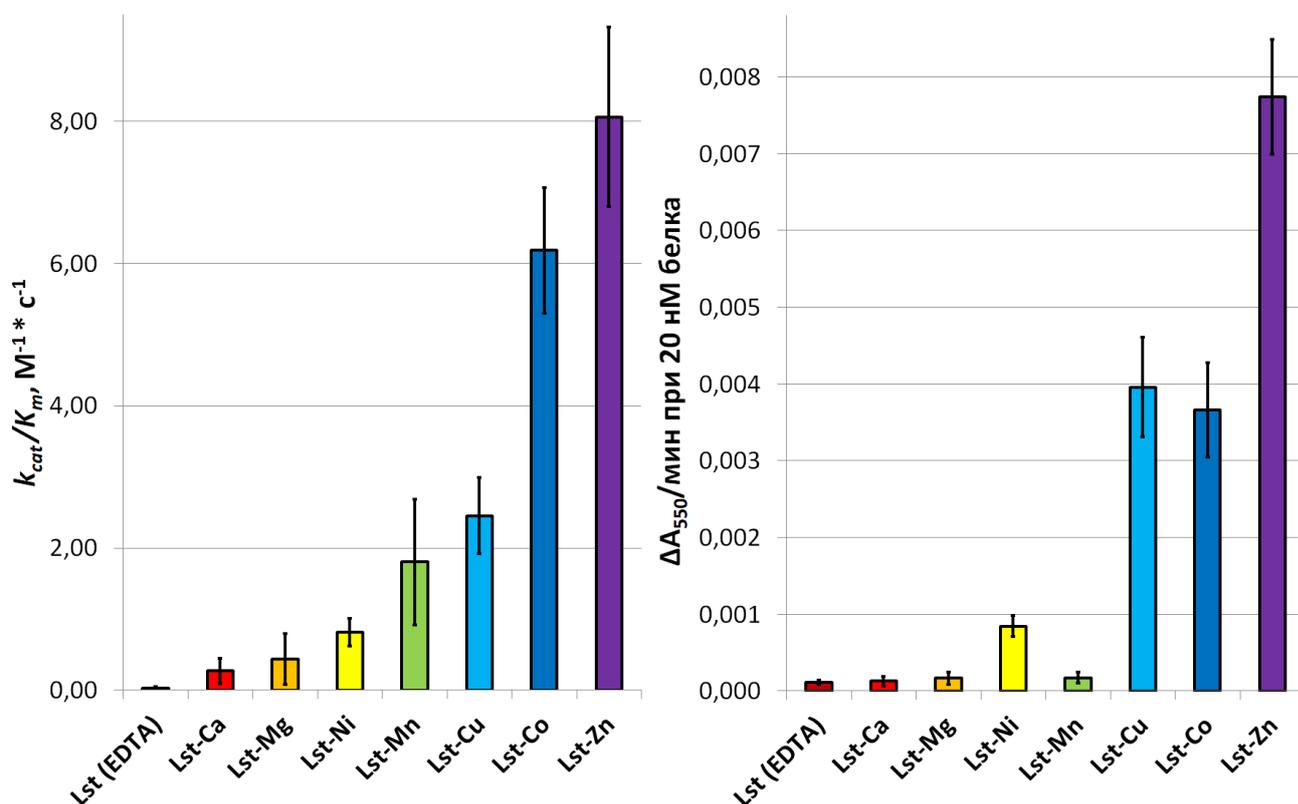
Усреднённые данные пептидогликанолитической активности вариантов лизостафина с

ионами различных металлов в активном центре белка в отношении PGE в присутствии BSA-E при 20 нМ белков представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Пептидогликанолитическая активность вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента в присутствии BSA-E

Вариант лизостафина	Скорость просветления суспензии PGE при 20 нМ белка, $\Delta A_{550}/\text{мин}$
Lst (EDTA)	$0,0001 \pm 0,0001$ (4)
Lst-Ca	$0,0001 \pm 0,0001$ (4)
Lst-Co	$0,0037 \pm 0,0006$ (4)
Lst-Cu	$0,0040 \pm 0,0006$ (4)
Lst-Mg	$0,0002 \pm 0,0001$ (4)
Lst-Mn	$0,0002 \pm 0,0001$ (4)
Lst-Ni	$0,0008 \pm 0,0001$ (4)
Lst-Zn	$0,0077 \pm 0,0007$ (4)

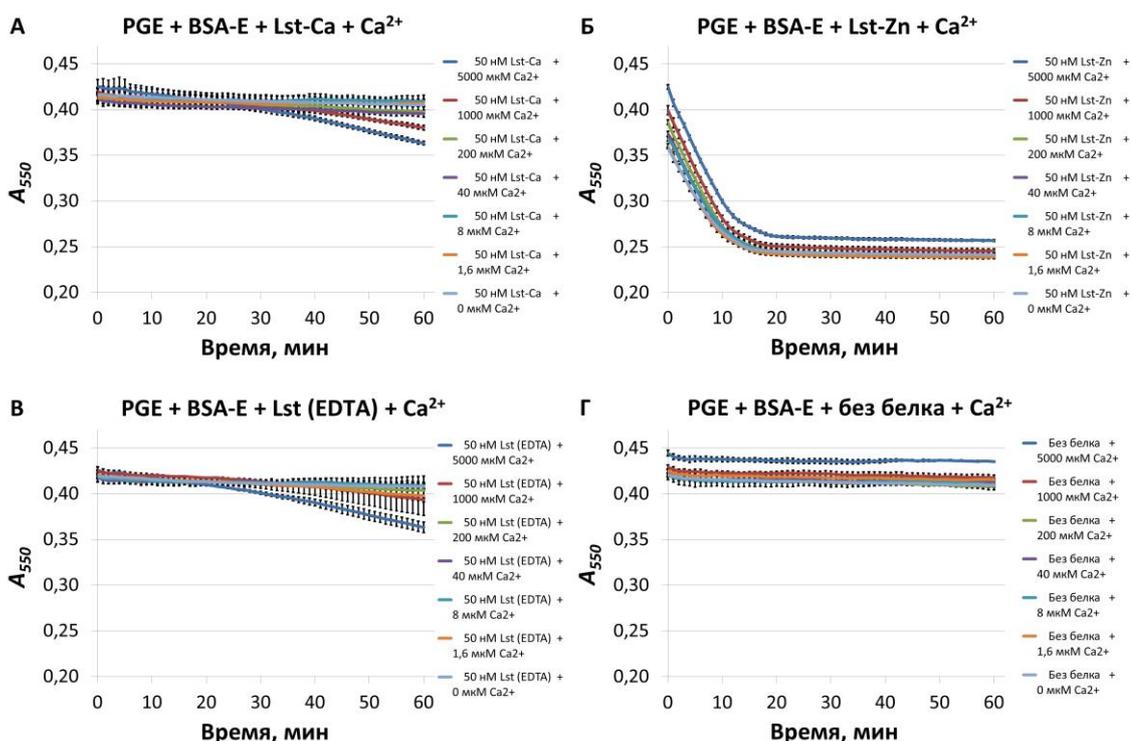
Если расположить варианты лизостафина в порядке возрастания их каталитической активности и сравнить между собой уровень их каталитической и пептидогликанолитической активности, то можно заметить сходную тенденцию в изменении обоих типов активности лизостафина (рисунок 4.15), из которой по какой-то причине выпадают варианты лизостафина Lst-Mn и, вероятно, Lst-Co. Для данных вариантов лизостафина уровень пептидогликанолитической активности намного ниже того, что ожидалось исходя из данных их каталитической активности. Поскольку варианты лизостафина должны различаться только ионом металла в активном центре каталитического домена белка, то логично исключить влияние пептидогликан-связывающего домена на наблюдаемое явление, поскольку в ином случае оно бы имело место для всех вариантов белка, а не только для некоторых из них.



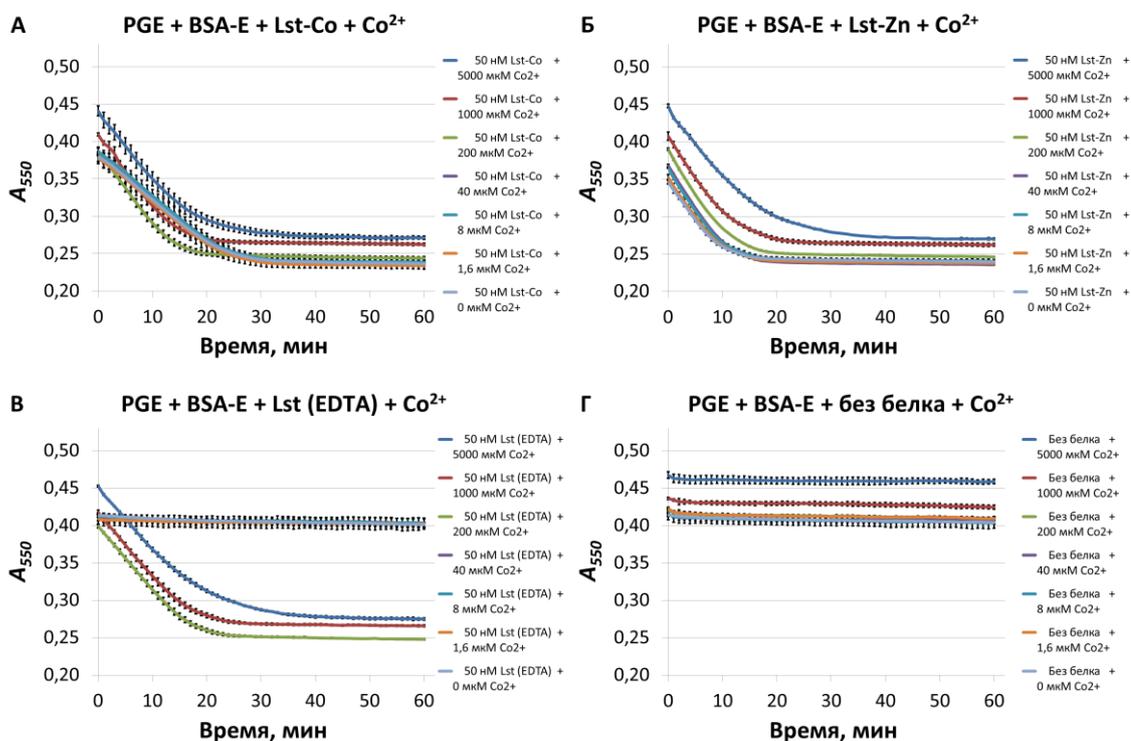
**Рисунок 4.15 – Сравнение каталитической эффективности (А) и пептидогликанолитической активности (Б) вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре белка. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

Поскольку как пептидогликановые оболочки, так и BSA способны связывать ионы металлов, то, возможно, PGE и BSA-E способны забирать ионы металлов из активного центра лизостафина в зависимости от их аффинности к лизостафину и компонентам реакционной смеси. Это может приводить к снижению наблюдаемого уровня пептидогликанолитической активности исследуемых вариантов лизостафина.

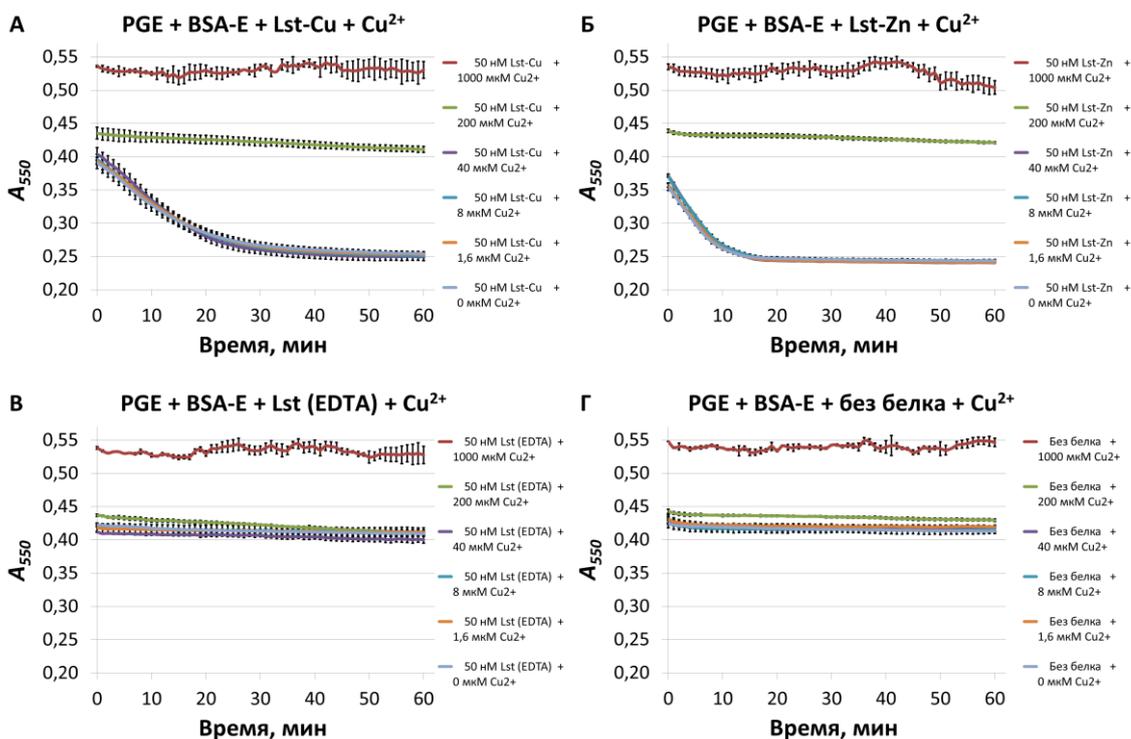
Для того чтобы проверить высказанное выше предположение, было проведено исследование пептидогликанолитической активности вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента в присутствии дополнительного количества соответствующих ионов металлов. Для каждого иона металла провели эксперимент с вариантом лизостафина с соответствующим ионом металла, а в качестве контролей использовали варианты лизостафина Lst-Zn и Lst (EDTA), а также эксперимент без добавления белка. Кривые изменения оптической плотности суспензии PGE в присутствии BSA-E с добавлением ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  в различных концентрациях приведены на рисунках 4.16-4.22.



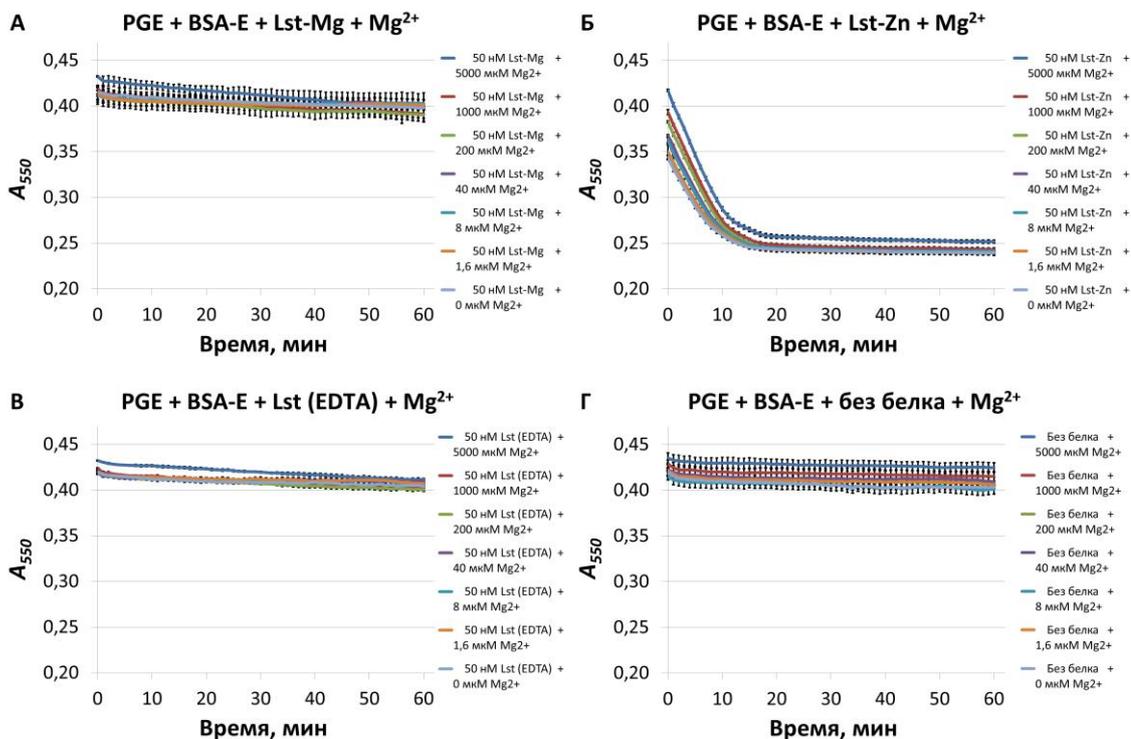
**Рисунок 4.16 – Кривые изменения оптической плотности суспензии PGE в присутствии BSA-E от времени для 50 нМ варианта лизостафина Lst-Ca (А), Lst-Zn (Б), Lst (EDTA) (В) и без добавления белка (Г) при добавлении 0 мкМ, 1,6 мкМ, 8 мкМ, 40 мкМ, 200 мкМ, 1 мМ, 5 мМ ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .**



**Рисунок 4.17 – Кривые изменения оптической плотности суспензии PGE в присутствии BSA-E от времени для 50 нМ варианта лизостафина Lst Co (А), Lst-Zn (Б), Lst (EDTA) (В) и без добавления белка (Г) при добавлении 0 мкМ, 1,6 мкМ, 8 мкМ, 40 мкМ, 200 мкМ, 1 мМ, 5 мМ ионов  $\text{Co}^{2+}$ .**



**Рисунок 4.18 – Кривые изменения оптической плотности суспензии PGE в присутствии BSA-E от времени для 50 нМ варианта лизостафина Lst Cu (А), Lst-Zn (Б), Lst (EDTA) (В) и без добавления белка (Г) при добавлении 0 мкМ, 1,6 мкМ, 8 мкМ, 40 мкМ, 200 мкМ, 1 мМ ионов  $\text{Cu}^{2+}$ .**



**Рисунок 4.19 – Кривые изменения оптической плотности суспензии PGE в присутствии BSA-E от времени для 50 нМ варианта лизостафина Lst-Mg (А), Lst-Zn (Б), Lst (EDTA) (В) и без добавления белка (Г) при добавлении 0 мкМ, 1,6 мкМ, 8 мкМ, 40 мкМ, 200 мкМ, 1 мМ, 5 мМ ионов  $\text{Mg}^{2+}$ .**

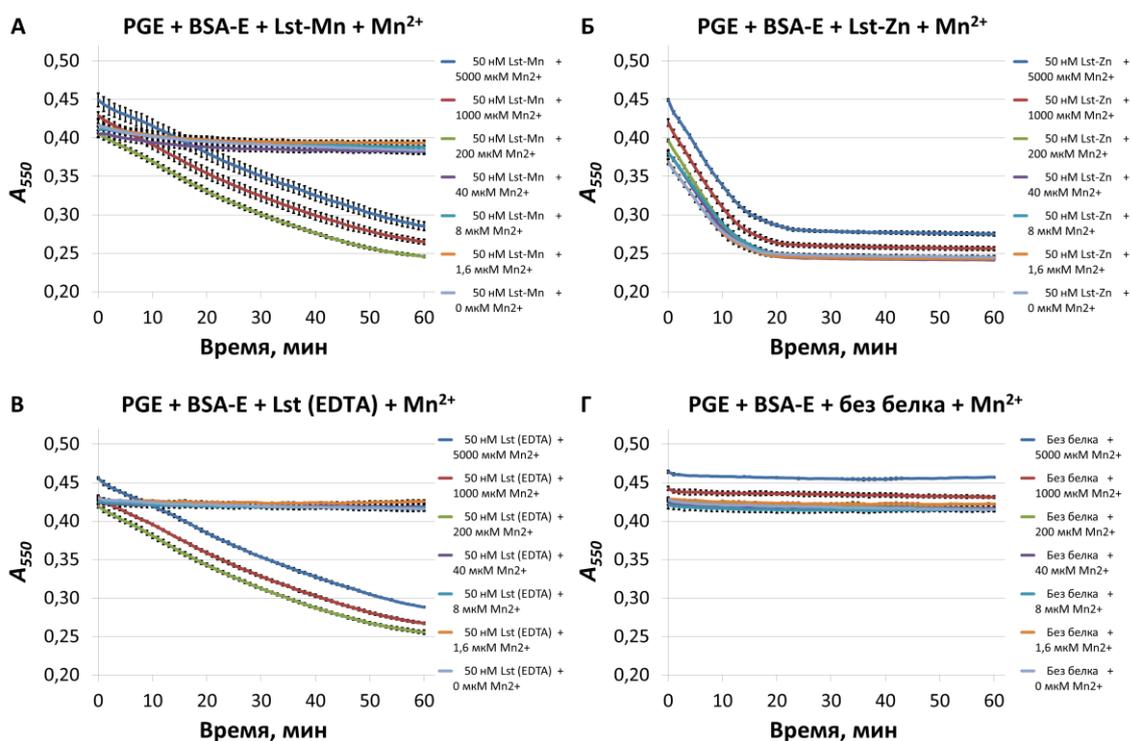


Рисунок 4.20 – Кривые изменения оптической плотности суспензии PGE в присутствии BSA-E от времени для 50 нМ варианта лизостафина Lst-Mn (А), Lst-Zn (Б), Lst (EDTA) (В) и без добавления белка (Г) при добавлении 0 мкМ, 1,6 мкМ, 8 мкМ, 40 мкМ, 200 мкМ, 1 мМ, 5 мМ ионов  $Mn^{2+}$ .

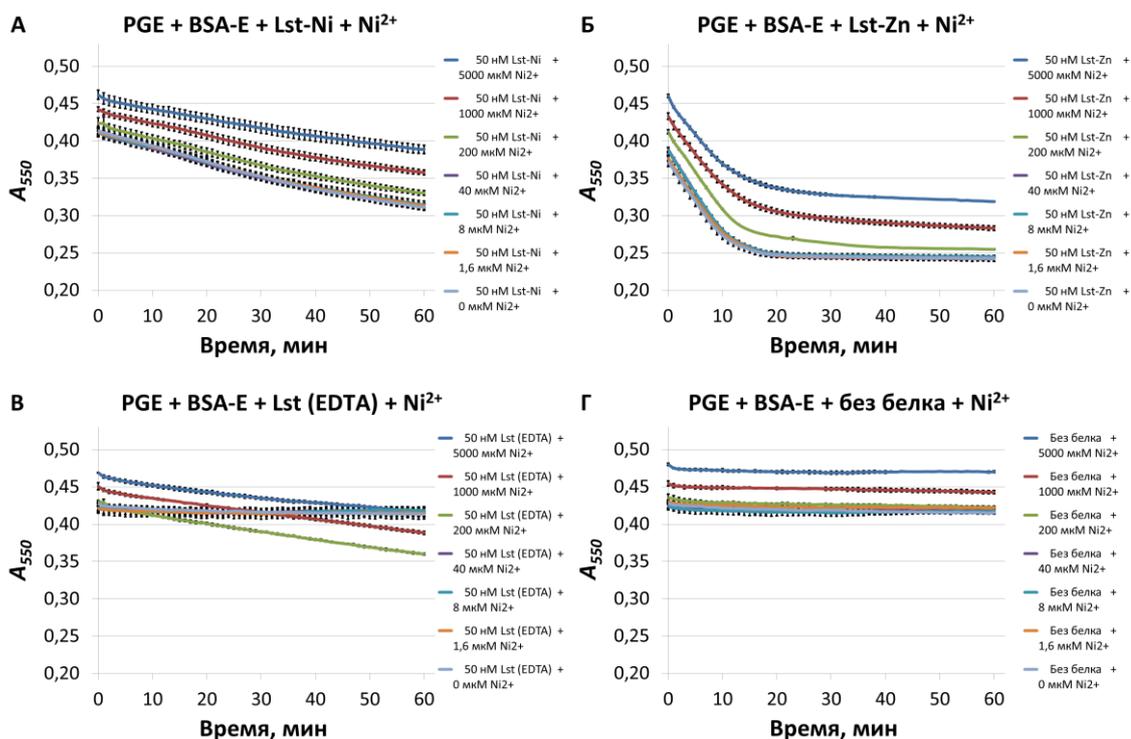
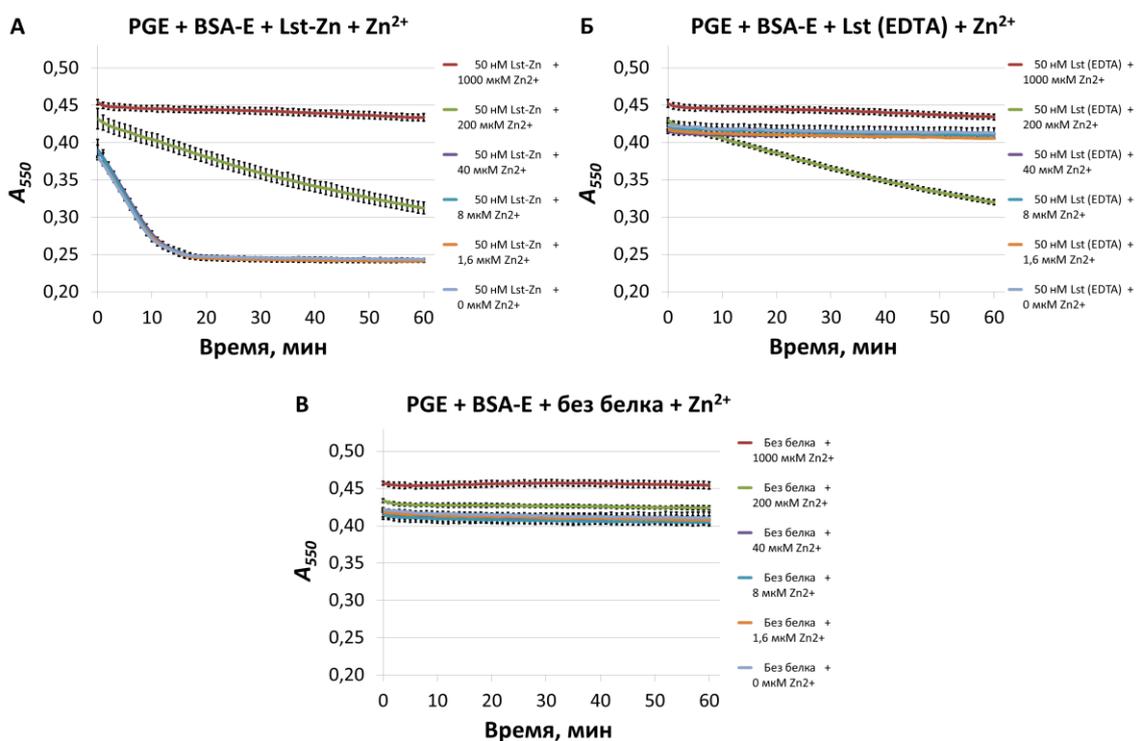


Рисунок 4.21 – Кривые изменения оптической плотности суспензии PGE в присутствии BSA-E от времени для 50 нМ варианта лизостафина Lst-Ni (А), Lst-Zn (Б), Lst (EDTA) (В) и без добавления белка (Г) при добавлении 0 мкМ, 1,6 мкМ, 8 мкМ, 40 мкМ, 200 мкМ, 1 мМ, 5 мМ ионов  $Ni^{2+}$ .



**Рисунок 4.22 – Кривые изменения оптической плотности суспензии PGE в присутствии BSA-E от времени для 50 нМ варианта лизостафина Lst-Zn (А), Lst (EDTA) (Б) и без добавления белка (В) при добавлении 0 мкМ, 1,6 мкМ, 8 мкМ, 40 мкМ, 200 мкМ, 1 мМ ионов  $Zn^{2+}$ .**

Поскольку суспензия PGE с различным содержанием ионов металлов вносилась к пробам белка не одновременно, то активный контрольный вариант лизостафина Lst-Zn успел разрушить часть PGE к моменту измерения первой временной точки, из-за чего стартовые значения оптической плотности смесей отличались друг от друга с поправкой на увеличение оптической плотности смеси вследствие частичной или полной агрегации PGE (рисунки 4.16-4.22).

Из проведённых экспериментов следует, что при добавлении 200 мкМ и более высоких концентраций ионов металлов наблюдаются изменения в активности препаратов лизостафина, за исключением иона  $Ca^{2+}$ , для которого изменения заметны при концентрации 1 мМ ионов металла и выше, и  $Mg^{2+}$ , для которого не наблюдается никаких изменений в активности препаратов лизостафина при всех исследованных концентрациях металла. Это наблюдаемое явление свидетельствует о насыщении всех сайтов связывания металлов в PGE и BSA-E, что нивелирует их взаимодействие с ионами металлов в активном центре лизостафина. Также, соответственно, при 200 мкМ и выше в реакционной смеси появляется некоторое количество несвязанных ионов металлов, которые могут взаимодействовать с активным центром лизостафина, что также может приводить к изменению активности препаратов лизостафина. При условии, что ни для одного иона металла не наблюдается явления самопроизвольного

разрушения PGE при отсутствии в реакционной смеси лизостафина (рисунки 4.16-4.21 (Г), 4.22 (В)), то наблюдаемое снижение оптической плотности реакционной смеси с течением времени в присутствии различных концентраций ионов металлов связано с действием белка. Однако также стоит отметить, что при добавлении ионов металлов в концентрации 200 мкМ и выше в той или иной степени наблюдается увеличение стартовых значений мутности реакционной смеси (причём, чем выше добавляемая концентрация ионов металла, тем сильнее возрастает мутность смеси). Это свидетельствует о том, что в реакционной смеси при этих условиях в той или иной степени происходит агрегация PGE, вплоть до их полного осаждения, что не позволяет провести эксперимент, например, при добавлении 5 мМ ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (рисунок 4.18) или 5 мМ ионов  $\text{Zn}^{2+}$  (рисунок 4.22).

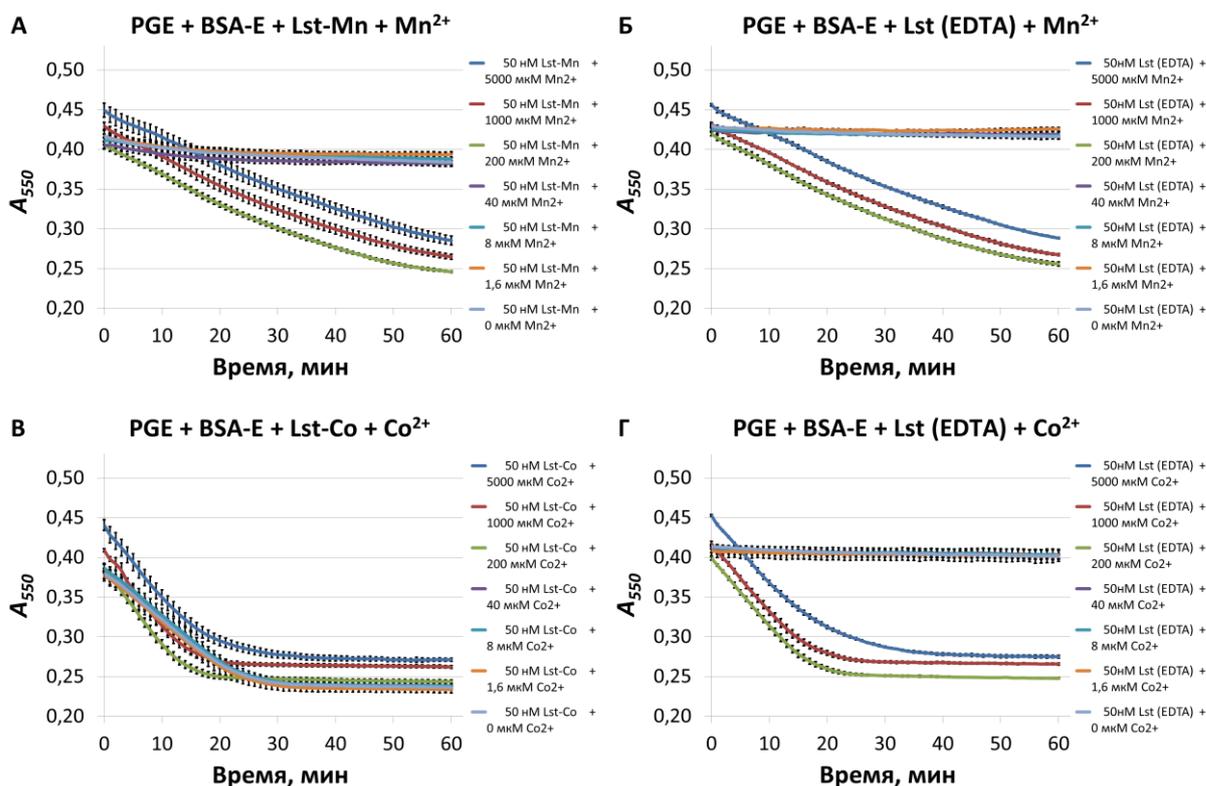
Добавление ионов  $\text{Mg}^{2+}$  (рисунок 4.19) не приводит к видимым изменениям в активности лизостафина, что с учетом данных о его каталитической активности свидетельствует о том, что ионы  $\text{Mg}^{2+}$  не связываются с активным центром лизостафина и/или препарат лизостафина с ионами  $\text{Mg}^{2+}$  не обладает каталитической активностью. Поскольку активность препарата лизостафина Lst-Mg остается постоянной, то не требуется дополнительное изучение его пептидогликанолитической активности при добавлении ионов  $\text{Mg}^{2+}$ .

Добавление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (рисунок 4.16) приводит к небольшому увеличению активности при добавлении 1 мМ ионов металла и выше для препаратов лизостафина Lst-Ca и Lst (EDTA). Однако следует отметить, что активность препаратов лизостафина Lst-Ca и Lst (EDTA) ионов  $\text{Ca}^{2+}$  значительно возрастает только к концу эксперимента и только в присутствии 5 мМ, и эта активность идентична для обоих препаратов лизостафина. Данное явление может объясняться крайне низкой аффинностью лизостафина к ионам  $\text{Ca}^{2+}$ , из-за чего фермент легко теряет их ещё на стадии приготовления препарата лизостафина Lst-Ca. В таком случае препараты лизостафина Lst-Ca и Lst (EDTA) слабо отличаются друг от друга с точки зрения имеющих ионов металлов в активном центре лизостафина и могут обладать сходным уровнем активности в одинаковых условиях. Поскольку существенное влияние на активность лизостафина возникает только при концентрации 5 мМ, при которой начинается активная преципитация PGE, то дальнейшее исследование пептидогликанолитической активности препарата лизостафина Lst-Ca не целесообразно, поскольку наблюдаемый эффект расщепления PGE под действием лизостафина будет конкурировать с процессами преципитации из-за добавления высоких концентраций ионов металла.

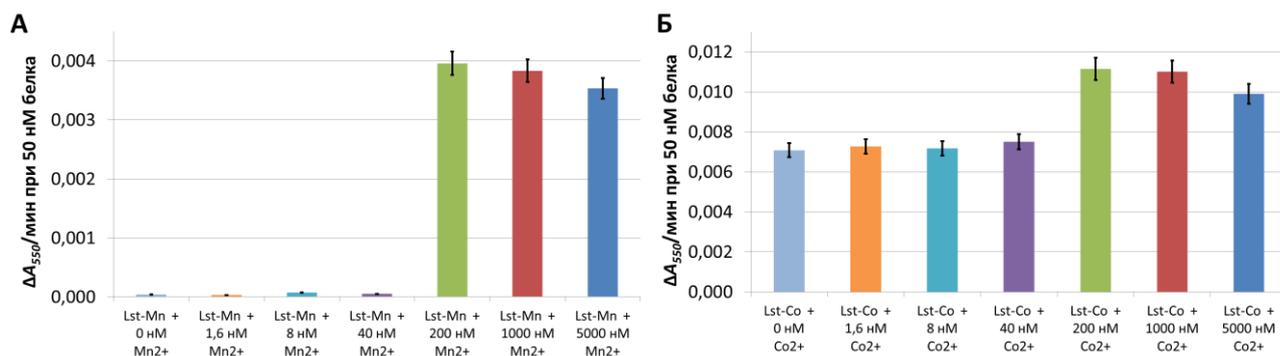
Добавление ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (рисунок 4.18 (А)),  $\text{Ni}^{2+}$  (рисунок 4.21 (А)) и  $\text{Zn}^{2+}$  (рисунок 4.22 (А)) в концентрации 200 мкМ и выше приводит к ингибированию активности соответствующих препаратов лизостафина, что, вероятно, свидетельствует о связывании

второго иона металла в активном центре белка. Это также делает нецелесообразным дополнительное изучение их пептидогликанолитической активности при добавлении к ним ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ .

Наиболее интересные результаты были получены при добавлении ионов  $\text{Mn}^{2+}$  к препаратам лизостафина Lst-Mn и Lst (EDTA), а также при добавлении ионов  $\text{Co}^{2+}$  к препаратам лизостафина Lst-Co и Lst (EDTA) (рисунок 4.23). При внесении ионов  $\text{Mn}^{2+}$  в концентрации 200 мкМ и выше наблюдается скачкообразное увеличение активности препаратов лизостафина Lst-Mn и Lst (EDTA) от почти полного отсутствия активности, которое наблюдается при добавлении меньших концентраций ионов  $\text{Mn}^{2+}$  (рисунок 4.23 (А,Б) и 4.24 (А)). Это свидетельствует об относительно невысокой аффинности лизостафина по отношению к ионам  $\text{Mn}^{2+}$ , но при этом рекомбинантный лизостафин с ионами  $\text{Mn}^{2+}$  в активном центре белка обладает средним уровнем активности, который обусловлен именно встраиванием ионов  $\text{Mn}^{2+}$  в активный центр лизостафина. Описанное скачкообразное увеличение активности наблюдается и при добавлении ионов  $\text{Co}^{2+}$  к препарату лизостафин Lst (EDTA), и, пусть и в несколько меньшей степени, при добавлении ионов  $\text{Co}^{2+}$  к препарату лизостафина Lst-Co (рисунок 4.24 (Б)), что также свидетельствует об относительно низкой аффинности лизостафина к указанным ионам металлов. Стоит отметить, что взаимодействие ионов  $\text{Co}^{2+}$  в активном центре препарата лизостафина Lst-Co с компонентами реакционной смеси не приводит к полной потере активности белка. При этом при дальнейшем увеличении концентрации обоих ионов металла, активность препаратов лизостафина начинает снижаться, что, вероятно, свидетельствует о связывании второго иона металла активным центром лизостафина, причём аффинность данного взаимодействия существенно ниже, чем связывание первого иона металла (рисунок 4.24).



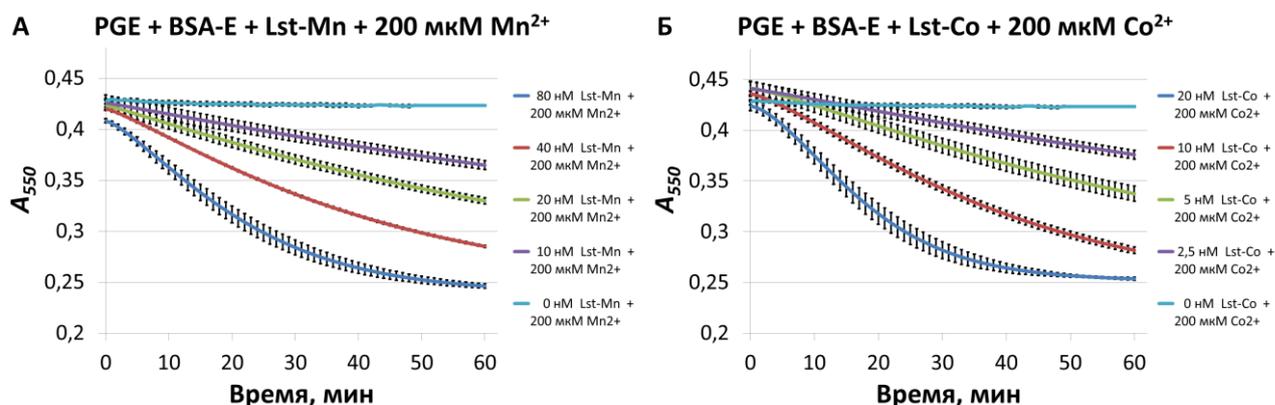
**Рисунок 4.23** – Кривые изменения оптической плотности суспензии PGE в присутствии BSA-E от времени для вариантов лизостафина Lst-Mn (А) и Lst (EDTA) (Б) при добавлении 0 мкМ, 1,6 мкМ, 8 мкМ, 40 мкМ, 200 мкМ, 1 мМ, 5 мМ ионов  $Mn^{2+}$  и для вариантов лизостафина Lst-Co (В) и Lst (EDTA) (Г) при добавлении 0 мкМ, 1,6 мкМ, 8 мкМ, 40 мкМ, 200 мкМ, 1 мМ, 5 мМ ионов  $Co^{2+}$ . Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.



**Рисунок 4.24** – Скорость просветления суспензии PGE в присутствии BSA-E под действием вариантов лизостафина Lst-Mn (А) и Lst-Co (Б) при добавлении различных количеств ионов  $Mn^{2+}$  и  $Co^{2+}$  соответственно. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

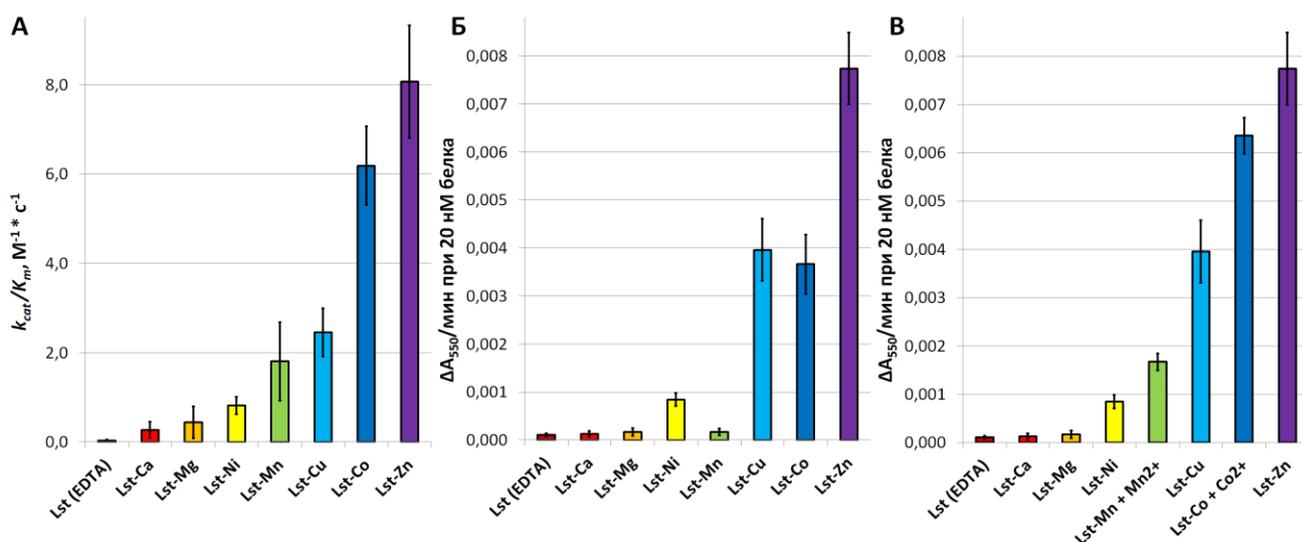
Исходя из этого, было необходимо дополнительно исследовать пептидогликанолитическую активность вариантов лизостафина Lst-Mn и Lst-Co с добавлением

в реакционную смесь 200 мкМ соответствующих ионов металлов при различной концентрации белка. Полученные кривые изменения оптической плотности суспензии PGE в присутствии BSA-E с добавлением 200 мкМ ионов  $\text{Co}^{2+}$  или  $\text{Mn}^{2+}$  под действием вариантов лизостафина Lst-Co или Lst-Mn соответственно от времени представлены на рисунке 4.25



**Рисунок 4.25 – Кривые изменения оптической плотности суспензии PGE в присутствии BSA-E от времени для варианта лизостафина Lst-Mn (А) при 80 нМ, 40 нМ, 20 нМ и 10 нМ белка в реакционной смеси и без добавления белка при добавлении 200 мкМ ионов  $\text{Mn}^{2+}$  и для варианта лизостафина Lst-Co (Б) при 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ и 2,5 нМ белка в реакционной смеси и без добавления белка при добавлении 200 мкМ ионов  $\text{Co}^{2+}$ . Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

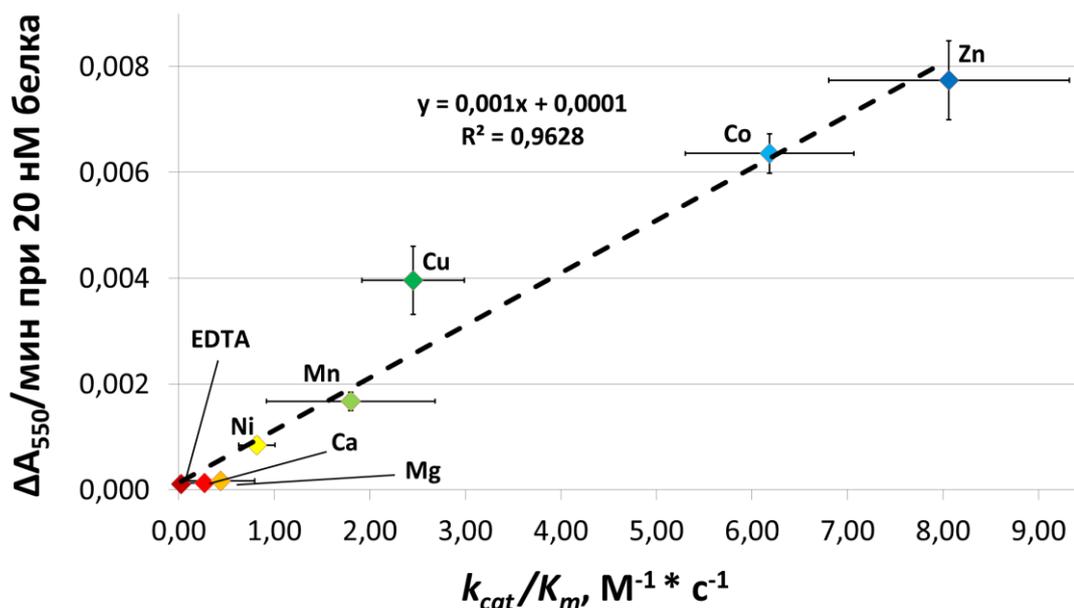
Пептидогликанолитическая активность в отношении PGE для варианта лизостафина Lst-Co в присутствии 200 мкМ ионов  $\text{Co}^{2+}$  и для варианта лизостафина Lst-Mn в присутствии 200 мкМ ионов  $\text{Mn}^{2+}$  при 20 нМ белков составила  $0,0064 \pm 0,0004$  (3)  $\Delta A_{550}/\text{мин}$  и  $0,0017 \pm 0,0002$  (3)  $\Delta A_{550}/\text{мин}$  соответственно. В совокупности с результатами исследования пептидогликанолитической активности остальных вариантов лизостафина с ионами различных металлов в отношении PGE без дополнительного добавления ионов металлов можно заметить соответствие тенденций изменения каталитической и пептидогликанолитической активности лизостафина в зависимости от иона металла, связанного в активном центре белка (рисунок 4.26).



**Рисунок 4.26 – Сравнение каталитической эффективности вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре белка (А), и их пептидогликанолитической активности без добавления ионов металлов (Б) и с добавлением ионов  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  к соответствующим вариантам лизостафина (В). Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

4.2.6 Исследование соотношения между уровнями каталитической и пептидогликанолитической активностей вариантов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре белка

Для исследования соотношения между уровнями каталитической и пептидогликанолитической активностей вариантов рекомбинантного лизостафина был построен график зависимости пептидогликанолитической активности вариантов лизостафина, выраженной в виде скорости просветления суспензии PGE при 20 нМ белка (для вариантов Lst-Co и Lst-Mn использовали скорость просветления суспензии при 20 нМ белка в присутствии 200 мкМ соответствующих ионов металлов), от их каталитической эффективности (рисунок 4.27).



**Рисунок 4.27 – Зависимость пептидогликанолитической активности вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента от их каталитической эффективности и аппроксимирующая её прямая. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

Полученная зависимость пептидогликанолитической активности вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента от их каталитической эффективности хорошо описываются прямой линией с уравнением (4.6):

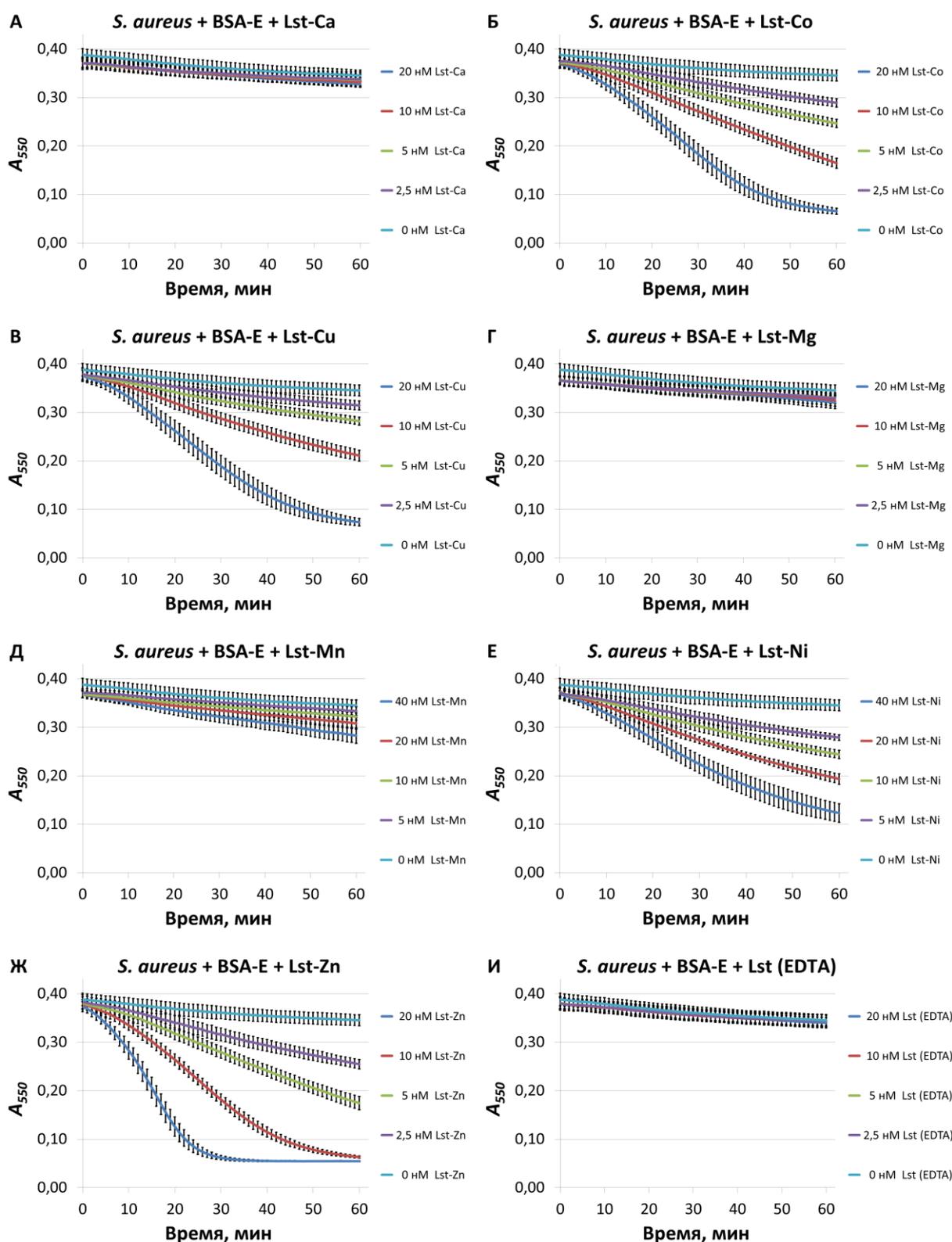
$$PGE_{act} = 0,001 * \frac{k_{cat}}{K_M} + 0,0001, \quad (4.6)$$

где  $PGE_{act}$  — пептидогликанолитическая активность,  $\Delta A_{550}/\text{мин}$ .

#### 4.2.7 Исследование бактериолитической активности вариантов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов с использованием интактных клеток *S. aureus*

Экспериментальные данные пептидогликанолитической активности лизостафина полученные с использованием суспензии PGE в качестве хорошо детерминированной экспериментальной системы хорошо коррелируют с данными каталитической активности с использованием изолированного пентаглицина в качестве субстрата. Однако было интересно исследовать активность вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента ещё и в отношении интактных клетках *S. aureus* и определить, как полученные данные бактериолитической активности вариантов лизостафина соотносятся с результатами их пептидогликанолитической и каталитической активностей.

Для изучения бактериолитической активности вариантов лизостафина Lst-Ca, Lst-Co, Lst-Cu, Lst-Mg, Lst-Mn, Lst-Ni, Lst-Zn и Lst (EDTA) адаптировали метод определения пептидогликанолитической активности лизостафина под использование интактных клеток *S. aureus* вместо суспензии PGE. Эксперименты проводили в присутствии BSA-E при различных концентрациях белков. Полученные кривые изменения оптической плотности клеточной суспензии от времени под действием различных концентраций соответствующих вариантов лизостафина представлены на рисунке 4.28.



**Рисунок 4.28** – Кривые изменения оптической плотности клеточной суспензии *S. aureus* в присутствии BSA-E от времени для вариантов лизостафина Lst-Ca (А), Lst-Co (Б), Lst-Cu (В), Lst-Mg (Г), Lst-Mn (Д), Lst-Ni (Е), Lst-Zn (Ж) и Lst (EDTA) (И) при различной концентрации белка. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

Усреднённые данные бактериолитической активности вариантов лизостафина с ионами

различных металлов в активном центре белка в виде скорости просветления клеточной суспензии *S. aureus* в присутствии BSA-E при 20 нМ белков представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Бактериолитическая активность вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента в присутствии BSA-E

Вариант лизостафина	Скорость просветления клеточной суспензии <i>S. aureus</i> при 20 нМ белка, $\Delta A_{550}/\text{мин}$
Lst (EDTA)	$0,0001 \pm 0,0001$ (3)
Lst-Ca	$0,0001 \pm 0,0001$ (3)
Lst-Co	$0,0073 \pm 0,0007$ (3)
Lst-Cu	$0,0069 \pm 0,0005$ (3)
Lst-Mg	$0,0001 \pm 0,0001$ (3)
Lst-Mn	$0,0004 \pm 0,0002$ (3)
Lst-Ni	$0,0028 \pm 0,0001$ (3)
Lst-Zn	$0,0164 \pm 0,0011$ (3)

Если сравнить между собой данные пептидогликанолитической активности вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента без добавления ионов металлов в реакционную смесь (таблица 2) с данными их бактериолитической активности в аналогичных условиях (таблица 3) можно отметить сходную динамику их изменения (рисунок 4.29).

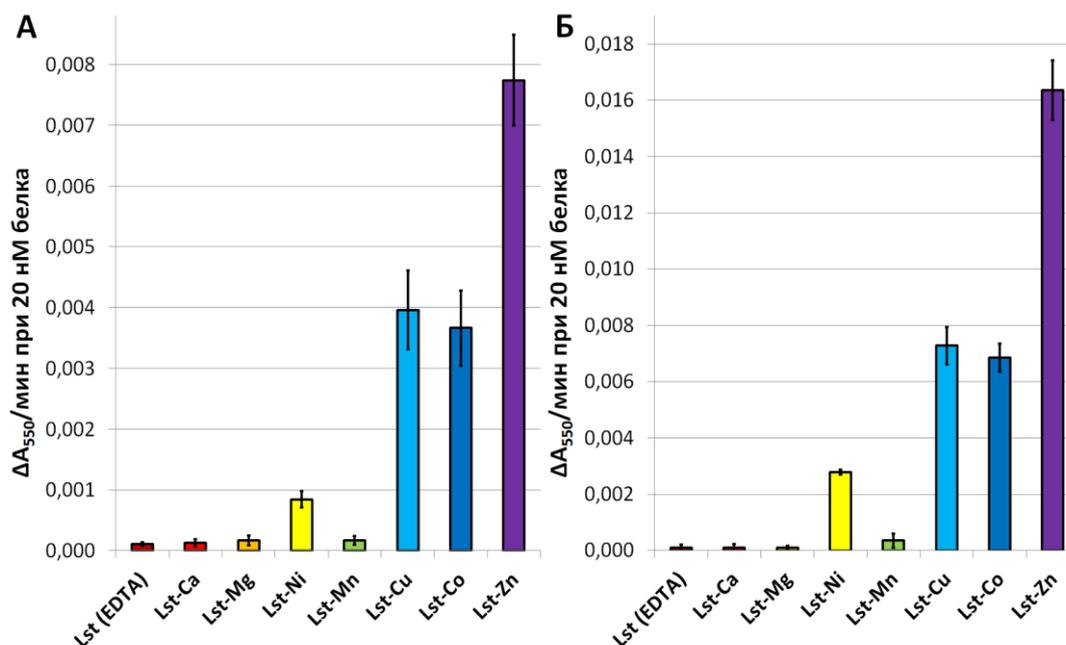
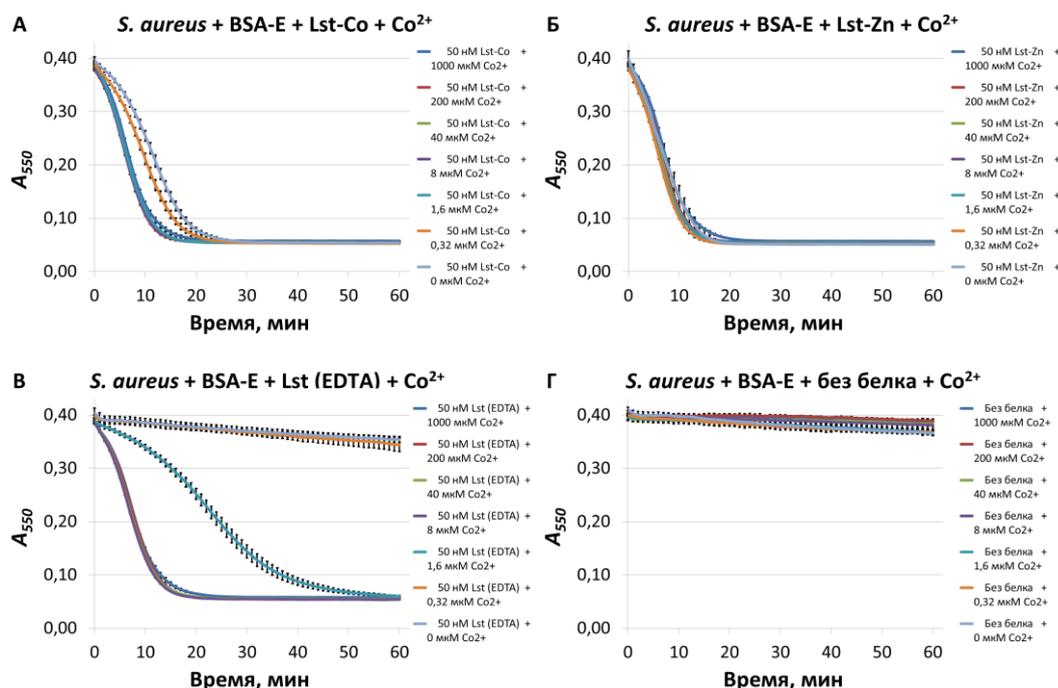


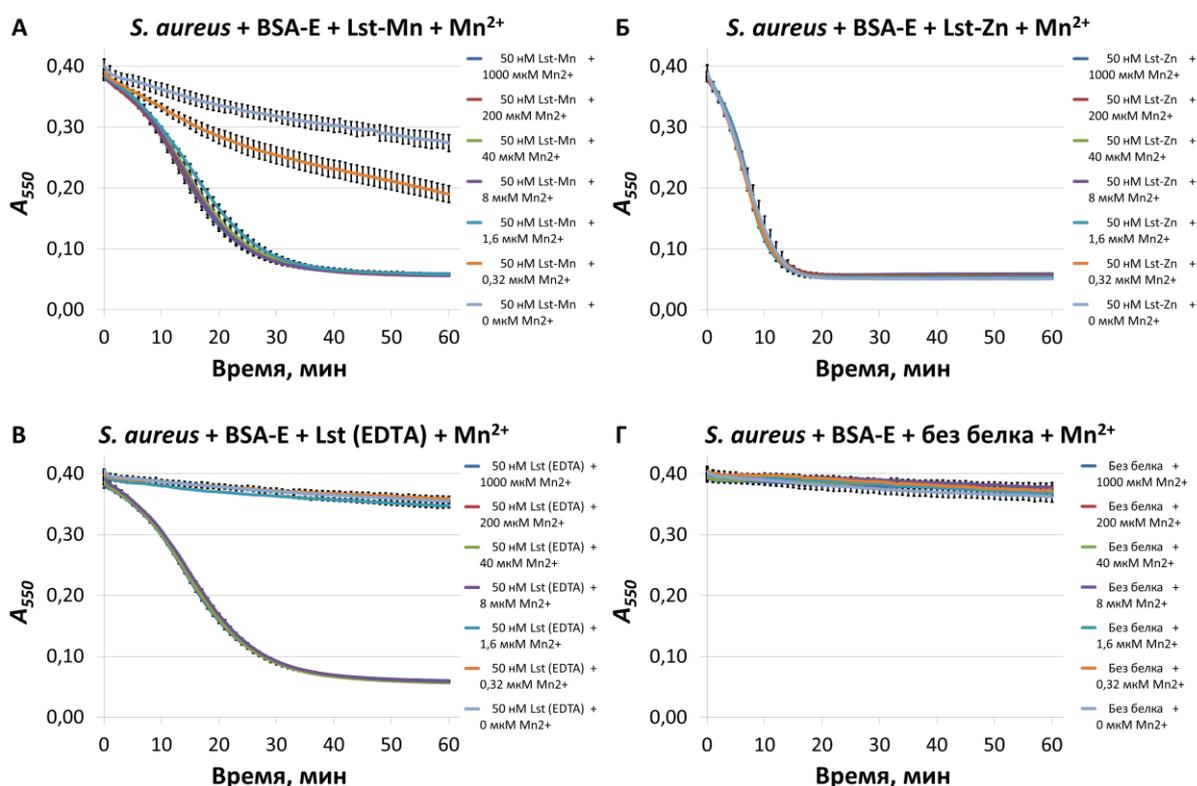
Рисунок 4.29 – Сравнение пептидогликанолитической (А) и бактериолитической (Б) активности вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

Из этого следует логичное предположение, что аналогично пептидогликанолитической активности с использованием PGE наблюдаемая бактериолитическая активность вариантов лизостафина Lst-Co и Lst-Mn может отличаться от реальной из-за взаимодействия компонентов реакционной смеси с ионами металлов в активном центре лизостафина вследствие относительно низкой аффинности лизостафина к ионам данных металлов. В связи с этим необходимо исследовать бактериолитическую активность указанных вариантов лизостафина в присутствии соответствующих ионов металлов. Для остальных вариантов лизостафина добавление соответствующих ионов металлов, вероятно, либо не приведет к изменению активности варианта лизостафина, либо вызовет уменьшение активности вследствие связывания второго иона металла активным центром фермента.

Для определения концентрации ионов металлов, которые необходимо добавить в реакционную смесь для исследования бактериолитической активности вариантов лизостафина Lst-Co и Lst-Mn в присутствии соответствующих ионов металлов по аналогии с исследованием пептидогликанолитической активности добавляли различные количества необходимых ионов металлов. Кривые изменения оптической плотности клеточной суспензии *S. aureus* в присутствии BSA-E с добавлением ионов  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  в различных концентрациях от времени представлены на рисунках 4.30 и 4.31.



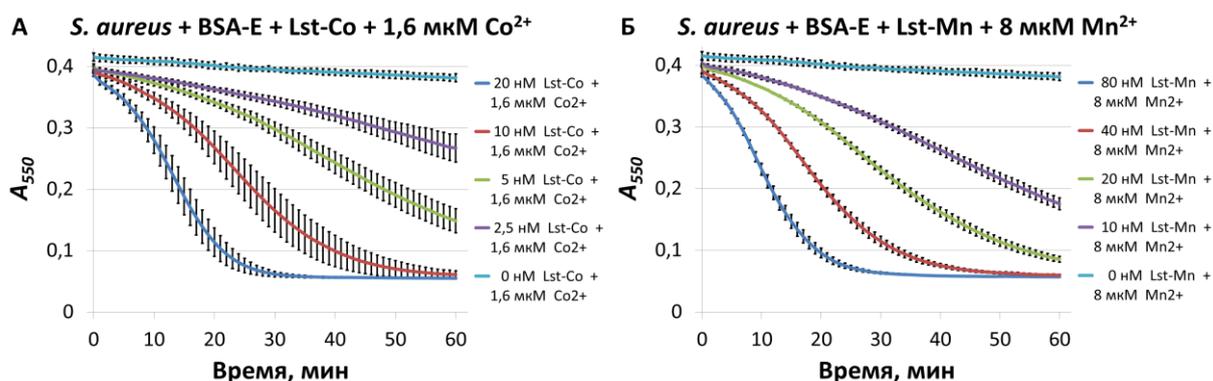
**Рисунок 4.30** – Кривые изменения оптической плотности клеточной суспензии *S. aureus* от времени в присутствии BSA-E под действием варианта лизостафина Lst-Co (А), Lst-Zn (Б), Lst (EDTA) (В) и без добавления белка (Г) при добавлении 0 мкМ, 0,32 мкМ, 1,6 мкМ, 8 мкМ, 40 мкМ, 200 мкМ, 1 мМ ионов  $\text{Co}^{2+}$ . Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.



**Рисунок 4.31 –Кривые изменения оптической плотности клеточной суспензии *S. aureus* от времени в присутствии BSA-E под действием варианта лизостафина Lst-Mn (А), Lst-Zn (Б), Lst (EDTA) (В) и без добавления белка (Г) при добавлении 0 мкМ, 0,32 мкМ, 1,6 мкМ, 8 мкМ, 40 мкМ, 200 мкМ, 1 мМ ионов  $Mn^{2+}$ . Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

Полученные данные подтверждают предположение о том, что значения бактериолитической активности вариантов лизостафина Lst-Co и Lst-Mn занижены, аналогично занижению пептидогликанолитической активности этих вариантов лизостафина. При этом концентрация, при которой наступает насыщение компонентов реакционной среды ионами металлов, составляет 1,6 мкМ для ионов  $Co^{2+}$  и 8 мкМ для ионов  $Mn^{2+}$ . Существующие расхождения в необходимой для насыщения смеси концентрации ионов различных металлов наглядно демонстрирует различия в аффинности данных металлов по отношению к лизостафину и компонентам реакционной смеси.

Исходя из этого, бактериолитическую активность вариантов лизостафина Lst-Co и Lst-Mn исследовали с использованием интактных клеток *S. aureus* в присутствии BSA-E при добавлении 1,6 мкМ ионов  $Co^{2+}$  или 8 мкМ ионов  $Mn^{2+}$  соответственно. Соответствующие кривые изменения оптической плотности клеточной суспензии *S. aureus* от времени представлены на рисунке 4.32.

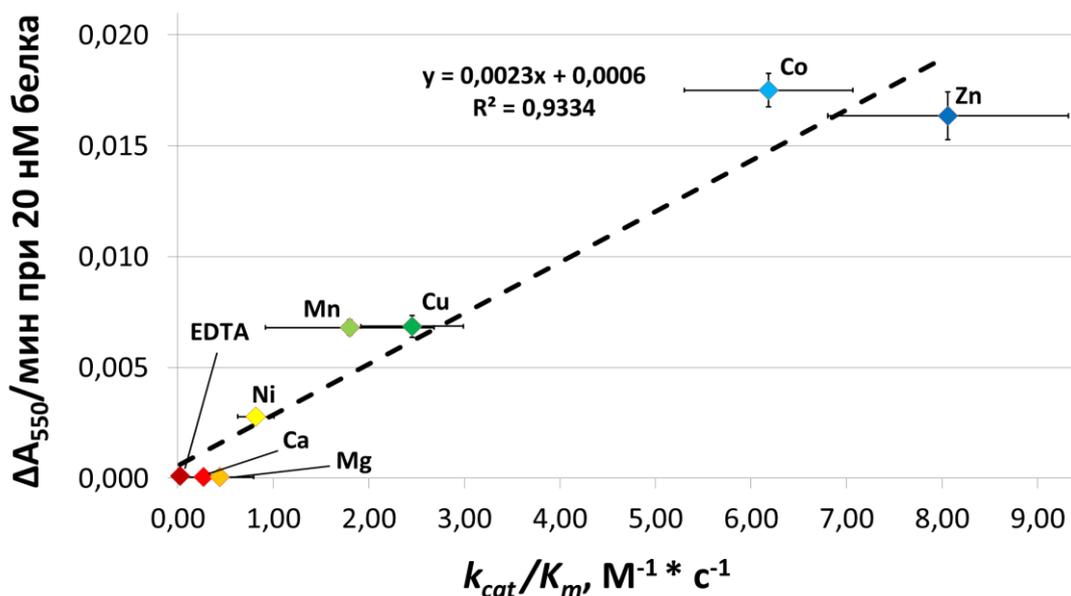


**Рисунок 4.32 – Кривые изменения оптической плотности клеточной суспензии *S. aureus* от времени в присутствии BSA-E для варианта лизоцифина Lst- Co (А) при 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ и 2,5 нМ белка в реакционной смеси и без добавления белка при добавлении 1,6 мкМ  $\text{Co}^{2+}$  и для варианта лизоцифина Lst-Mn (Б) при 80 нМ, 40 нМ, 20 нМ и 10 нМ белка в реакционной смеси и без добавления белка при добавлении 8 мкМ  $\text{Mn}^{2+}$ . Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

Значения бактериолитической активности вариантов лизоцифина Lst-Co и Lst-Mn в присутствии BSA-E и 1,6 мкМ ионов  $\text{Co}^{2+}$  или 8 мкМ ионов  $\text{Mn}^{2+}$ , выраженные в виде скорости просветления клеточной суспензии *S. aureus* при 20 нМ белков, составили соответственно  $0,0175 \pm 0,0008$  (3)  $\Delta A_{550}/\text{мин}$  и  $0,0068 \pm 0,0004$  (3)  $\Delta A_{550}/\text{мин}$ .

4.2.8 Исследование соотношения между уровнями каталитической и бактериолитической активностей вариантов рекомбинантного лизоцифина с ионами различных металлов в активном центре белка

Для исследования соотношения между уровнями каталитической и бактериолитической активностей вариантов рекомбинантного лизоцифина был построен график зависимости бактериолитической активности вариантов лизоцифина, выраженной в виде скорости просветления бактериальной клеточной суспензии *S. aureus* при 20 нМ белка (для вариантов Lst-Co и Lst-Mn использовали скорость просветления клеточной суспензии при 20 нМ белка в присутствии 1,6 мкМ ионов  $\text{Co}^{2+}$  или 8 мкМ ионов  $\text{Mn}^{2+}$  соответственно), от их каталитической эффективности (рисунок 4.33).



**Рисунок 4.33 – Зависимость бактериолитической активности вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента от их каталитической эффективности и аппроксимирующая её прямая. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

Полученная зависимость бактериолитической активности вариантов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента от их каталитической эффективности хорошо описывается прямой линией с уравнением (4.7) и коррелирует с аналогичной зависимостью их пептидогликанолитической активности.

$$Cell_{act} = 0,0023 * \frac{k_{cat}}{K_M} + 0,0006 , \quad (4.7)$$

где  $Cell_{act}$  — бактериолитическая активность,  $\Delta A_{550}/\text{мин}$ .

Система исследования, основанная на использовании суспензии интактных клеток *S. aureus*, сложна, и невозможно досконально описать и учесть все происходящие в ней процессы. Несмотря на это, результаты исследования бактериолитической активности с её использованием не противоречат результатам, полученным с использованием других методов, а наоборот, дополняют и расширяют их, что приводит к углублению понимания закономерностей в работе антибактериальных лизинов.

Таким образом, в результате проведенных исследований были получены варианты рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента, которые вследствие этого обладают различным уровнем каталитической, пептидогликанолитической и бактериолитической активностей. При помощи разработанного

метода определения каталитической активности лизостафина с использованием пентаглицина в качестве субстрата, а также адаптированных методов определения пептидогликанолитической и бактериолитической активности лизостафина на основе снижения мутности суспензии изолированных клеточных оболочек *S. aureus* и интактных бактериальных клеток *S. aureus* соответственно, было показано, что каталитическая, пептидогликанолитическая и бактериолитическая активность лизостафина после замены иона  $Zn^{2+}$  в активном центре на ионы  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Co^{2+}$  изменяется от практически нулевых значений для ионов кальция и магния до значений, сравнимых с нативным цинксодержащим белком, для ионов кобальта. В случае вариантов лизостафина с ионами  $Co^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  (но не другими ионами) в активном центре экспериментально продемонстрировано активное взаимодействие клеточных оболочек с этими ионами металлов в активном центре лизостафина, что приводит к снижению их пептидогликанолитической и бактериолитической активности. Из этого можно предположить, что лизостафин обладает относительно низкой аффинностью по отношению к этим ионам. Кроме того, данное явление необходимо учитывать, как при планировании и проведении экспериментов по изучению активности антибактериальных лизинов с использованием обычных методов, основанных на снижении мутности реакционной смеси вследствие действия белка, так и при интерпретации полученных результатов.

Установленная линейная зависимость, как для уровня пептидогликанолитической, так и для уровня бактериолитической активностей лизостафина от уровня его каталитической активности показывает целесообразность улучшения характеристик каталитической части генно-инженерных химерных лизинов на основе лизостафина для разработки новых эффективных антибактериальных лекарственных соединений.

Отдельно стоит отметить продемонстрированное существенное снижение активности лизостафина при встраивании в его активный центр иона  $Ni^{2+}$  вместо нативного иона  $Zn^{2+}$  с учетом возможности встраивания второго иона  $Ni^{2+}$  в дополнение к иону металла, уже связанному с активным центром фермента. Лизостафин, как и другие металл-зависимые белки, часто выделяют при помощи металл-хелатных аффинных хроматографических сорбентов, например, с использованием полигистидиновых меток для очистки при помощи Ni-NTA. В то же время аффинность связывания иона металла с сорбентом зависит от иона металла, а также от количества и типа функциональных групп, удерживающих его на сорбенте. При этом если аффинность рекомбинантного белка к иону металла на сорбенте окажется выше аффинности хелатирующих его групп, то белок помимо взаимодействия с хелатированными на сорбенте ионами металлов для удержания белка на нём будет способен отнимать ионы металлов, связанные с сорбентом, и/или обменивать их на ионы металлов, связанных непосредственно с

белком. Это может приводить к связыванию дополнительных ионов металлов молекулами белка и/или замещению уже связанных с ним ионов металлов, что в случае лизостафина с его каталитическим ионом  $Zn^{2+}$  может повлиять на его активность. Исходя из этого, было интересно изучить, влияет ли выделение лизостафина (цинк-зависимой эндопептидазы) при помощи никель-хелатирующих сорбентов для аффинной хроматографии на активность получаемого препарата лизостафина, что ранее не было систематически исследовано.

### 4.3 Исследование влияния хроматографического сорбента на активность рекомбинантного лизостафина<sup>3</sup>

#### 4.3.1 Выбор хроматографических сорбентов

Для исследования влияния хроматографического сорбента на каталитическую и бактериолитическую активность рекомбинантного лизостафина были выбраны три обычно используемых металл-хелатных сорбента с различными функциональными группами, координирующими ион металла (таблица 4) [200].

Таблица 4. Характеристики хроматографических сорбентов

Сорбент	Характеристика хроматографического сорбента	Препарат лизостафина
WorkBeads 40S	Катионообменный сорбент	Lst-Cex
WorkBeads NiMAC	Никель-хелатный сорбент, характеризуемый производителем как сорбент с сильным связыванием ионов никеля частицами сорбента (высокие показатели силы связывания ионов никеля)	Lst-NiMAC
WorkBeads 40 Ni-NTA	Наиболее широко используемый никель-хелатный сорбент с 4 координирующими ион металла функциональными группами (средние показатели силы связывания ионов никеля)	Lst-NTA
WorkBeads 40 Ni-IDA	Никель-хелатный сорбент с 3 координирующими ион металла функциональными группами (низкие показатели силы связывания ионов никеля)	Lst-IDA

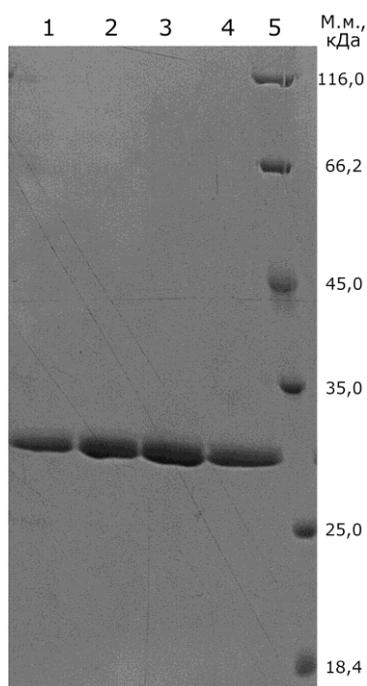
<sup>3</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: **Shestak N.V.**, Grishin A.V., Lyashchuk A.M., Lunin V.G., Karyagina A.S. The choice of chromatographic resin for the purification of recombinant lysostaphin affects its activity.// Protein Expression and Purification. — 2023. — Vol. 207, № 106274. — P. 1—6. JIF (для WoS)=1.4, (0,69/0,55).

Сорбенты на основе IDA имеют три связи, координирующие ион металла, и, соответственно, относительно слабо связывают ионы металлов. Сорбенты на основе NTA координируют ионы металлов четырьмя связями и, следовательно, способны к более прочному связыванию ионов металлов, по сравнению с сорбентами на основе IDA. Наконец, для сорбента WorkBeads NiMAC производитель не раскрывает тип хелатирующей группы, координирующей ион металла на сорбенте, но позиционирует его как сорбент с исключительно сильным связыванием ионов металлов, устойчивым к действию ЭДТА вплоть до 20 мМ. В качестве контроля использовали катионообменный сорбент WorkBeads 40S.

#### 4.3.2 Получение препаратов рекомбинантного лизостафина с 6xHis-tag с использованием различных хроматографических сорбентов

Для изучения влияния различных никель-хелатных хроматографических сорбентов на активность лизостафина, выделенного с их помощью, использовали рекомбинантный лизостафин из *S. simulans* с 6xHis-tag, синтезированный с использованием стандартных биоинженерных подходов. Препараты рекомбинантного лизостафина с 6xHis-tag получали при помощи предварительного осаждения целевого белка при помощи 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  с последующей очисткой целевого белка с использованием катионообменного сорбента WorkBeads 40S и трёх никель-хелатных хроматографических сорбентов – WorkBeads NiMAC, WorkBeads 40 Ni NTA и WorkBeads 40 Ni IDA с различной силой связывания ионов никеля.

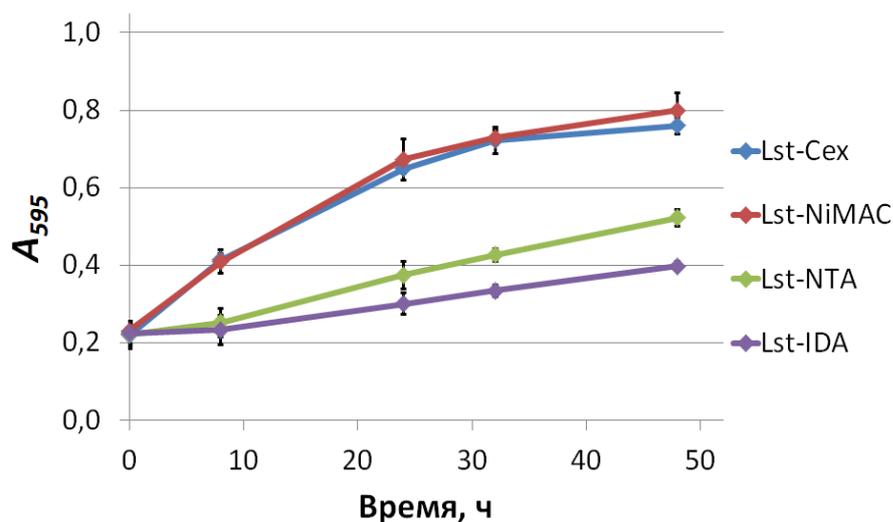
Чистота полученных препаратов лизостафина составляет >95% (рисунок 4.34), выход белка составляет порядка 1,8 мг белка с 1 г биомассы штамма-продуцента.



**Рисунок 4.34** – Анализ чистоты препаратов рекомбинантного лизостафина с 6xHis-tag полученных с использованием различных хроматографических сорбентов при помощи электрофореза в 12% ПААГ. (1) – Препарат *Lst-Cex*; (2) – Препарат *Lst-NiMAC*; (3) – Препарат *Lst-NTA*; (4) – *Lst-IDA*; (5) – Маркер молекулярных масс *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (14,4 - 116,0 кДа).

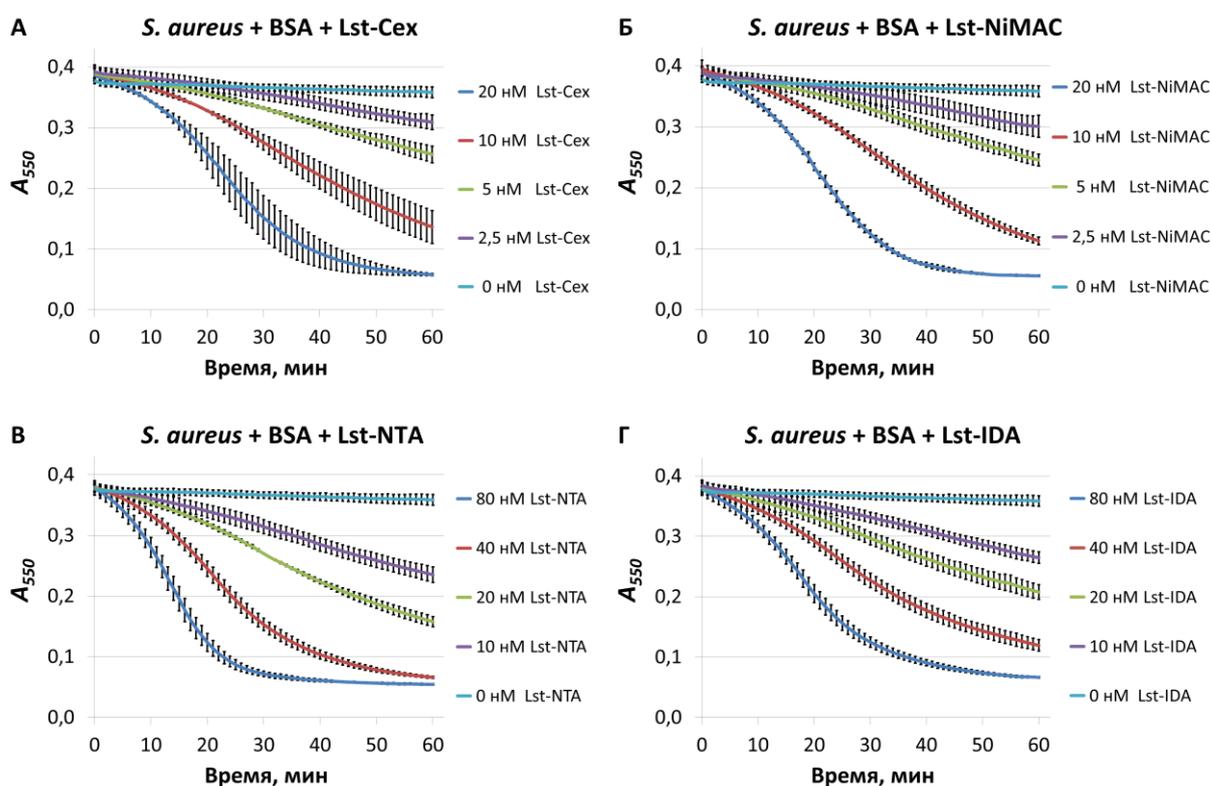
4.3.3 Исследование каталитической и бактериолитической активности препаратов рекомбинантного лизостафина, выделенных с использованием различных хроматографических сорбентов

Каталитическую активность препаратов лизостафина *Lst-Cex*, *Lst-NiMAC*, *Lst-NTA* и *Lst-IDA* исследовали с использованием разработанного метода. Оптическая плотность окрашенных нингидрином проб реакционных смесей представлена на рисунке 4.35.



**Рисунок 4.35 – Зависимости оптической плотности окрашенных нингидрином проб реакционных смесей пентаглицина с препаратами лизостафина, выделенными с использованием различных хроматографических сорбентов, от времени. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

Бактериолитическую активность препаратов лизостафина Lst-Cex, Lst-NiMAC, Lst-NTA и Lst-IDA исследовали по просветлению клеточной суспензии *S. aureus* при различной концентрации белков. Кривые изменения оптической плотности реакционной смеси от времени для различных концентраций препаратов лизостафина Lst-Cex, Lst-NiMAC, Lst-NTA и Lst-IDA представлены на рисунке 4.36.



**Рисунок 4.36 – Кривые зависимости оптической плотности клеточной суспензии *S. aureus* от времени в присутствии BSA под действием препарата лизостафина Lst-Cex (А) и Lst-NiMAC (Б) при 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ и 0 нМ белка в реакционной смеси, Lst-NTA (В) и Lst-IDA (Г) при 80 нМ, 40 нМ, 20 нМ, 10 нМ и 0 нМ белка в реакционной смеси. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.**

Рассчитанные для препаратов лизостафина Lst-Cex, Lst-NiMAC, Lst-NTA и Lst-IDA значения каталитической эффективности  $k_{cat}/K_M$ , а также значения скорости просветления клеточной суспензии *S. aureus* при 20 нМ белка приведены в таблице 5 в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение, в скобках приведено количество независимых экспериментов.

**Таблица 5 – Каталитическая и бактериолитическая активность препаратов лизостафина, выделенных с использованием катионообменного и никель-хелатных сорбентов**

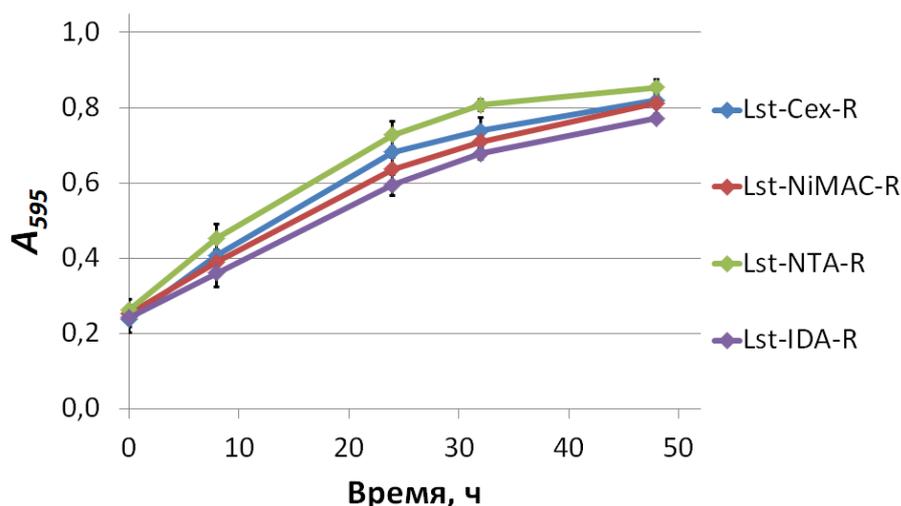
Вариант лизостафина	$k_{cat}/K_M, \text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	Скорость просветления клеточной суспензии <i>S. aureus</i> при 20 нМ белка, $\Delta A_{550}/\text{мин}$
Lst-Cex	$5,0 \pm 0,9$ (4)	$0,0110 \pm 0,0020$ (3)
Lst-NiMAC	$5,3 \pm 0,7$ (4)	$0,0124 \pm 0,0008$ (3)
Lst-NTA	$1,5 \pm 0,2$ (4)	$0,0051 \pm 0,0002$ (3)
Lst-IDA	$0,8 \pm 0,1$ (4)	$0,0036 \pm 0,0001$ (3)

В результате было определено, что, как каталитическая, так и бактериолитическая активность препаратов лизоафрина, выделенных при помощи катионообменного сорбента и никель-хелатного сорбента WorkBeads NiMAC, практически не отличаются друг от друга и существенно отличаются от активности препаратов лизоафрина, полученных с использованием никель-хелатных сорбентов Lst-NTA и Lst-IDA. Это свидетельствует в пользу выдвинутой гипотезы о том, что выделение лизоафрина с использованием никель-хелатных аффинных хроматографических сорбентах может приводить к снижению активности рекомбинантного белка. При этом, чем меньше сила связывания ионов никеля с сорбента, тем сильнее снижается активность рекомбинантного лизоафрина. Подобное явление, вероятно, наблюдается из-за взаимодействия лизоафрина с ионами никеля, адсорбированными на сорбенте, что при недостаточной аффинности сорбента к ионам никеля может привести к встраиванию иона  $Ni^{2+}$  вторым ионом металла в активный центр лизоафрина и/или замещению нативного иона  $Zn^{2+}$  на ион  $Ni^{2+}$ . Оба этих явления в конечном итоге приводят к снижению активности лизоафрина и могут объяснять наблюдаемое падение активности препаратов лизоафрина, выделенных с использованием никель-хелатных сорбентов со средним и слабым связыванием ионов металла. Из этого следует, что если падение активности препаратов лизоафрина вызвано именно изменением состава ионов металлов в активном центре фермента, то возможно восстановить их активность путем обработки ЭДТА для удаления всех связанных ионов металлов с последующим встраиванием нативного иона  $Zn^{2+}$ .

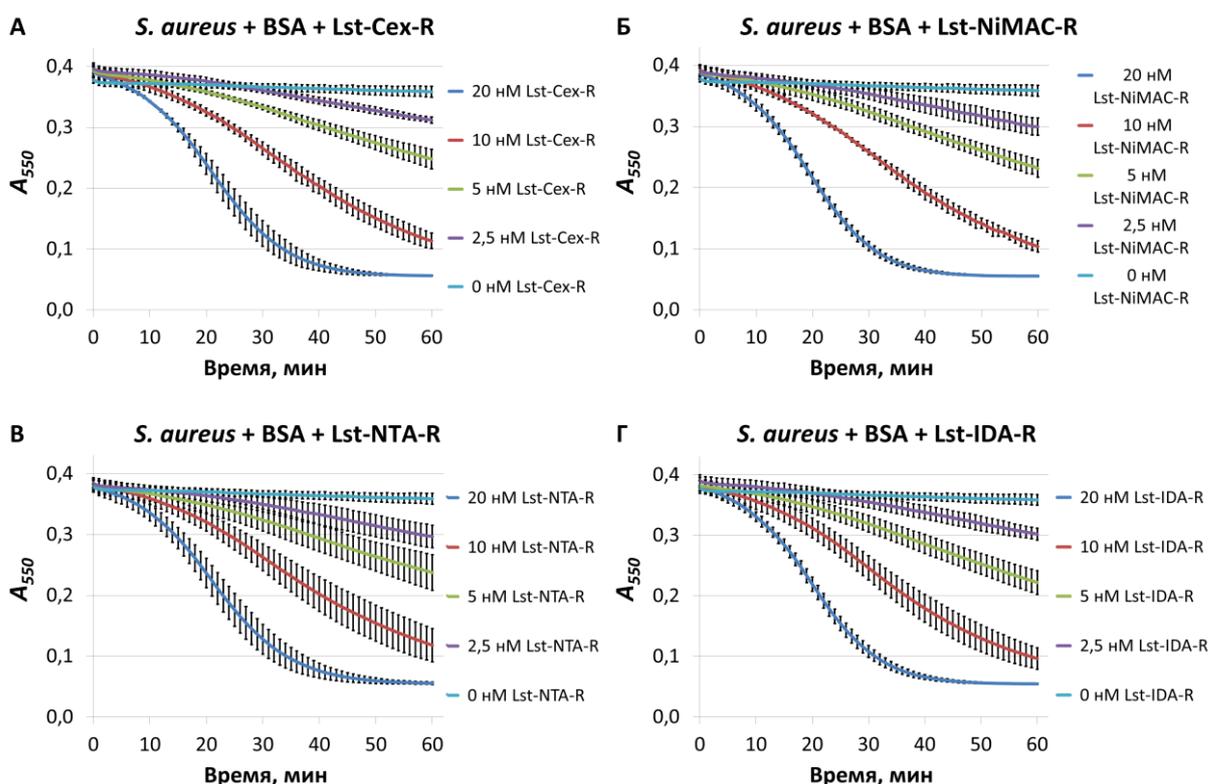
4.3.4 Восстановление активности препаратов лизоафрина, выделенных с использованием различных хроматографических сорбентов и исследование их каталитической и бактериолитической активности

Для восстановления каталитической активности препараты лизоафрина Lst-Cex, Lst-NiMAC, Lst-NTA и Lst-IDA обработали ЭДТА для удаления всех ионов металлов, а затем при помощи  $ZnSO_4$  включили ионы  $Zn^{2+}$  в активный центр лизоафрина. В результате получили соответственно препараты лизоафрина Lst-Cex-R, Lst-NiMAC-R, Lst-NTA-R и Lst-IDA-R с предположительно восстановленной активностью.

Аналогично исследованию активности препаратов лизоафрина Lst-Cex, Lst-NiMAC, Lst-NTA и Lst-IDA с не восстановленной активностью провели исследование и оценку каталитической и бактериолитической активности препаратов лизоафрина Lst-Cex-R, Lst-NiMAC-R, Lst-NTA-R и Lst-IDA-R с восстановленной активностью. Полученные результаты представлены на рисунках 4.37 и 4.38, а также в таблице 6.



**Рисунок 4.37 –** Зависимости оптической плотности окрашенных нингидрином проб реакционных смесей пентаглицина с препаратами лизостафина Lst-Cex-R, Lst-NiMAC-R, Lst-NTA-R и Lst-IDA-R, выделенных с использованием различных хроматографических сорбентов, с восстановленной активностью от времени. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.



**Рисунок 4.38 –** Кривые зависимости оптической плотности клеточной суспензии *S. aureus* от времени под действием препарата лизостафина Lst-Cex-R (А), Lst-NiMAC-R (Б), Lst-NTA-R (В) и Lst-IDA-R (Г) при 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ и 0 нМ белка в реакционной смеси. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

Таблица 6 – Каталитическая и бактериолитическая активность препаратов лизоафрина, выделенных с использованием катионообменного и никель-хелатных сорбентов, с восстановленной активностью

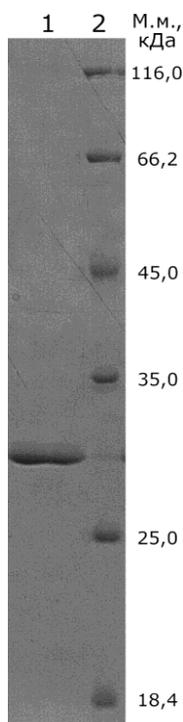
Вариант лизоафрина	$k_{cat}/K_M, M^{-1} \cdot c^{-1}$	Скорость просветления клеточной суспензии <i>S. aureus</i> при 20 нМ белка, $\Delta A_{550}/\text{мин}$
Lst-Cex-R	$5,6 \pm 1,0$ (4)	$0,0128 \pm 0,0014$ (3)
Lst-NiMAC-R	$4,5 \pm 0,5$ (4)	$0,0138 \pm 0,0005$ (3)
Lst-NTA-R	$4,6 \pm 0,6$ (4)	$0,0120 \pm 0,0010$ (3)
Lst-IDA-R	$5,4 \pm 0,7$ (4)	$0,0134 \pm 0,0005$ (3)

После восстановления активности препаратов лизоафрина Lst-Cex, Lst-NiMAC, Lst-NTA и Lst-IDA каталитическая и бактериолитическая активность препаратов лизоафрина Lst-Cex-R, Lst-NiMAC-R, Lst-NTA-R и Lst-IDA-R с восстановленной активностью статистически не различалась между собой. При этом каталитическая и бактериолитическая активность этих препаратов была идентична активности препаратов лизоафрина Lst-Cex и Lst-NiMAC до восстановления активности. Эти результаты подтверждают предположение о том, что снижение активности препаратов лизоафрина Lst-NTA и Lst-IDA связано с взаимодействием каталитического центра лизоафрина с ионами никеля, адсорбированными на сорбенте, приводящим к изменению состава ионов металлов в активном центре лизоафрина.

4.3.5 Получение препарата рекомбинантного лизоафрина с 6xHis-tag с использованием цинк-хелатного хроматографического сорбента и исследование его каталитической и бактериолитической активности

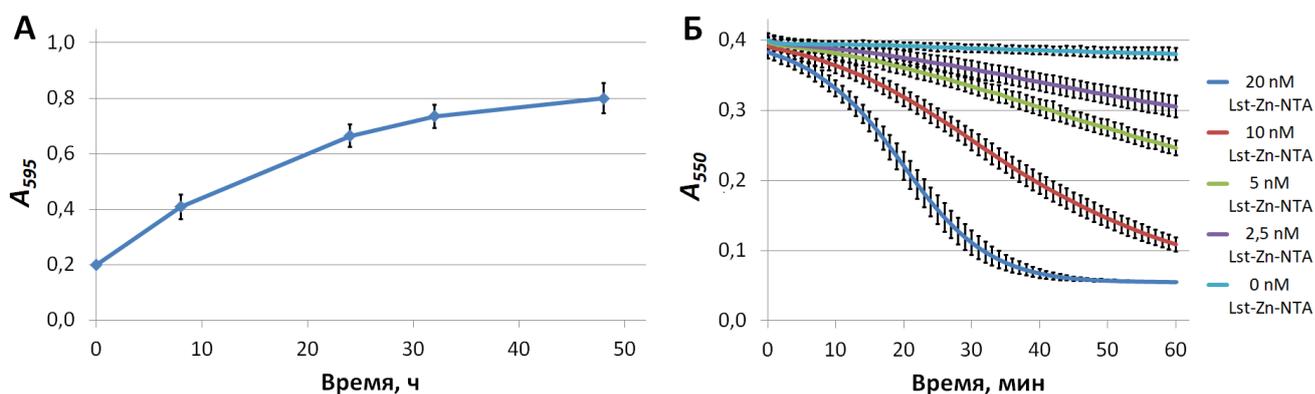
При выделении лизоафрина на сорбентах с ионами никеля было показано снижение активности белка. Вероятно, использование сорбента с ионами  $Zn^{2+}$  вместо ионов  $Ni^{2+}$  позволит с одной стороны получить препарат чистого белка, а с другой – не потерять его активность. Для проверки данного предположения было решено выделить и очистить препарат рекомбинантного лизоафрина с 6xHis-tag при помощи цинк-хелатного аффинного хроматографического сорбента. Поскольку сила удерживания ионов  $Zn^{2+}$  функциональными группами сорбента ниже, чем для ионов  $Ni^{2+}$ , то использование хроматографического сорбента с 3 координирующими ион металла связями (IDA) представлялось нецелесообразным. Поэтому было принято решение использовать хроматографический сорбент с более сильным удерживанием ионов металлов за счет большего количества связей, координирующих ион металла на сорбенте (NTA). Для этого в соответствии с протоколом компании-производителя при помощи ЭДТА удалили ионы  $Ni^{2+}$  из сорбента WorkBeads 40 Ni-NTA и затем загрузили

сорбент ионами  $Zn^{2+}$ . В результате был получен цинк-хелатный хроматографический сорбент Zn-NTA, который использовали для очистки рекомбинантного лизостафина с 6xHis-tag (препарат лизостафина Lst-Zn-NTA, чистота препарата >95%, рисунок 4.39).



**Рисунок 4.39 – Анализ чистоты препаратов рекомбинантного лизостафина с 6xHis-tag полученных с использованием различных хроматографических сорбентов при помощи электрофореза в 12% ПААГ. (1) – Препарат Lst-Zn-NTA; (2) – Маркер молекулярных масс Unstained Protein Molecular Weight Marker (14,4 - 116,0 кДа).**

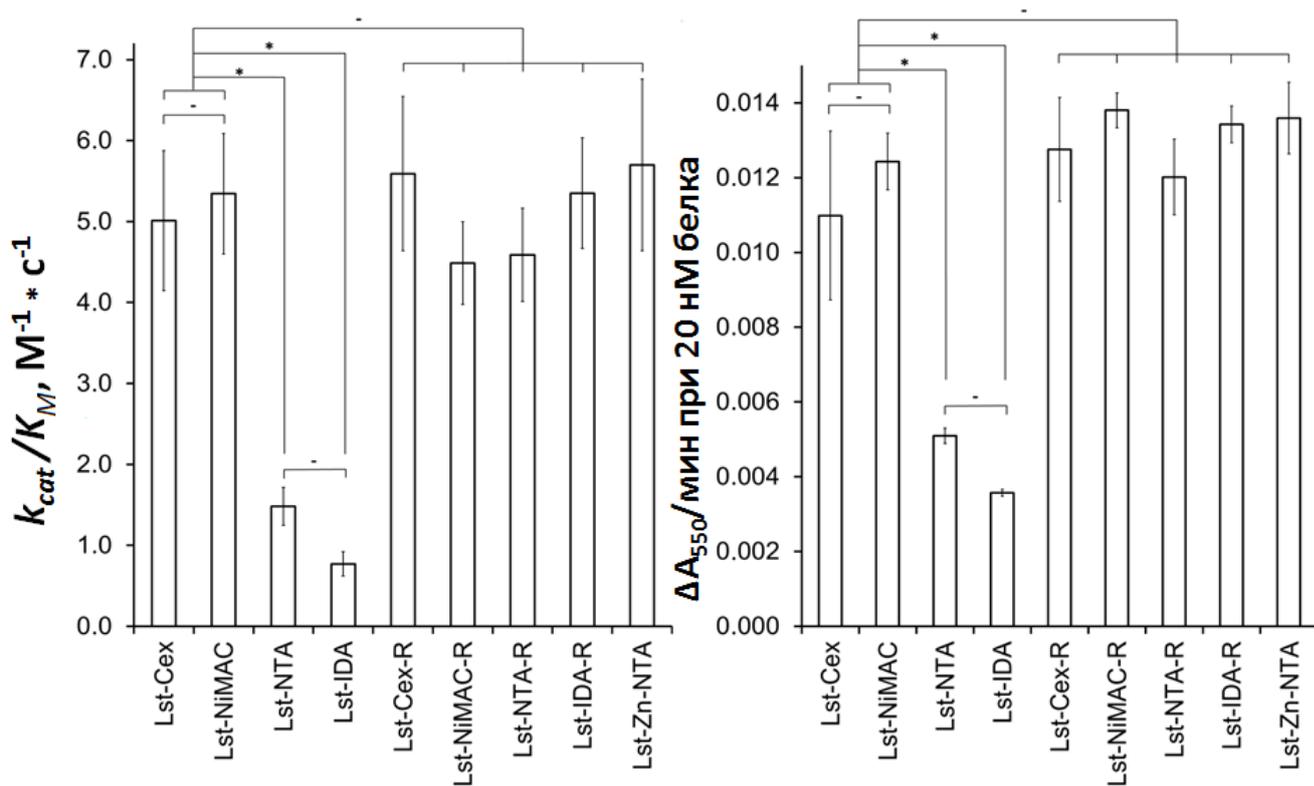
Каталитическая эффективность препарата лизостафина Lst-Zn-NTA составила  $5,7 \pm 1,1$  (6)  $M^{-1} \cdot c^{-1}$ , а бактериолитическая активность –  $0,0136 \pm 0,0010$  (6)  $\Delta A_{550}/мин$  (рисунок 4.40). Полученные значения статистически не отличались от значений каталитической и бактериолитической активности препаратов лизостафина Lst-Cex, Lst-NiMAC и всех препаратов лизостафина с восстановленной активностью, что позволяет использовать цинк-хелатный аффинный хроматографический сорбент Zn-NTA для получения чистого и полнофункционального лизостафина.



**Рисунок 4.40 – Оптическая плотность окрашенных нингидрином проб реакционной смеси препарата лизостафина Lst-Zn-NTA с изолированным пентаглицерином в качестве субстрата для изучения его каталитической активности (А). Оптическая плотность реакционной смеси 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ и 0 нМ препарата лизостафина Lst-Zn-NTA с суспензией бактериальных клеток *S. aureus* для изучения его бактериолитической активности (Б). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение в результате шести независимых экспериментов.**

В результате проведённых экспериментов было показано снижение как каталитической, так и бактериолитической активности рекомбинантного лизостафина, выделенного при помощи никель-хелатных сорбентов со средней и слабой силой связывания ионом  $Ni^{2+}$  функциональными группами сорбента (рисунок 4.41). Это снижение активности связано с взаимодействием лизостафина с ионами никеля, координированными функциональными группами сорбента, что приводит к замещению нативного иона  $Zn^{2+}$  в активном центре каталитического домена лизостафина ионом  $Ni^{2+}$  и/или, возможно, связыванию второго иона металла, причём оба этих явления, как вместе, так и по отдельности, приводят к снижению активности лизостафина.

Также было показано, что полнофункциональный лизостафин можно получить при помощи восстановления его активности с использованием обработки ЭДТА с последующим встраиванием в активный центр фермента нативного иона  $Zn^{2+}$ . Альтернативно полнофункциональный лизостафин можно получить при использовании для его выделения и очистки никель-хелатных сорбентов с исключительно сильным связыванием ионов  $Ni^{2+}$  или путем использования цинк-хелатного сорбента на основе NTA. Полученные результаты могут быть использованы при получении не только лизостафина и других антибактериальных лизоцинов, но и других металл-зависимых ферментов, как для их лабораторного исследования, так и для разработки промышленных способов их выделения и очистки.



**Рисунок 4.41 – Каталитическая (А) и бактериолитическая (Б) активность препаратов лизостафина, очищенных на различных сорбентах, до и после обработки ЭДТА и цинком.**

*Столбики погрешностей показывают стандартное отклонение, полученное в результате трёх-шести независимых экспериментов. Звездочки (\*) указывают на достоверные различия, прочерки (-) указывают на отсутствие достоверных различий.*

## 5 Заключение

Антибиотикоустойчивые штаммы патогенных бактерий являются одной из основных проблем современного здравоохранения. В связи с этим перед исследователями во всем мире стоит актуальная задача по разработке новых антибактериальных агентов, способных бороться с такими устойчивыми бактериями, в частности со штаммами MRSA. Одним из перспективных классов соединений, подходящих для создания на их основе антибактериальных препаратов нового поколения, являются лизины. Лизины – это ферменты, способные разрушать различные связи в структуре пептидогликана в клеточной стенке бактерии, что приводит к её осмотическому лизису. Одним из наиболее изученных антибактериальных лизинов является лизостафин, расщепляющий пентаглициновые поперечные мостики между стволовыми пептидами в пептидогликане. Лизостафин состоит из N-концевого каталитического и C-концевого пептидогликан-связывающего доменов, отвечающих за каталитическую функцию гидролиза глицил-глициновых связей и связывание белка с клеточной стенкой соответственно. На каталитическую активность лизостафина оказывает существенное влияние ион  $Zn^{2+}$ , связанный в активном центре белка. Его замена на ионы других металлов, равно как и связывание второго иона металла активным центром лизостафина, значительно изменяет активность фермента. Существующие методы изучения активности лизостафина можно разделить на две группы. Первая основана на турбидиметрических методах по просветлению клеточной суспензии и показывает кумулятивную бактериолитическую активность белка как результат совместного действия обоих доменов лизостафина. Для второй группы методов используют различные синтетические субстраты, чтобы нивелировать влияние пептидогликан-связывающего домена лизостафина на его активность. В результате данные активности лизостафина, получаемые разными методами, существенно различаются между собой, что не позволяет правильно оценивать полученные результаты и сравнивать их с результатами, полученными для других белков. Несмотря на большое число исследований, посвящённых изучению активности лизостафина, ранее не была исследована зависимость между бактериолитической и каталитической активностью, позволяющая разграничить относительное влияние каталитического и пептидогликан-связывающего домена лизостафина на наблюдаемый уровень его активности, что необходимо для эффективной разработки антибактериальных лизинов с новыми свойствами.

В результате проведённых исследований был разработан простой и недорогостоящий метод определения каталитической активности лизостафина с использованием изолированного

пентаглицина в качестве субстрата при помощи хромогенной реакции с нингидрином. Разработанный метод использует немодифицированный пентаглицин в качестве субстрата, и, следовательно, на получаемое значение параметра каталитической эффективности не оказывает влияние пептидогликан-связывающий домен лизостафина. Кроме того, данный метод может быть адаптирован для исследования не только лизостафина, но и других эндопептидаз, что позволит сравнивать их каталитическую активность по отношению к различным субстратам между собой. Это в перспективе может оказаться полезным для разработки эффективных антибактериальных препаратов на основе природных и синтетических лизинов. Также при разработке данного метода было показано существенное различие между каталитической эффективностью по отношению к изолированному и встроенному в клеточную стенку бактерии пентаглицину. Это подтверждает относительный вклад различных доменов лизостафина в его кумулятивную активность по отношению к интактным клеткам *S. aureus*, а сам метод позволяет упростить разграничение влияния различных доменов лизостафина на его активность, что также может оказать положительное влияние на разработку и производство новых антибактериальных лекарственных препаратов на основе лизинов.

При исследовании активности рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента была установлена линейная зависимость как пептидогликанолитической, так и бактериолитической активности лизостафина от его каталитической эффективности. Также было показано изменение каталитической, пептидогликанолитической и бактериолитической активности лизостафина при изменении иона металла в его активном центре. Кроме того, из результатов экспериментов следует относительно низкая аффинность связывания активного центра лизостафина с ионами  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ , что приводит к активному взаимодействию данных ионов в активном центре белка с компонентами реакционной смеси, в которой исследуется активность лизостафина, такими, как BSA, пептидогликановые оболочки или интактные клетки стафилококка, и, следовательно, к занижению наблюдаемого уровня активности белка. Стоит отметить, что продемонстрированный уровень активности лизостафина с ионом  $\text{Ni}^{2+}$  в активном центре фермента оказался существенно ниже уровня активности лизостафина с нативным ионом  $\text{Zn}^{2+}$ . В совокупности с тем, что рекомбинантный лизостафин часто выделяют при помощи металл-хелатных хроматографических сорбентов, в частности активно используемых для этого никель-хелатных хроматографических сорбентов (например, Ni-IDA и Ni-NTA), для которых характерно относительно низкое связывание ионов металлов с функциональными группами сорбента для осуществления эффективной очистки белка, это приводит к ранее систематически не исследованной гипотезе о том, что ионы металла с сорбента, вероятно, способны диссоциировать с него и встраиваться в активный центр лизостафина (или присоединяться в качестве второго иона), что может привести

к изменению уровня его активности.

В результате проведённых исследований влияния металл-хелатных аффинных хроматографических сорбентов на активность рекомбинантного лизоцифа было показано, что при низкой силе связывания ионов  $\text{Ni}^{2+}$  частицами сорбента они способны взаимодействовать с активным центром лизоцифа, что приводит к падению его активности. При этом показано, что данное явление происходит именно из-за ионов  $\text{Ni}^{2+}$  с хроматографического сорбента. Избежать изменения активности лизоцифа в результате данного явления можно при помощи использования никель-хелатных сорбентов с высокой силой связывания ионов  $\text{Ni}^{2+}$ , что не позволяет им диссоциировать с сорбента, или путем использования цинк-хелатных сорбентов. Для последних целесообразно не использовать сорбенты с низким связыванием ионов металлов, например, сорбенты на основе IDA, чтобы исключить возможность перераспределения ионов  $\text{Zn}^{2+}$  с хроматографического сорбента в активный центр лизоцифа. Альтернативным способом получения лизоцифа с полной активностью является использование разработанного метода восстановления активности лизоцифа при помощи обработки ЭДТА с последующим встраиванием нативного иона  $\text{Zn}^{2+}$  в активный центр лизоцифа. Разработанные подходы к хроматографической очистке лизоцифа и восстановлению его активности могут быть использованы в целях стандартизации и производства высокоактивных препаратов лизоцифа, а также для разработки новых поколений лекарственных средств против инфекционных заболеваний, вызванных *S. aureus*.

## Основные результаты и выводы

1. Разработанный новый метод на основе хромогенной реакции с нингидрином с использованием пентаглицина в качестве субстрата позволяет эффективно определять каталитическую активность вариантов рекомбинантного лизостафина.

2. Специально адаптированные методы, основанные на снижении мутности суспензии изолированных клеточных оболочек *S. aureus* и интактных бактериальных клеток *S. aureus*, применимы для определения соответственно пептидогликанолитической и бактериолитической активности вариантов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре.

3. Каталитическая, пептидогликанолитическая и бактериолитическая активность лизостафина после замены иона  $Zn^{2+}$  в активном центре на ионы других металлов варьирует от практически нулевых значений в случае  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  до значений, сравнимых с нативным цинк-содержащим белком, в случае  $Co^{2+}$ . Взаимодействие клеточных оболочек с ионами  $Co^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  активного центра соответствующих вариантов лизостафина существенно снижает их пептидогликанолитическую и бактериолитическую активности, вероятно, из-за относительно низкой аффинности лизостафина по отношению к этим ионам.

4. Зависимости пептидогликанолитической и бактериолитической активностей лизостафина от его каталитической эффективности носят линейный характер.

5. Хроматографическая очистка лизостафина с использованием никель-хелатных хроматографических сорбентов с малым числом координационных связей, удерживающих ион металла (Ni-NTA и Ni-IDA), существенно снижает его каталитическую и бактериолитическую активности за счет замещения иона  $Zn^{2+}$  ионом  $Ni^{2+}$  в активном центре и/или, возможно, связывания второго иона металла, ингибирующего активность белка.

6. Разработанный метод, основанный на замене ионов металлов в активном центре на нативный ион  $Zn^{2+}$ , способствует полному восстановлению активности лизостафина после его очистки с использованием никель-хелатных хроматографических сорбентов, и может быть адаптирован для других металлсодержащих белков.

## Список литературы

1. Tong S.Y.C.C., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2015. Vol. 28, № 3. P. 603–661.
2. Turner N.A., Sharma-Kuinkel B.K., Maskarinec S.A., Eichenberger E.M., Shah P.P., Carugati M., Holland T.L., Fowler V.G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research // *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. Vol. 17, № 4. P. 203–218.
3. Urish K.L., Cassat J.E. *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis: Bone, Bugs, and Surgery // *Infect. Immun.* 2020. Vol. 88, № 7. P. 1–43.
4. Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections // *New Engl. J. Med. Rev.* 1998. Vol. 339, № 8. P. 520–532.
5. Jaradat Z.W., Ababneh Q.O., Sha'aban S.T., Alkofahi A.A., Assaleh D., Al Shara A. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and public fomites: a review // *Pathog. Glob. Health.* 2020. Vol. 114, № 8. P. 426–450.
6. Dufresne K., Podskalnyi V.A., Herfst C.A., Lovell G.F.M., Lee I.S., DeJong E.N., McCormick J.K., Tuffs S.W. Glucose Mediates Niche-Specific Repression of *Staphylococcus aureus* Toxic Shock Syndrome Toxin-1 through the Activity of CcpA in the Vaginal Environment // *J. Bacteriol.* 2022. Vol. 204, № 10. P. 1–16.
7. Lowy F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus* // *J. Clin. Invest.* 2003. Vol. 111, № 9. P. 1265–1273.
8. Giulieri S.G., Tong S.Y.C., Williamson D.A. Using genomics to understand methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infections // *Microb. Genomics.* 2020. Vol. 6, № 1. P. 1–15.
9. Barber M., Rozwadowska-Dowzenko M. Infection by Penicillin-resistant *Staphylococci* // *Lancet.* 1948. Vol. 2, № 6530. P. 641–644.
10. Rivera A.M., Boucher H.W. Current concepts in antimicrobial therapy against select gram-positive organisms: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, penicillin-resistant *pneumococci*, and vancomycin-resistant *enterococci* // *Mayo Clin. Proc.* 2011. Vol. 86, № 12. P. 1230–1243.

11. Chambers H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? // *Emerg. Infect. Dis.* 2001. Vol. 7, № 2. P. 178–182.
12. Dajcs J.J., Thibodeaux B.A., Girgis D.O., Shaffer M.D., Delvisco S.M., O’Callaghan R.J. Immunity to lysostaphin and its therapeutic value for ocular MRSA infections in the rabbit // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002. Vol. 43, № 12. P. 3712–3716.
13. Gilmer D.B., Schmitz J.E., Euler C.W., Fischetti V.A. Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by *Streptococcus pyogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. Vol. 57, № 6. P. 2743–2750.
14. Daniel A., Euler C., Collin M., Chahales P., Gorelick K.J., Fischetti V.A. Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. Vol. 54, № 4. P. 1603–1612.
15. Schindler C.A., Schuhardt V.T. Purification and properties of lysostaphin — A lytic agent for *Staphylococcus aureus* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1965. Vol. 97. P. 242–250.
16. Askari N., Ahmad S., Abhishek, Waris A., Malakar M. Lysostaphin as an alternate therapy in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) induced endophthalmitis: An experimental study // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2014. Vol. 6, № 2. P. 173–175.
17. Chen C., Fan H., Huang Y., Peng F., Fan H., Yuan S., Tong Y. Recombinant Lysostaphin Protects Mice from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pneumonia // *Biomed Res. Int.* 2014. Vol. 2014. P. 1–10.
18. Shah A., Mond J., Walsh S. Lysostaphin-coated catheters eradicate *Staphylococcus aureus* challenge and block surface colonization // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. Vol. 48, № 7. P. 2704–2707.
19. Warfield R., Bardelang P., Saunders H., Chan W.C., Penfold C., James R., Thomas N.R. Internally quenched peptides for the study of lysostaphin: An antimicrobial protease that kills *Staphylococcus aureus* // *Org. Biomol. Chem.* 2006. Vol. 4, № 19. P. 3626–3638.
20. Bardelang P., Vankemmelbeke M., Zhang Y., Jarvis H., Antoniadou E., Rochette S., Thomas N.R., Penfold C.N., James R. Design of a polypeptide FRET substrate that facilitates study of the antimicrobial protease lysostaphin // *Biochem. J.* 2009. Vol. 418, № 3. P. 615–624.
21. Sabala I., Jagielska E., Bardelang P.T., Czapinska H., Dahms S.O., Sharpe J.A., James R., Than M.E., Thomas N.R., Bochtler M. Crystal structure of the antimicrobial peptidase lysostaphin

from *Staphylococcus simulans* // *FEBS J.* 2014. Vol. 281. P. 4112–4122.

22. Dajcs J.J., Thibodeaux B.A., Hume E.B.H., Zheng X., Sloop G.D., O'Callaghan R.J. Lysostaphin is effective in treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endophthalmitis in the rabbit // *Curr. Eye Res.* 2001. Vol. 22, № 6. P. 451–457.

23. Dajcs J.J., Hume E.B.H., Moreau J.M., Caballero A.R., Cannon B.M., O'Callaghan R.J. Lysostaphin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis in the rabbit // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000. Vol. 41, № 6. P. 1432–1437.

24. Bastos M. do C. de F., Coutinho B.G., Coelho M.L.V. Lysostaphin: A staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications // *Pharmaceuticals.* 2010. Vol. 3, № 4. P. 1139–1161.

25. Placencia F.X., Kong L., Weisman L.E. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatal mice: Lysostaphin versus vancomycin // *Pediatr. Res.* 2009. Vol. 65, № 4. P. 420–424.

26. Kokai-Kun J.F., Chanturiya T., Mond J.J. Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice // *J. Antimicrob. Chemother.* 2009. Vol. 64, № 1. P. 94–100.

27. Kokai-Kun J.F., Walsh S.M., Chanturiya T., Mond J.J. Lysostaphin cream eradicates *Staphylococcus aureus* nasal colonization in a cotton rat model // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. Vol. 47, № 5. P. 1589–1597.

28. Wu J.A., Kusuma C., Mond J.J., Kokai-Kun J.F. Lysostaphin Disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms on Artificial Surfaces // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. Vol. 47, № 11. P. 3407–3414.

29. Kokai-Kun J.F. Lysostaphin: a silver bullet for staph. // *Antimicrobial drug discovery: emerging strategies.* 2012. P. 147–165.

30. Kokai-Kun J.F., Chanturiya T., Mond J.J. Lysostaphin as a treatment for systemic *Staphylococcus aureus* infection in a mouse model // *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. Vol. 60, № 5. P. 1051–1059.

31. Jayakumar J., Kumar V.A., Biswas L., Biswas R. Therapeutic applications of lysostaphin against *Staphylococcus aureus* // *J. Appl. Microbiol.* 2020. Vol. 131, № 3. P. 1072–1082.

32. Grabowska M., Jagielska E., Czapinska H., Bochtler M., Sabala I. High resolution structure of an M23 peptidase with a substrate analogue // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. P. 1–8.

33. Spencer J., Murphy L.M., Connors R., Sessions R.B., Gamblin S.J. Crystal structure of the lasA virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*: Substrate specificity and mechanism of M23 metallopeptidases // *J. Mol. Biol.* 2010. Vol. 396, № 4. P. 908–923.
34. Xing M., Simmonds R.S., Timkovich R. Solution Structure of the Cys74 to Ala74 Mutant of the Recombinant Catalytic Domain of Zoocin A // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2016. Vol. 85, № 1. P. 177–181.
35. Min K., An D.R., Yoon H.J., Rana N., Park J.S., Kim J., Lee M., Heseck D., Ryu S., Kim B.M., Mobashery S., Suh S.W., Lee H.H. Peptidoglycan reshaping by a noncanonical peptidase for helical cell shape in *Campylobacter jejuni* // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 1–12.
36. Tossavainen H., Raulinaitis V., Kauppinen L., Pentikäinen U., Maaheimo H., Permi P. Structural and Functional Insights Into Lysostaphin–Substrate Interaction // *Front. Mol. Biosci.* 2018. Vol. 5. P. 1–14.
37. Raulinaitis V., Tossavainen H., Aitio O., Juuti J.T., Hiramatsu K., Kontinen V., Permi P. Identification and structural characterization of LytU, a unique peptidoglycan endopeptidase from the lysostaphin family // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–14.
38. Firczuk M., Mucha A., Bochtler M. Crystal structures of active LytM // *J. Mol. Biol.* 2005. Vol. 354, № 3. P. 578–590.
39. Sudiarta I.P., Fukushima T., Sekiguchi J. *Bacillus subtilis* CwlP of the Sp-β prophage has two novel peptidoglycan hydrolase domains, muramidase and cross-linkage digesting DD-endopeptidase // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285, № 53. P. 41232–41243.
40. Kusuma C.M., Kokai-Kun J.F. Comparison of four methods for determining lysostaphin susceptibility of various strains of *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. Vol. 49, № 8. P. 3256–3263.
41. Boksha I.S., Lavrova N. V., Grishin A. V., Demidenko A. V., Lyashchuk A.M., Galushkina Z.M., Ovchinnikov R.S., Umyarov A.M., Avetisian L.R., Chernukha M.I., Shaginian I.A., Lunin V.G., Karyagina A.S. *Staphylococcus simulans* recombinant lysostaphin: Production, purification, and determination of antistaphylococcal activity // *Biochem.* 2016. Vol. 81, № 5. P. 502–510.
42. Zhao H., Blazanovic K., Choi Y., Bailey-Kellogg C., Griswold K.E. Gene and protein sequence optimization for high-level production of fully active and aglycosylated lysostaphin in *Pichia pastoris* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. Vol. 80, № 9. P. 2746–2753.

43. Jagielska E., Chojnacka O., Sabała I. LytM fusion with SH3b-like domain expands its activity to physiological conditions // *Microb. Drug Resist.* 2016. Vol. 22, № 6. P. 461–469.
44. Shen W., Yang N., Teng D., Hao Y., Ma X., Mao R., Wang J. Design and High Expression of Non-glycosylated Lysostaphins in *Pichia pastoris* and Their Pharmacodynamic Study // *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 12. P. 1–16.
45. Szweda P., Kotłowski R., Kur J. New effective sources of the *Staphylococcus simulans* lysostaphin // *J. Biotechnol.* 2005. Vol. 117, № 2. P. 203–213.
46. Szweda P., Gorczyca G., Filipkowski P., Zalewska M., Milewski S. Efficient production of *Staphylococcus simulans* lysostaphin in a benchtop bioreactor by recombinant *Escherichia coli* // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2014. Vol. 44, № 4. P. 370–381.
47. Sharma R., Sharma P.R., Choudhary M.L., Pande A., Khatri G.S. Cytoplasmic expression of mature glycylglycine endopeptidase lysostaphin with an amino terminal hexa-histidine in a soluble and catalytically active form in *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif.* 2006. Vol. 45, № 1. P. 206–215.
48. Farhangnia L., Ghaznavi-Rad E., Mollae N., Abtahi H. Cloning, expression, and purification of recombinant Lysostaphin from *Staphylococcus simulans* // *Jundishapur J. Microbiol.* 2014. Vol. 7, № 5. P. 1–5.
49. Donovan D.M., Dong S., Garrett W., Rousseau G.M., Moineau S., Pritchard D.G. Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. Vol. 72, № 4. P. 2988–2996.
50. Osipovitch D.C., Griswold K.E. Fusion with a cell wall binding domain renders autolysin LytM a potent anti-*Staphylococcus aureus* agent // *FEMS Microbiol. Lett.* 2015. Vol. 362, № 2. P. 1–7.
51. Bhagwat A., Collins C.H., Dordick J.S. Selective antimicrobial activity of cell lytic enzymes in a bacterial consortium // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. Vol. 103, № 17. P. 7041–7054.
52. Gonzalez-Delgado L.S., Walters-Morgan H., Salamaga B., Robertson A.J., Hounslow A.M., Jagielska E., Sabała I., Williamson M.P., Lovering A.L., Mesnage S. Two-site recognition of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan by lysostaphin SH3b // *Nat. Chem. Biol.* 2020. Vol. 16, № 1. P. 24–30.

53. Warnke P., Harnack T., Ottl P., Kundt G., Podbielski A. Nasal screening for *Staphylococcus aureus* - Daily routine with improvement potentials // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, № 2. P. 1–7.
54. Nagase N., Sasaki A., Yamashita K., Shimizu A., Wakita Y., Kitai S., Kawano J. Isolation and species distribution of *Staphylococci* from animal and human skin // *J. Vet. Med. Sci.* 2002. Vol. 64, № 3. P. 245–250.
55. Syed M.A., Ullah H., Tabassum S., Fatima B., Woodley T.A., Ramadan H., Jackson C.R. *Staphylococci* in poultry intestines: a comparison between farmed and household chickens // *Poult. Sci.* 2020. Vol. 99, № 9. P. 4549–4557.
56. Szafraniec G.M., Szeleszczuk P., Dolka B. Review on skeletal disorders caused by *Staphylococcus spp.* in poultry // *Vet. Q.* 2022. Vol. 42, № 1. P. 21–40.
57. Roberts S., Chambers S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue // *Intern. Med. J.* 2005. Vol. 35. P. S97–S105.
58. Nappi F., Avtaar Singh S.S. Host-Bacterium Interaction Mechanisms in *Staphylococcus aureus* Endocarditis: A Systematic Review // *International journal of molecular sciences*. 2023. Vol. 24, № 11068. P. 1–34.
59. Galar A., Weil A.A., Dudzinski D.M., Muñoz P., Siedner M.J. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Prosthetic Valve Endocarditis: Pathophysiology, Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Management // *Clin. Microbiol. Rev.* 2019. Vol. 32, № 2. P. 1–26.
60. Celie K.B., Colen D.L., Kovach S.J. Toxic Shock Syndrome after Surgery: Case Presentation and Systematic Review of the Literature // *Plast. Reconstr. Surg. - Glob. Open*. 2020. Vol. 8, № 2499. P. 1–12.
61. Jarneborn A., Mohammad M., Engdahl C., Hu Z., Na M., Ali A., Jin T. Tofacitinib treatment aggravates *Staphylococcus aureus* septic arthritis, but attenuates sepsis and enterotoxin induced shock in mice // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 1–9.
62. Butrico C.E., Cassat J.E. Quorum sensing and toxin production in *Staphylococcus aureus* osteomyelitis: Pathogenesis and paradox // *Toxins*. 2020. Vol. 12, № 8. P. 1–22.
63. Masters E.A., Ricciardi B.F., Bentley K.L. d. M., Moriarty T.F., Schwarz E.M., Muthukrishnan G. Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management // *Nat. Rev. Microbiol.* 2022. Vol. 20, № 7. P. 385–400.

64. Jin T., Mohammad M., Pullerits R., Ali A. Bacteria and host interplay in *Staphylococcus aureus* septic arthritis and sepsis // *Pathogens*. 2021. Vol. 10, № 2. P. 1–25.
65. Linz M.S., Mattappallil A., Finkel D., Parker D. Clinical Impact of *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infections // *Antibiotics*. 2023. Vol. 12, № 3. P. 1–27.
66. B. R. Lyon, Iuorio J.L., J. W. May, Skurra R.A. Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus aureus* in australian hospitals // *J Med Microbiol*. 1984. Vol. 17. № 1. P. 79–89.
67. Guignard B., Entenza J.M., Moreillon P.  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Curr. Opin. Pharmacol*. 2005. Vol. 5. P. 479–489.
68. Moellering Jr R.C. Vancomycin: a 50-year reassessment. // *Clin. Infect. Dis*. 2006. Vol. 42. P. 3–4.
69. Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T., Tenover F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility // *J. Antimicrob. Chemother*. 1997. Vol. 40. P. 135–136.
70. Chang S., Sievert D.M., Hageman J.C., Boulton M.L., Tenover F.C., Downes F.P., Shah S., Rudrik J.T., Pupp G.R., Brown W.J., Cardo D., Fridkin S.K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene // *N. Engl. J. Med*. 2003. Vol. 348, № 14. P. 1342–1347.
71. Menichetti F. Current and emerging serious Gram-positive infections // *Clin. Microbiol. Infect*. 2005. Vol. 11. P. 22–28.
72. Vollmer W., Blanot D., De Pedro M.A. Peptidoglycan structure and architecture // *FEMS Microbiol. Rev*. 2008. Vol. 32, № 2. P. 149–167.
73. Lai W.C.B., Chen X., Ho M.K.Y., Xia J., Leung S.S.Y. Bacteriophage-derived endolysins to target gram-negative bacteria // *Int. J. Pharm*. 2020. Vol. 589, № 119833. P. 1–17.
74. Razew A., Schwarz J.N., Mitkowski P., Sabala I., Kaus-Drobek M. One fold, many functions—M23 family of peptidoglycan hydrolases // *Front. Microbiol*. 2022. Vol. 13. P. 1–20.
75. Dramsi S., Magnet S., Davison S., Arthur M. Covalent attachment of proteins to peptidoglycan // *FEMS Microbiol. Rev*. 2008. Vol. 32, № 2. P. 307–320.
76. Neuhaus F.C., Baddiley J. A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions

of d-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003. Vol. 67, № 4. P. 686–723.

77. Low L.Y., Yang C., Perego M., Osterman A., Liddington R. Role of net charge on catalytic domain and influence of cell wall binding domain on bactericidal activity, specificity, and host range of phage lysins // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 39. P. 34391–34403.

78. Sutton J.A.F., Carnell O.T., Lafage L., Gray J., Biboy J., Gibson J.F., Pollitt E.J.G., Tazoll S.C., Turnbull W., Hajdamowicz N.H., Salamaga B., Pidwill G.R., Condliffe A.M., Renshaw S.A., Vollmer W., Foster S.J. *Staphylococcus aureus* cell wall structure and dynamics during host-pathogen interaction // *PLoS Pathog.* 2021. Vol. 17, № 3. P. 1–30.

79. Figueroa-Cuilan W.M., Randich A.M., Dunn C.M., Santiago-Collazo G., Yowell A., Brown P.J.B. Diversification of LytM Protein Functions in Polar Elongation and Cell Division of *Agrobacterium tumefaciens* // *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 12, № 729307. P. 1–21.

80. Danis-Wlodarczyk K.M., Wozniak D.J., Abedon S.T. Treating bacterial infections with bacteriophage-based enzybiotics: *In vitro*, *in vivo* and clinical application // *Antibiotics.* 2021. Vol. 10, № 12. P. 1–36.

81. Loessner M.J. Bacteriophage endolysins - Current state of research and applications // *Curr. Opin. Microbiol.* 2005. Vol. 8, № 4. P. 480–487.

82. Yang H., Yu J., Wei H. Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives // *Front. Microbiol.* 2014. Vol. 5. P. 1–6.

83. Schuch R., Nelson D.C., Fischetti V.A. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis* // *Nature.* 2002. Vol. 418. P. 884–889.

84. Wu M., Hu K., Xie Y., Liu Y., Mu D., Guo H., Zhang Z., Zhang Y., Chang D., Shi Y. A novel phage PD-6A3, and its endolysin Ply6A3, with extended lytic activity against *Acinetobacter baumannii* // *Front. Microbiol.* 2019. Vol. 10, № 3302. P. 1–12.

85. Ghose C., Euler C.W. Gram-negative bacterial lysins // *Antibiotics.* 2020. Vol. 9, № 2. P. 1–13.

86. Grandgirard D., Loeffler J.M., Fischetti V.A., Leib S.L. Phage Lytic Enzyme Cpl-1 for Antibacterial Therapy in Experimental *Pneumococcal Meningitis* // *J. Infect. Dis.* 2008. Vol. 197. P. 1519–1522.

87. Kiser K.B., Cantey-Kiser J.M., Lee J.C. Development and characterization of a

*Staphylococcus aureus* nasal colonization model in mice // *Infect. Immun.* 1999. Vol. 67. P. 5001–5006.

88. Junjappa R.P., Desai S.N., Roy P., Narasimhaswamy N., Raj J.R., Durgaiyah M. Efficacy of anti-staphylococcal protein P128 for the treatment of canine pyoderma: potential applications // *Vet. Res. Commun.* 2013. Vol. 37. P. 217–228.

89. Singh P.K., Donovan D.M., Kumar A. Intravitreal injection of the chimeric phage endolysin Ply187 protects mice from *Staphylococcus aureus* endophthalmitis // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. Vol. 58, № 8. P. 4621–4629.

90. 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.

91. Witzenrath M., Schmeck B., Doehn J.M., Tschernig T., Zahlten J., Loeffler J.M., Zemlin M., Müller H., Gutbier B., Schütte H., Hippenstiel S., Fischetti V.A., Suttorp N., Rosseau S. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia // *Crit. Care Med.* 2009. Vol. 37, № 2. P. 642–649.

92. Entenza J.M., Loeffler J.M., Grandgirard D., Fischetti V.A., Moreillon P. Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. Vol. 49, № 11. P. 4789–4792.

93. Cheng Q., Nelson D., Zhu S., Fischetti V.A. Removal of group B *Streptococci* colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. Vol. 49, № 1. P. 111–117.

94. Lood R., Winer B.Y., Pelzek A.J., Diez-Martinez R., Thandar M., Euler C.W., Schuch R., Fischetti V.A. Novel phage Lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia model // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. Vol. 59, № 4. P. 1–9.

95. Thandar M., Lood R., Winer B.Y., Deutsch D.R., Euler C.W., Fischetti V.A. Novel engineered peptides of a phage lysin as effective antimicrobials against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. Vol. 60, № 5. P. 2971–2979.

96. Fischetti V.A. Bacteriophage lytic enzymes: Novel anti-infectives // *Trends Microbiol.* 2005. Vol. 13, № 10. P. 491–496.

97. Fenton M., McAuliffe O., O'Mahony J., Coffey A. Recombinant bacteriophage lysins

as antibacterials // *Bioeng. Bugs*. 2010. Vol. 1, № 1. P. 9–16.

98. Knoll B.M., Mylonakis E. Antibacterial bioagents based on principles of bacteriophage biology: An overview // *Clin. Infect. Dis*. 2014. Vol. 58, № 4. P. 1–7.

99. Callewaert L., Walmagh M., Michiels C.W., Lavigne R. Food applications of bacterial cell wall hydrolases // *Curr. Opin. Biotechnol*. 2011. Vol. 22. P. 164–171.

100. Oliveira H., Azeredo J., Lavigne R., Kluskens L.D. Bacteriophage endolysins as a response to emerging foodborne pathogens // *Trends Food Sci. Technol*. 2012. Vol. 28. P. 103–115.

101. Chang Y. Bacteriophage-derived endolysins applied as potent biocontrol agents to enhance food safety // *Microorganisms*. 2020. Vol. 8, № 5. P. 1–11.

102. Lee C., Kim H., Ryu S. Bacteriophage and endolysin engineering for biocontrol of food pathogens/pathogens in the food: recent advances and future trends // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2022. Vol. 63, № 27. P. 8919–8938.

103. Fischetti V.A. Using phage lytic enzymes to control pathogenic bacteria // *BMC Oral Health*. 2006. Vol. 6. P. 4–7.

104. Fischetti V.A., Nelson D., Schuch R. Reinventing phage therapy: Are the parts greater than the sum? // *Nat. Biotechnol*. 2006. Vol. 24, № 12. P. 1508–1511.

105. Schuch R., Lee H.M., Schneider B.C., Sauve K.L., Law C., Khan B.K. Combination therapy with lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced murine bacteremia // *J. Infect. Dis*. 2014. Vol. 209. P. 1469–1478.

106. Heselpoth R.D., Euler C.W., Schuch R., Fischetti V.A. Lysocins: Bioengineered antimicrobials that deliver lysins across the outer membrane of Gram-negative bacteria // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2019. Vol. 63, № 6. P. 1–14.

107. Vazquez R., Seoane-Blanco M., Rivero-Buceta V., Ruiz S., Van Raaij M.J., Garcia P. Monomodular *Pseudomonas aeruginosa* phage JG004 lysozyme (Pae87) contains a bacterial surface-active antimicrobial peptide-like region and a possible substrate-binding subdomain // *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol*. 2022. Vol. 78. P. 435–454.

108. Wang Q., Euler C.W., Delaune A., Fischetti V.A. Using a novel lysin to help control *Clostridium difficile* infections // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2015. Vol. 59, № 12. P. 7447–7457.

109. Fischetti V.A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials // *Curr. Opin. Microbiol*.

2008. Vol. 11. P. 393–400.

110. Fischetti V.A. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens // *Int. J. Med. Microbiol.* 2010. Vol. 300. P. 357–362.

111. Rashel M., Uchiyama J., Ujihara T., Uehara Y., Kuramoto S., Sugihara S., Yagyu K., Muraoka A., Sugai M., Hiramatsu K., Honke K., Matsuzaki S. Efficient Elimination of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* by Cloned Lysin Derived from Bacteriophage  $\phi$ MR11 // *J. Infect. Dis.* 2007. Vol. 196, № 8. P. 1237–1247.

112. Yang H., Zhang Y., Yu J., Huang Y., Zhang X.E., Wei H. Novel chimeric lysin with high-level antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. Vol. 58. P. 536–542.

113. Wittekind M., Schuch R. Cell wall hydrolases and antibiotics: Exploiting synergy to create efficacious new antimicrobial treatments // *Curr. Opin. Microbiol.* 2016. Vol. 33. P. 18–24.

114. Liu H., Hu Z., Li M., Yang Y., Lu S., Rao X. Therapeutic potential of bacteriophage endolysins for infections caused by Gram-positive bacteria // *J. Biomed. Sci.* 2023. Vol. 30, № 1. P. 1–18.

115. Abdelkader K., Gerstmans H., Saafan A., Dishisha T., Briers Y. The Preclinical and Clinical Progress of Bacteriophages and Their Lytic Enzymes: The Parts are Easier than the Whole // *Viruses.* 2019. Vol. 11, № 96. P. 1–16.

116. Fischetti V.A. Development of phage lysins as novel therapeutics: A historical perspective // *Viruses.* 2018. Vol. 10, № 6. P. 1–10.

117. Villa T.G., Crespo P.V. Enzybiotics: Antibiotic Enzymes as Drugs and Therapeutics. 2010. 284 p.

118. Gerstmans H., Criel B., Briers Y. Synthetic biology of modular endolysins // *Biotechnol. Adv.* 2018. Vol. 36, № 3. P. 624–640.

119. Broendum S.S., Buckle A.M., McGowan S. Catalytic diversity and cell wall binding repeats in the phage-encoded endolysins // *Mol. Microbiol.* 2018. Vol. 110, № 6. P. 879–896.

120. Oliveira H., Melo L.D.R., Santos S.B., Nóbrega F.L., Ferreira E.C., Cerca N., Azeredo J., Kluskens L.D. Molecular Aspects and Comparative Genomics of Bacteriophage Endolysins // *J. Virol.* 2013. Vol. 87, № 8. P. 4558–4570.

121. Navarre W.W., Ton-That H., Faull K.F., Schneewind O. Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage  $\phi 11$ : Identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 22. P. 15847–15856.
122. Rigden D.J., Jedrzejewski M.J., Galperin M.Y. Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of  $\gamma$ -D,L-glutamate-specific amidohydrolases // *TRENDS Biochem. Sci.* 2003. Vol. 28, № 5. P. 230–234.
123. Donovan D.M., Lardeo M., Foster-Frey J. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin // *FEMS Microbiol. Lett.* 2006. Vol. 265. P. 133–139.
124. Sass P., Bierbaum G. Lytic activity of recombinant bacteriophage  $\phi 11$  and  $\phi 12$  endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. Vol. 73, № 1. P. 347–352.
125. Obeso J.M., Martínez B., Rodríguez A., García P. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage  $\Phi H5$  endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk // *Int. J. Food Microbiol.* 2008. Vol. 128. P. 212–218.
126. Porter C.J., Schuch R., Pelzek A.J., Buckle A.M., McGowan S., Wilce M.C.J., Rossjohn J., Russell R., Nelson D., Fischetti V.A., Whisstock J.C. The 1.6 Å Crystal Structure of the Catalytic Domain of PlyB, a Bacteriophage Lysin Active Against *Bacillus anthracis* // *J. Mol. Biol.* 2007. Vol. 366, № 2. P. 540–550.
127. McGowan S., Buckle A.M., Mitchell M.S., Hoopes J.T., Gallagher D.T., Heselpoth R.D., Shen Y., Reboul C.F., Law R.H.P., Fischetti V.A., Whisstock J.C., Nelson D.C. X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. Vol. 109, № 31. P. 12752–12757.
128. Yang H., Wang D.-B., Dong Q., Zhang Z., Cui Z., Deng J., Yu J., Zhang X., Wei H. Existence of separate domains in lysin PlyG for recognizing *Bacillus anthracis* spores and vegetative cells // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. Vol. 56, № 10. P. 5031–5039.
129. Nelson D., Schuch R., Chahales P., Zhu S., Fischetti V.A. PlyC: A multimeric bacteriophage lysin // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. Vol. 103, № 28. P. 10765–10770.
130. Garcia E., Garcia J.L., Garcia P., Arraras A., Sanchez-Puelles J.M., Lopez R. Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988. Vol. 85. P. 914–918.

131. Hermoso J.A., Monterroso B., Albert A., Galán B., Ahrazem O., García P., Martínez-Ripoll M., García J.L., Menéndez M. Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1 // *Structure*. 2003. Vol. 11. P. 1239–1249.
132. Loessner M.J., Kramer K., Ebel F., Scherer S. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates // *Mol. Microbiol.* 2002. Vol. 44. P. 335–349.
133. Schmelcher M., Shabarova T., Eugster M.R., Eichenseher F., Tchang V.S., Banz M., Loessner M.J. Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. Vol. 76, № 17. P. 5745–5756.
134. Eugster M.R., Haug M.C., Huwiler S.G., Loessner M.J. The cell wall binding domain of *Listeria* bacteriophage endolysin PlyP35 recognizes terminal GlcNAc residues in cell wall teichoic acid // *Mol. Microbiol.* 2011. Vol. 81. P. 1419–1432.
135. Eugster M.R., Loessner M.J. Wall teichoic acids restrict access of bacteriophage endolysin Ply118, Ply511, and PlyP40 cell wall binding domains to the *Listeria monocytogenes* peptidoglycan // *J. Bacteriol.* 2012. Vol. 194. P. 6498–6506.
136. Van Tassell M.L., Angela Daum M., Kim J.S., Miller M.J. Creative lysins: *Listeria* and the engineering of antimicrobial enzymes // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016. Vol. 37. P. 88–96.
137. Visweswaran G.R.R., Leenhouts K., Van Roosmalen M., Kok J., Buist G. Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 98. P. 4331–4345.
138. Andre G., Leenhouts K., Hols P., Dufrière Y.F. Detection and localization of single LysM-peptidoglycan interactions // *J. Bacteriol.* 2008. Vol. 190, № 21. P. 7079–7086.
139. Steen A., Buist G., Leenhouts K.J., El Khattabi M., Grijpstra F., Zomer A.L., Venema G., Kuipers O.P., Kok J. Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 26. P. 23874–23881.
140. 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 // *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181. P. 4452–4460.
141. Horgan M., O’Flynn G., Garry J., Cooney J., Coffey A., Fitzgerald G.F., Paul Ross R.,

McAuliffe O. Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant *Staphylococci* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75, № 3. P. 872–874.

142. Fenton M., Casey P.G., Hill C., Gahan C.G.M., Ross R.P., McAuliffe O., O'Mahony J., Maher F., Coffey A. The truncated phage lysin CHAPk eliminates *Staphylococcus aureus* in the nares of mice // *Bioeng. Bugs.* 2010. Vol. 1, № 6. P. 404–407.

143. Vasina D. V., Antonova N.P., Grigoriev I. V., Yakimakha V.S., Lendel A.M., Nikiforova M.A., Pochtovyi A.A., Remizov T.A., Usachev E. V., Shevlyagina N. V., Zhukhovitsky V.G., Fursov M. V., Potapov V.D., Vorobev A.M., Aleshkin A. V., Laishevtsev A.I., Makarov V. V., Gushchin V.A. Discovering the Potentials of Four Phage Endolysins to Combat Gram-Negative Infections // *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 12, № 748718. P. 1–17.

144. Ciepluch K., Maciejewska B., Gałczyńska K., Kuc-Ciepluch D., Bryszewska M., Appelhans D., Drulis-Kawa Z., Arabski M. The influence of cationic dendrimers on antibacterial activity of phage endolysin against *P. aeruginosa* cells // *Bioorg. Chem.* 2019. Vol. 91, № 103121. P. 1–6.

145. Lim J.A., Shin H., Heu S., Ryu S. Exogenous lytic activity of SPN9CC endolysin against gram-negative Bacteria // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 24, № 6. P. 803–811.

146. Oliveira H., Boas D.V., Mesnage S., Kluskens L.D., Lavigne R., Sillankorva S., Secundo F., Azeredo J. Structural and enzymatic characterization of ABgp46, a novel phage endolysin with broad anti-gram-negative bacterial activity // *Front. Microbiol.* 2016. Vol. 7. P. 1–9.

147. Vázquez R., García E., García P. Sequence-Function Relationships in Phage-Encoded Bacterial Cell Wall Lytic Enzymes and Their Implications for Phage-Derived Product Design // *J. Virol.* 2021. Vol. 95, № 14. P. 1–23.

148. Guo M., Feng C., Ren J., Zhuang X., Zhang Y., Zhu Y., Dong K., He P., Guo X., Qin J. A novel antimicrobial endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa* // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8. P. 1–9.

149. Maciejewska B., Żrubek K., Espaillet A., Wiśniewska M., Rembacz K.P., Cava F., Dubin G., Drulis-Kawa Z. Modular endolysin of Burkholderia AP3 phage has the largest lysozyme-like catalytic subunit discovered to date and no catalytic aspartate residue // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–12.

150. Lai M.J., Soo P.C., Lin N.T., Hu A., Chen Y.J., Chen L.K., Chang K.C. Identification and characterisation of the putative phage-related endolysins through full genome sequence analysis in

*Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2013. Vol. 42, № 2. P. 141–148.

151. Xu D., Zhao S., Dou J., Xu X., Zhi Y., Wen L. Engineered endolysin-based “artilysins” for controlling the gram-negative pathogen *Helicobacter pylori* // *AMB Express*. 2021. Vol. 11, № 63. P. 1–9.

152. Yang H., Linden S.B., Wang J., Yu J., Nelson D.C., Wei H. A chimeolysin with extended-spectrum streptococcal host range found by an induced lysis-based rapid screening method // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. P. 1–12.

153. Mitkowski P., Jagielska E., Nowak E., Bujnicki J.M., Stefaniak F., Niedziałek D., Bochtler M., Sabała I. Structural bases of peptidoglycan recognition by lysostaphin SH3b domain // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. P. 5965–5678.

154. Mao J., Schmelcher M., Harty W.J., Foster-Frey J., Donovan D.M. Chimeric Ply187 endolysin kills *Staphylococcus aureus* more effectively than the parental enzyme // *FEMS Microbiol. Lett.* 2013. Vol. 342, № 1. P. 30–36.

155. Dong Q., Wang J., Yang H., Wei C., Yu J., Zhang Y., Huang Y., Zhang X.E., Wei H. Construction of a chimeric lysin Ply187N-V12C with extended lytic activity against *Staphylococci* and *Streptococci* // *Microb. Biotechnol.* 2015. Vol. 8, № 2. P. 210–220.

156. Becker S.C., Foster-Frey J., Stodola A.J., Anacker D., Donovan D.M. Differentially conserved staphylococcal SH3b\_5 cell wall binding domains confer increased staphylolytic and streptolytic activity to a streptococcal prophage endolysin domain // *Gene*. 2009. Vol. 443. P. 32–41.

157. Pastagia M., Euler C., Chahales P., Fuentes-Duculan J., Krueger J.G., Fischetti V.A. A Novel Chimeric Lysin Shows Superiority to Mupirocin for Skin Decolonization of Methicillin-Resistant and -Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. Vol. 55, № 2. P. 738–744.

158. Fernandes S., Proença D., Cantante C., Silva F.A., Leandro C., Lourenço S., Milheiriço C., de Lencastre H., Cavaco-Silva P., Pimentel M., São-José C. Novel Chimerical Endolysins with Broad Antimicrobial Activity Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* // *Microb. Drug Resist.* 2012. Vol. 18, № 3. P. 333–343.

159. Idelevich E.A., Von Eiff C., Friedrich A.W., Iannelli D., Xia G., Peters G., Peschel A., Wanninger I., Becker K. *In vitro* activity against *Staphylococcus aureus* of a novel antimicrobial agent, PRF-119, a recombinant chimeric bacteriophage endolysin // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. Vol. 55, № 9. P. 4416–4419.

160. Lukacik P., Barnard T.J., Keller P.W., Chaturvedi K.S., Seddiki N., Fairman J.W., Noinaj N., Kirby T.L., Henderson J.P., Steven A.C., Hinnebusch B.J., Buchanan S.K. Structural engineering of a phage lysin that targets Gram-negative pathogens // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. Vol. 109, № 25. P. 9857–9862.
161. Briers Y., Walmagh M., Grymonprez B., Biebl M., Pirnay J.-P., Defraigne V., Michiels J., Cenens W., Aertsen A., Miller S., Lavigne R. Art-175 Is a Highly Efficient Antibacterial against Multidrug-Resistant Strains and Persists of *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. Vol. 58, № 7. P. 3774–3784.
162. Skerlavaj B., Benincasa M., Risso A., Zanetti M., Gennaro R. SMAP-29: A potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes // *FEBS Lett.* 1999. Vol. 463. P. 58–62.
163. Maher S., McClean S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells *in vitro* // *Biochem. Pharmacol.* 2006. Vol. 71. P. 1289–1298.
164. Dawson R.M., Liu C.Q. Cathelicidin peptide SMAP-29: Comprehensive review of its properties and potential as a novel class of antibiotics // *Drug Dev. Res.* 2009. Vol. 70, № 7. P. 481–498.
165. Briers Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagaert S., Michiels C.W., Hertveldt K. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL // *Mol. Microbiol.* 2007. Vol. 65. P. 1334–1344.
166. Briers Y., Cornelissen A., Aertsen A., Hertveldt K., Michiels C.W., Volckaert G., Lavigne R. Analysis of outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa* and bactericidal activity of endolysins KZ144 and EL188 under high hydrostatic pressure // *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. Vol. 280, № 1. P. 113–119.
167. Chen Y., Song K., Chen X., Li Y., Lv R., Zhang Q., Cui Y., Bi Y., Han Y., Tan Y., Du Z., Yang R., Qi Z., Song Y. Attenuation of *Yersinia pestis* fyuA Mutants Caused by Iron Uptake Inhibition and Decreased Survivability in Macrophages // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022. Vol. 12, № 874773. P. 1–12.
168. Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. MEROPS: The peptidase database // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36. P. 320–325.
169. Gründling A., Schneewind O. Cross-linked peptidoglycan mediates lysostaphin binding to the cell wall envelope of *Staphylococcus aureus* // *J. Bacteriol.* 2006. Vol. 188, № 7. P. 2463–2472.

170. Chandra Ojha S., Imtong C., Meetum K., Sakdee S., Katzenmeier G., Angsuthanasombat C. Purification and characterization of the antibacterial peptidase lysostaphin from *Staphylococcus simulans*: Adverse influence of Zn<sup>2+</sup> on bacteriolytic activity // *Protein Expr. Purif.* 2018. Vol. 151. P. 106–112.
171. Climo M.W., Ehlert K., Archer G.L. Mechanism and suppression of lysostaphin resistance in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. Vol. 45, № 5. P. 1431–1437.
172. Gargis S.R., Heath H.E., LeBlanc P.A., Dekker L., Simmonds R.S., Sloan G.L. Inhibition of the activity of both domains of lysostaphin through peptidoglycan modification by the lysostaphin immunity protein // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. Vol. 76, № 20. P. 6944–6946.
173. DeHart H.P., Heath H.E., Heath L.S., LeBlanc P.A., Sloan G.L. The lysostaphin endopeptidase resistance gene (*epr*) specifies modification of peptidoglycan cross bridges in *Staphylococcus simulans* and *Staphylococcus aureus* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. Vol. 61, № 4. P. 1475–1479.
174. Szweda P., Schielmann M., Kotlowski R., Gorczyca G., Zalewska M., Milewski S. Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. Vol. 96, № 5. P. 1157–1174.
175. Harris R.L., Nunnery A.W., Riley H.D. Effect of lysostaphin on staphylococcal carriage in infants and children. // *Antimicrob. Chemother.* 1967. P. 110–112.
176. Martin R.R., White A. The selective activity of lysostaphin *in vivo* // *Lab. Clin. Med.* 1967. Vol. 70. P. 1–8.
177. Quickel K.E., Selden R., Caldwell J.R., Nora N.F., Schaffner W. Efficacy and safety of topical lysostaphin treatment of persistent nasal carriage of *Staphylococcus aureus* // *Appl. Microbiol.* 1971. Vol. 22. P. 446–450.
178. Márová I., Kovář J. Spectrophotometric detection of bacteriolytic activity of diluted lysostaphin solutions // *Folia Microbiol.* 1993. Vol. 38, № 2. P. 153–158.
179. Briers Y., Lavigne R., Volckaert G., Hertveldt K. A standardized approach for accurate quantification of murein hydrolase activity in high-throughput assays // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2007. Vol. 70, № 3. P. 531–533.
180. Kazanavičiute V., Misiunas A., Gleba Y., Giritch A., Ražanskiene A. Plant-expressed

bacteriophage lysins control pathogenic strains of *Clostridium perfringens* // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–11.

181. Robinson J.M., Hardman J.K., Sloan G.L. Relationship between lysostaphin endopeptidase production and cell wall composition in *Staphylococcus staphylolyticus* // *J. Bacteriol.* 1979. Vol. 137, № 3. P. 1158–1164.

182. Schindler C.A., Schuhardt V.T. Lysostaphin: A new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1964. Vol. 51. P. 414–421.

183. Sugai M., Fujiwara T., Akiyama T., Ohara M., Komatsuzawa H., Inoue S., Suginaka H. Purification and molecular characterization of glycylglycine endopeptidase produced by *Staphylococcus capitis* EPK1 // *J. Bacteriol.* 1997. Vol. 179, № 4. P. 1193–1202.

184. Lood R., Molina H., Fischetti V.A. Determining bacteriophage endopeptidase activity using either fluorophore-quencher labeled peptides combined with liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) or Förster resonance energy transfer (FRET) assays // *PLoS One.* 2017. Vol. 12, № 3. P. 1–11.

185. Liu Y., Kati W., Chen C.-M., Tripathi R., Molla A., Kohlbrenner W. Use of a Fluorescence Plate Reader for Measuring Kinetic Parameters with Inner Filter Effect Correction // *Anal. Biochem.* 1999. Vol. 267. P. 331–335.

186. Kline A.S., De la Harpe J., Blackburn P. A colorimetric microtiter plate assay for lysostaphin using hexaglycine substrate // *Anal. Biochem.* 1994. Vol. 217, № 2. P. 329–331.

187. Park P.W., Senior R.M., Griffin G.L., Broekelmann T.J., Susan Mudd M., Mecham R.P. Binding and degradation of elastin by the staphylolytic enzyme lysostaphin // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1995. Vol. 27, № 2. P. 139–146.

188. Ueda E.K.M., Gout P.W., Morganti L. Current and prospective applications of metal ion – protein binding // *J. Chromatogr. A.* 2003. Vol. 988. P. 1–23.

189. Zachariou M., Hearn M.T.W. Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilised hard Lewis metal ion-chelate adsorbents // *J. Chromatogr. A.* 2000. Vol. 890, № 1. P. 95–116.

190. Zaveckas M., Baškevičiute B., Lukša V., Žvirblis G., Chmieliauskaite V., Bumelis V., Pesliakas H. Comparative studies of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor, its Ser-17 and (His)6-tagged forms interaction with metal ions by means of immobilized metal ion affinity

partitioning. Effect of chelated nickel and mercuric ions on extracti // *J. Chromatogr. A*. 2000. Vol. 904, № 2. P. 145–169.

191. Konstantinova S., Grishin A., Lyashchuk A., Vasina I., Karyagina A., Lunin V. Influence of NaCl and pH on lysostaphin catalytic activity, cell binding, and bacteriolytic activity // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022. Vol. 106. P. 6519–6534.

192. Grishin A. V, Shestak N. V, Lavrova N. V, Lyashchuk A.M., Popova L.I., Strukova N. V, Generalova M.S., Ryazanova A. V, Polyakov N.B., Galushkina Z.M., Soboleva L.A., Boksha I.S., Karyagina A.S., Lunin V.G. Fusion of lysostaphin to an albumin binding domain prolongs its half-life and bactericidal activity in the systemic circulation // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 2892. P. 1–14.

193. Shestak N. V, Grishin A. V, Lyashchuk A.M., Lunin V.G., Karyagina A.S. The choice of chromatographic resin for the purification of recombinant lysostaphin affects its activity // *Protein Expr. Purif.* 2023. Vol. 207, № 106274. P. 1–6.

194. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.

195. Grishin A. V., Lavrova N. V., Lyashchuk A.M., Strukova N. V., Generalova M.S., Ryazanova A. V., Shestak N. V., Boksha I.S., Polyakov N.B., Galushkina Z.M., Soboleva L.A., Vetchinin S.S., Pavlov V.M., Karyagina A.S., Lunin V.G. The influence of dimerization on the pharmacokinetics and activity of an antibacterial enzyme lysostaphin // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 1879. P. 1–13.

196. Hernández S.B., Cava F. New approaches and techniques for bacterial cell wall analysis // *Curr. Opin. Microbiol.* 2021. Vol. 60. P. 88–95.

197. Bar-Even A., Noor E., Savir Y., Liebermeister W., Davidi D., Tawfik D.S., Milo R. The moderately efficient enzyme: Evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters // *Biochemistry*. 2011. Vol. 50, № 21. P. 4402–4410.

198. Lu H.R., Gu M.G., Huang Q., Huang J.J., Lu W.Y., Lu H., Huang Q.S. Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and site-directed disulfide cross-linking suggest an important dynamic interface between the two lysostaphin domains // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. Vol. 57, № 4. P. 1872–1881.

199. Razew A., Laguri C., Vallet A., Bougault C., Kaus-drobek M., Sabala I., Simorre J. *Staphylococcus aureus* sacculus mediates activities of M23 hydrolases // *Nat. Commun.* 2023. Vol. 14, № 6706. P. 1–13.

200. Block H., Maertens B., Spriestersbach A., Brinker N., Kubicek J., Fabis R., Labahn J., Schäfer F. Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). A Review // *Methods Enzymol.* 2009. Vol. 463, № C. P. 439–473.