

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Шестак Никита Викторович

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

1.1.10 – Биомеханика и биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2024

Работа выполнена в лаборатории биологически активных наноструктур Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель - **Карягина-Жулина Анна Станиславовна**,
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты - **Пометун Анастасия Александровна**,
доктор химических наук, ведущий научный
сотрудник, заведующая лабораторией
молекулярной инженерии Федерального
исследовательского центра «Фундаментальные
основы биотехнологии» Российской академии
наук, Институт Биохимии имени А.Н. Баха

Демидюк Илья Валерьевич,
доктор химических наук, доцент по
специальности биотехнология (в том числе
бионанотехнология), профессор РАН, начальник
лаборатории функциональной энзимологии
Федерального государственного бюджетного
учреждения «Национальный исследовательский
центр «Курчатовский институт» (НИЦ
«Курчатовский институт»)

Долгих Дмитрий Александрович,
доктор биологических наук, профессор, главный
научный сотрудник, заведующий лабораторией
инженерии белка Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Государственный
научный центр Российской Федерации Институт
биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

Защита диссертации состоится 16 октября 2024 года в 16.00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.10 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3075>

Автореферат разослан «__» сентября 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Шаповалова И.В.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

6xHis-tag – гексагистидиновая метка;

BSA – бычий сывороточный альбумин;

BSA-E – бычий сывороточный альбумин, обработанный ЭДТА;

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая 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 лизостафин с С-концевой 6xHis-tag, выделенный при помощи никель-хелатного аффинного сорбента WorkBeads NiMAC, с восстановленной активностью;

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

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

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

MRSA – метициллин-устойчивый золотистый стафилококк;

PG – пептидогликановые оболочки;

PGE – пептидогликановые оболочки, обработанные ЭДТА.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

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 (Tong *et al.*, 2015; Turner *et al.*, 2019). Также *S. aureus* является основным возбудителем остеомиелита – заболевания, связанного с тяжелым поражением костей (Turner *et al.*, 2019; Urish and Cassat, 2020). По статистике от 25 до 30% населения постоянно колонизированы штаммами *S. aureus* и около 60% – временно колонизированы этим патогеном (Lowy, 1998; Tong *et al.*, 2015; Jaradat *et al.*, 2020; Dufresne *et al.*, 2022). 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* (Lowy, 2003; Giulieri, Tong and Williamson, 2020). Однако вместе с этим у патогенных бактерий стала развиваться устойчивость к используемым антибиотикам (Barber and Rozwadowska-Dowzenko, 1948; Lowy, 2003; Giulieri, Tong and Williamson, 2020), причём не только к конкретным соединениям, но и к целым классам антибиотиков, например, к антибиотикам пенициллинового ряда вследствие использования бактериями β -лактамазы (Lowy, 2003; Rivera and Boucher, 2011; Turner *et al.*, 2019). Исследование механизмов, обеспечивающих антибиотикорезистентность бактерий, позволило разработать новые полусинтетические антибиотики, способные преодолеть подобные механизмы. Ярким примером является создание метициллина – β -лактамного антибиотика, устойчивого к действию β -лактамазы (Lowy, 2003; Turner *et al.*, 2019). 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 (Lowy, 2003; Giulieri, Tong and Williamson, 2020). Циклы разработки новых антибиотиков и появления у бактерий устойчивости к ним повторяются из раза в раз (Chambers, 2001; Lowy, 2003; Giulieri, Tong and Williamson, 2020), 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 (Dajcs *et al.*, 2002; Daniel *et al.*, 2010; Gilmer *et al.*, 2013).

Лизостафин является одним из наиболее хорошо изученных антибактериальных лизинов. Впервые лизостафин был выделен ещё в 1964 году (Schindler and Schuhardt, 1965), 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 биоплёнок (Dajcs *et al.*, 2000, 2001, 2002; Wu *et al.*, 2003; Kokai-Kun *et al.*, 2003; Shah, Mond and Walsh, 2004; Warfield *et al.*, 2006; Kokai-Kun, Chanturiya and Mond, 2009, 2007; Bardelang *et al.*, 2009; Placencia, Kong and Weisman, 2009; Bastos, Coutinho and Coelho, 2010; Kokai-Kun, 2012; Askari *et al.*, 2014; Sabala *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014). 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 (Bastos, Coutinho and Coelho, 2010; Jayakumar *et al.*, 2020). Важную роль в каталитической активности лизостафина и его гомологов играет каталитический ион Zn^{2+} , удерживаемый в активном центре каталитического домена фермента (Spencer *et al.*, 2010; Sabala *et al.*, 2014; Grabowska *et al.*, 2015; Xing, Simmonds and Timkovich, 2016; Min *et al.*, 2020). 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 (Firczuk, Mucha and Bochtler, 2005; Sudiarta, Fukushima and Sekiguchi, 2010; Raulinaitis *et al.*, 2017; Tossavainen *et al.*, 2018). Кроме того было показано, что активный центр этих ферментов способен связывать второй ион металла, что приводит к снижению их активности (Raulinaitis *et al.*, 2017; Tossavainen *et al.*, 2018). Для изучения активности лизостафина в большинстве исследований использовали различные турбидиметрические методы, основанные на просветлении клеточной суспензии *S. aureus* под действием белка (Kusuma and Kokai-Kun, 2005; Bardelang *et al.*, 2009). 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 (Warfield *et al.*, 2006; Bardelang *et al.*, 2009; Tossavainen *et al.*, 2018). Однако, несмотря на проведённые исследования, соотношение каталитической и

бактериолитической активностей лизоафрина систематически до сих пор не изучено. Подобные данные позволили бы разграничить влияние каталитического и пептидогликан-связывающего домена лизоафрина на его кумулятивную активность, что актуально для разработки эффективных антибактериальных лизинов с требуемыми свойствами с целью создания на их основе лекарственных препаратов против антибиотикоустойчивых штаммов бактерий, в частности MRSA.

Другой вопрос, связанный с активностью лизоафрина, относится к стратегии получения препаратов чистых рекомбинантных белков. Лизоафрин и его модифицированные варианты обычно очищают хроматографией при помощи катионообменных (Schindler and Schuhardt, 1965; Sabala *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Boksha *et al.*, 2016; Jagielska, Chojnacka and Sabala, 2016; Shen *et al.*, 2021) или металл-хелатных сорбентов (Szweda, Kotłowski and Kur, 2005; Donovan *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006; Warfield *et al.*, 2006; Farhangnia *et al.*, 2014; Sabala *et al.*, 2014; Szweda *et al.*, 2014; Osipovitch and Griswold, 2015; Bhagwat, Collins and Dordick, 2019; Gonzalez-Delgado *et al.*, 2020). Однако при очистке цинк-зависимого лизоафрина 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 лизоафрина. При этом для выделения белков доступны различные варианты металл-хелатных хроматографических сорбентов с различными характеристиками, которые потенциально могут по-разному влиять на активность очищенного лизоафрина. Несмотря на это ранее не проводилось систематического исследования влияния стратегии очистки лизоафрина на его активность.

Цель и задачи работы

Целью данной работы является исследование соотношения каталитической и бактериолитической активностей вариантов рекомбинантного белка лизоафрина 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 лизоафрина с использованием пентаглицина в качестве субстрата.
2. Адаптировать для проведения исследований методы определения пептидогликанолитической и бактериолитической активностей лизоафрина 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 лизоафрина с ионами различных металлов в активном центре белка.
4. Исследовать соотношения между уровнями пептидогликанолитической и бактериолитической активностей рекомбинантного лизоафрина и уровнем его каталитической активности.
5. Исследовать влияние никель-хелатных хроматографических сорбентов, применяемых при очистке рекомбинантных белков, на активность металлсодержащего

рекомбинантного белка лизостафина.

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.

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты углубляют теоретические представления об активности

антибактериального лизина лизостафина и могут быть распространены в той или иной степени на других представителей семейства эндопептидаз M23, к которому он принадлежит.

Разработанный метод определения каталитической активности лизостафина может быть использован при научных исследованиях не только лизостафина, но и других антибактериальных лизинов, 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 лизинов семейства M23, но и других металлсодержащих белков.

Результаты о характере связи между уровнями бактериолитической, пептидогликанолитической и каталитической активности рекомбинантного лизостафина углубляют теоретические представления об активности лизостафина 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.

Методология и методы 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.

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 лизоафина из-за изменения количества и/или состава каталитических ионов металлов в его активном центре.

4. Разработанный метод обработки лизоафина 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 лизоафина и может быть применим для других цинк-содержащих ферментов.

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.

Личный вклад автора

Выбор и отработка методик исследований; работа с культурами штаммов-продуцентов *E. coli* BL21 (DE3), выделение и хроматографическая очистка целевых рекомбинантных белков при помощи различных хроматографических сорбентов для получения препаратов различных вариантов рекомбинантного белка лизоафина; получение препаратов рекомбинантного лизоафина с ионами различных металлов в активном центре фермента; исследование препаратов лизоафина с ионами различных металлов в активном центре; изучение каталитической активности при помощи разработанного метода определения каталитической активности лизоафина с использованием изолированного пентаглицина в качестве субстрата; исследование пептидогликанолитической и бактериолитической активности препаратов лизоафина 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 лизоафина с использованием препаратов лизоафина с ионами различных металлов в активном центре фермента; исследование каталитической и бактериолитической активности препаратов рекомбинантного лизоафина, 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 лизоафина без и с С-концевой

гексагистидиновой меткой (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).

Публикации по теме работы

По материалам диссертации опубликовано четыре статьи в международных рецензируемых научных журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на трёх 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.

Структура и объём диссертации

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рекомбинантный лизостафин без 6xHis-tag очищали при помощи катионообменной хроматографии и хранили в 20 mM HEPES (pH 7,5) при -80°C. **Рекомбинантный лизостафин с 6xHis-tag** очищали при помощи катионообменной (сорбент WorkBeads 40S) или аффинной металл-хелатной (сорбенты WorkBeads NiMACS, WorkBeads 40Ni-NTA, WorkBeads 40Ni-IDA и Zn-NTA) хроматографии и хранили в 20 mM HEPES (pH 7,5) при -80°C. **Каталитическую активность** лизостафина исследовали при помощи разработанного метода с использованием пентаглицина в качестве субстрата и хромогенной реакции с нингидрином, а также при помощи метода тонкослойной хроматографии. **Пептидогликановые оболочки (PG)** выделяли из клеток *S. aureus* при помощи кипячения клеток стафилококка в растворе додецилсульфата натрия с последующей обработкой микрококковой нуклеазой и протеиназой К. Полученную суспензию PG хранили при -20°C и перед проведением экспериментов обрабатывали при помощи ультразвукового гомогенизатора FS-250N (Henan Chuanghe Laboratory Equipment

Со., Китай). Удаление ионов металлов из суспензии PG и раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA) проводили при помощи обработки ЭДТА. **Пептидогликанолитическую и бактериолитическую активность** препаратов лизостафина исследовали по просветлению суспензии PG и интактных клеток *S. aureus* соответственно под действием белка в присутствии BSA с использованием планшетного спектрофотометра Multiscan FC (Thermo Scientific, США) оснащённого термостатом, при 37°C в течение 1 ч с интервалом измерений в 1 мин при $\lambda = 550$ нм и встряхивании между измерениями. Эксперименты проводили без и с добавлением ионов металлов в реакционную смесь. **Препараты рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента** получали при помощи обработки ЭДТА рекомбинантного лизостафина без 6xHis-tag при pH 7,5 для удаления ионов металлов, связанных с белком, с последующим встраиванием ионов различных металлов при pH 4,0 (для предотвращения связывания второго иона металла активным центром лизостафина) и хранили в воде при -80°C. Восстановление активности препаратов лизостафина проводили при помощи обработки ЭДТА при pH 7,5 с последующим встраиванием ионов Zn^{2+} при pH 4,0. После восстановления активности препараты лизостафина переводили в 20 mM HEPES (pH 7,5) и хранили при -80°C. **Статистический анализ** экспериментальных данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с постобработкой по Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1 Разработка метода определения каталитической активности лизостафина с использованием пентаглицина

Разработанный метод исследования каталитической активности лизостафина основан на использовании изолированного пентаглицина в качестве субстрата. Под действием лизостафина пентаглицин расщепляется на ди- и триглицин, что приводит к увеличению количества свободных аминок групп в реакционной смеси, которое можно обнаружить при помощи реакции с нингидрином с образованием сине-фиолетового пурпура Руэмана. Эффект дополнительно усиливается более эффективной реакцией нингидрина с более короткими пептидами. В результате проведённых исследований были подобраны условия, обеспечивающие стабильно воспроизводимые результаты анализа.

Протокол разработанного метода исследования каталитической активности лизостафина с использованием пентаглицина и хромогенной реакции с нингидрином:

- Предварительно приготовить раствор пентаглицина путем его суспендирования в воде Milli-Q в концентрации 5 mM с последующим растворением при помощи нагревания при 99°C в течение 20 мин на водяной бане. Полученный раствор разделить на аликвоты и хранить при -80°C. Перед экспериментом аликвоты пентаглицина разморозить при 99°C в течение 20 мин и охладить до комнатной температуры.
- Предварительно приготовить 10% (масс./об.) раствор нингидрина в ДМСО, разделить на аликвоты и хранить при -20°C.
- Смесь пентаглицина и лизостафина в 20 mM HEPES (pH 7,5) разделить на

аликвоты объемом 20 мкл в микроцентрифужные пробирки объемом 0,5 мл (по несколько аликвот на каждую временную точку) и инкубировать при 37°C в течение 48 ч. Пробы отобрать сразу после смешивания (пробы 0 ч) и через 8, 24, 32, 48 ч после начала реакции. Заморозить пробы при -80°C для остановки реакции и сохранения отобранных проб для последующего анализа. После окончания эксперимента все полученные пробы окрасить при помощи нингидрина.

- Перед окрашиванием проб из подготовленных аликвот нингидрина в ДМСО приготовить рабочий раствор нингидрина, содержащий 0,4% (масс./об.) нингидрина в смеси 80% ДМСО/20% воды и 20 мМ HEPES (pH 7,5)). Замороженные пробы реакционной смеси разморозить при 99°C в течение 10 мин и добавить к ним по 100 мкл рабочего раствора нингидрина. Образцы тщательно перемешать и инкубировать при 85°C в течение 15 мин. После этого охладить их до комнатной температуры, добавить по 200 мкл дистиллированной воды и тщательно перемешать. По 100 мкл полученной смеси перенести в 96-луночный планшет и измерить оптическую плотность при 595 нм с помощью микропланшетного спектрофотометра Multiscan FC (Thermo Scientific, США).

1.1 Оценка применимости разработанного метода определения каталитической активности лизостафина

Для изучения пригодности разработанного метода для определения каталитической активности лизостафина в соответствии с протоколом проанализировали смесь 4 мМ пентаглицина с 5 мкМ лизостафина, раствор 4 мМ пентаглицина без лизостафина (контроль самопроизвольного расщепления пентаглицина) и раствор 5 мкМ лизостафина (без пентаглицина) (контроль влияния лизостафина на окраску реакционной смеси) (рисунок 1).

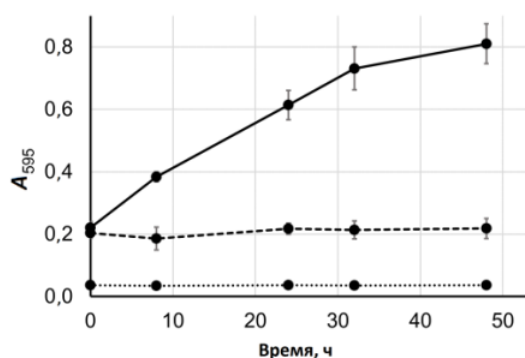


Рисунок 1 – Гидролиз пентаглицина лизостафином, контролируемый хромогенной реакцией с нингидрином. Смесь 4 мМ пентаглицина в 20 мМ HEPES (pH 7,5) с 5 мкМ лизостафина (сплошная линия) или без лизостафина (штриховая линия), и раствор 5 мкМ лизостафина (без пентаглицина) в 20 мМ HEPES (pH 7,5) (пунктирная линия). 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 1, сплошная линия). Напротив, оптическая плотность пентаглицина в отсутствие лизостафина не менялась с течением временем (рисунок 1, штриховая линия). При этом непосредственно лизостафин не влиял на интенсивность окраски, поскольку его оптическая плотность после окрашивания нингидрином не отличалась от оптической плотности пустых лунок и не менялась со временем (рисунок 1, 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 инкубировали при 37°C и анализировали с помощью тонкослойной хроматографии (рисунок 2). Маркером выступала смесь 3 мМ ди-, три- и пентаглицина. Согласно полученным данным количество пентаглицина уменьшалось, а количество ди- и триглицина увеличивалось по мере протекания реакции, что соответствует увеличению интенсивности окраски образцов, обработанных нингидрином.

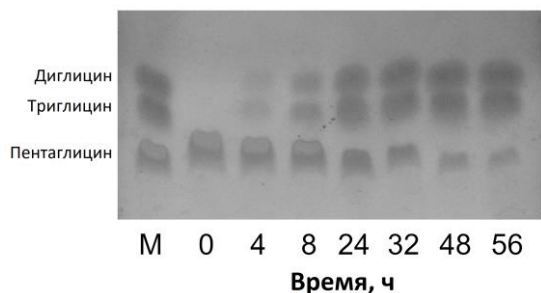


Рисунок 2 – Анализ протекания гидролиза пентаглицина под действием лизостафина с помощью тонкослойной хроматографии. Хроматография в смеси уксусной кислоты, *n*-бутанола и воды в соотношении 5:2:1 с визуализацией проб нингидрином. М – маркер (смесь 3 мМ ди-, три- и пентаглицина).

Для того, чтобы показать, что с помощью разработанного метода можно определять скорость протекания реакции между пентаглицином и лизостафином, 4 мМ пентаглицина инкубировали с 1, 3 и 5 мкМ лизостафина или без добавления белка в течение 48 ч (рисунок 3 (А)). Было показано, что увеличение концентрации лизостафина приводит к более высокой скорости реакции между пентаглицином и лизостафином.

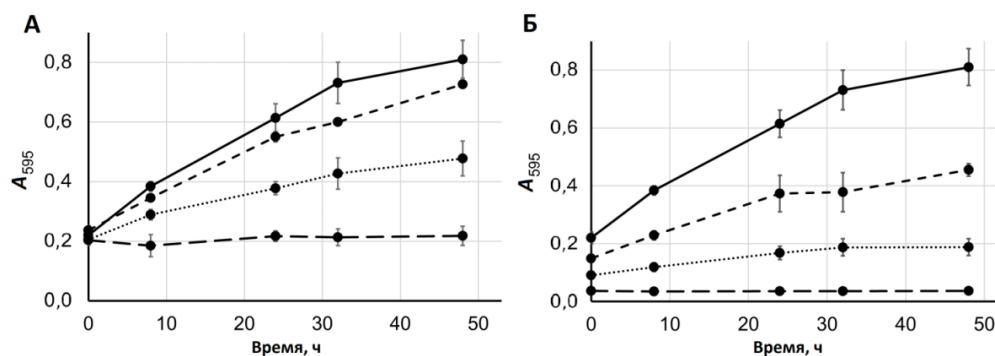


Рисунок 3 – Зависимость скорости расщепления пентаглицина от концентрации лизостафина и пентаглицина. (А) Смесь 4 мМ пентаглицина с 1 мкМ (пунктирная линия), 3 мкМ (линия с коротким штрихом) или 5 мкМ (сплошная линия) лизостафина или без лизостафина (линия с длинным штрихом). Показаны средние значения результатов шести (5 мкМ лизостафина), трёх (1 и 3 мкМ лизостафина) или двух (без лизостафина) независимых экспериментов; (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 2) пентаглицина с 5 мкМ лизостафина. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

При инкубировании 0, 2, 3 и 4 мМ пентаглицина с 5 мкМ лизостафина (рисунок 3 (Б)) было показано, что начальная и максимальная интенсивность окраски, а также начальная скорость реакции увеличивались одновременно с увеличением исходной концентрации пентаглицина.

Скорость реакции в течение первых 8 часов не становится постоянной при увеличении концентрации субстрата, из чего можно сделать вывод, что при использованных концентрациях пентаглицин был в недостатке. К сожалению, достичь более высоких концентраций пентаглицина не удалось из-за его низкой растворимости в воде, но несмотря на это ограничение, разработанный метод применим для исследования

каталитической активности лизостафина.

Также было интересно и важно изучить возможность применения разработанного метода для определения активности различных вариантов лизостафина. Для изучения этого вопроса рекомбинантный лизостафин обработали ЭДТА для удаления иона цинка из активного центра каталитического домена фермента и, соответственно, изменения его каталитической активности. В качестве сравнения использовали лизостафин, обработанный аналогично, но без добавления ЭДТА (контрольный лизостафин). В результате оптическая плотность окрашенных нингидрином проб в начальный момент времени для обоих вариантов лизостафина не отличалась друг от друга, а через 30 ч инкубации оптическая плотность образцов с контрольным лизостафином достигла $0,55 \pm 0,07$, в то время как оптическая плотность образцов с лизостафином, обработанным ЭДТА, увеличилась только до $0,23 \pm 0,01$. Это свидетельствует об ингибировании каталитической активности лизостафина при обработке ЭДТА и применимости разработанного метода исследования каталитической активности лизостафина для изучения вариантов лизостафина с различным уровнем каталитической активности.

1.2 Численная оценка параметров каталитической реакции между пентаглицинном и лизостафином

Численно каталитическую активность лизостафина оценивали при помощи каталитической эффективности k_{cat}/K_M . Для этого необходимо определить количество нерасщеплённого пентаглицина в реакционной смеси в разные промежутки времени. Пересчет оптической плотности окрашенной нингидрином реакционной смеси в количество нерасщеплённого пентаглицина проводили с использованием калибровочной кривой зависимости оптической плотности окрашенных нингидрином смесей олигоглицинов от количества пентаглицина в них.

Поскольку интенсивность окраски реакционной смеси, окрашенной нингидрином, зависит от количества олигоглицинов в ней, и лизостафин расщепляет одну молекулу пентаглицина на одну молекулу диглицина и одну молекулу триглицина, то смешав их в необходимой пропорции можно имитировать процесс гидролиза пентаглицина под действием лизостафина (стартовая концентрация пентаглицина составляла 4 мМ). При 4 мМ пентаглицина смесь 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 по 4 мМ ди- и 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 «расщеплённого» пентаглицина, который не добавляется в смесь, в неё добавляют по 1 моль «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 соответствовали шагу в 0,5 мМ «расщеплённого» пентаглицина. Полученные смеси олигоглицинов делили на аликвоты объёмом 20 мкл, замораживали при -80°C , затем размораживали и окрашивали нингидрином в соответствии с протоколом разработанного метода. В результате была получена калибровочная кривая зависимости

оптической плотности окрашенных нингидрином смесей олигоглицинов от количества пентаглицина в них (рисунок 4 (А)). Данная зависимость демонстрирует линейный рост оптической плотности окрашенной нингидрином смеси при уменьшении концентрации пентаглицина во всем диапазоне концентраций, использованных в анализе. Преобразованные с её помощью значения оптической плотности окрашенных нингидрином проб реакционной смеси 4 мМ пентаглицина с 5 мкМ лизостафина в концентрации пентаглицина представлены на рисунке 4 (Б).

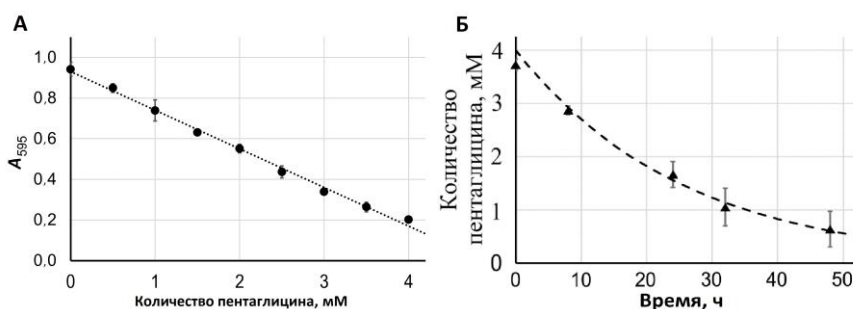


Рисунок 4 – Калибровочная кривая зависимости оптической плотности окрашенной нингидрином смеси олигоглицинов от концентрации пентаглицина (А) и результат её применения для реакционной смеси 4 мМ пентаглицина с 5 мкМ лизостафина (Б).

Для того чтобы охарактеризовать активность фермента, обычно используют такие параметры, как каталитическая константа k_{cat} и константа Михаэлиса K_M из уравнения Михаэлиса-Ментен (1).

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_{cat} \times E_0 \times \frac{[S]}{[S] + K_M}, \quad (1)$$

где $[S]$ — концентрация пентаглицина, М; t — время, с; k_{cat} — каталитическая константа, с^{-1} ; E_0 — концентрация лизостафина, М; K_M — константа Михаэлиса, М.

При подборе с использованием нелинейной регрессии параметров k_{cat} и K_M для реакционной смеси 4 мМ пентаглицина с 5 мкМ лизостафина (рисунок 1 (А)) были получены нереалистичные значения k_{cat} и K_M , которые составили $1,1 \times 10^{11} \text{ с}^{-1}$ и $1,2 \times 10^{10} \text{ М}$ соответственно. Исходя из того, что субстрат находился в реакционной смеси в недостатке, 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 (1) сводится к уравнению (2).

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_{cat} \times E_0 \times \frac{[S]}{[S] + K_M} \approx -k_{cat} \times E_0 \times \frac{[S]}{K_M} = -E_0 \times \frac{k_{cat}}{K_M} \times [S], \quad (2)$$

При интегрировании уравнения (2) получили экспоненциальное уравнение (3), описывающее концентрацию пентаглицина, использованного в качестве субстрата, в реакционной смеси в текущий момент времени.

$$[S] = [S]_0 \times e^{-E_0 \times \frac{k_{cat}}{K_M} \times t}, \quad (3)$$

где $[S]_0$ — начальная концентрация пентаглицина, М; k_{cat}/K_M — каталитическая эффективность, $\text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Из уравнения (3) 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 (Б)) значение каталитической эффективности составило $8,8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, что на четыре порядка ниже значения k_{cat}/K_M «среднего фермента» равного $\sim 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [Bar-Even, 2011] и свидетельствует о низкой эффективности гидролиза изолированного пентаглицинового пептида.

1.3 Сравнение каталитической и бактериолитической активности лизостафина

Несмотря на низкую эффективность гидролиза изолированного пентаглицинового пептида, лизостафин даже в низких концентрациях способен быстро лизировать интактные клетки *S. aureus*. Для сравнения между собой каталитической эффективности лизостафина по отношению к изолированному пентаглицину и пентаглицину, встроенному в клеточную стенку бактерии, исследовали скорость снижения мутности суспензии стафилококка под действием лизостафина при разной исходной плотности клеток (рисунок 5 (А)).

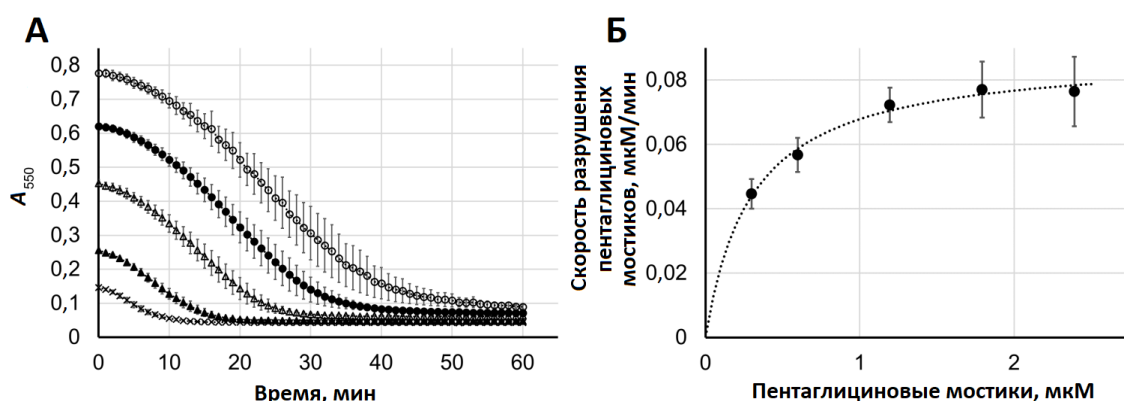


Рисунок 5 – Расчет параметров k_{cat} , K_M и k_{cat}/K_M рекомбинантного лизостафина по отношению к пентаглицину, встроенному в клеточную стенку бактерий. (А) Исходная плотность клеточной суспензии по МакФарланду равная 8,0 (светлые кружки), 6,0 (закрашенные кружки), 4,0 (светлые треугольники), 2,0 (закрашенные треугольники) и 1,0 (крестики), концентрация лизостафина 30 нМ; (Б) Зависимость скорости гидролиза поперечных мостиков пентаглицина от исходной концентрации поперечных мостиков пентаглицина. График соответствующего ей уравнения Михаэлиса-Ментен (пунктирная линия). Показаны средние значения результатов трёх независимых экспериментов, планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

Для определения скорости снижения мутности клеточной суспензии экспериментальные кривые аппроксимировали при помощи пятипараметрической логистической функции и определяли значение скорости просветления клеточной суспензии в точке её перегиба. Мутность в единицах по МакФарланду пропорциональна концентрации жизнеспособных бактериальных клеток: 0,5 по МакФарланду эквивалентно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. С учетом того, что на одну клетку приходится $\approx 6 \times 10^5$ пентаглициновых мостиков [Mitkowski, 2019], исходную мутность реакционной смеси в

единицах по МакФарланду преобразовали в концентрацию поперечных мостиков пентаглицина. Предполагая наличие прямой зависимости между количеством гидролизованного пентаглицина и лизисом клеток, скорость просветления клеточной суспензии аналогично преобразовали в скорость расщепления пентаглициновых поперечных мостиков (рисунок 5 (Б)).

Используя уравнение Михаэлиса-Ментен (1) для полученной зависимости скорости гидролиза поперечных мостиков пентаглицина от их исходной концентрации (рисунок 6 (Б), пунктирная линия) определили значения параметров k_{cat} , K_M и k_{cat}/K_M по отношению к встроенному в пептидогликан пентаглицину, которые составили соответственно $k_{cat} = 0,062 \text{ с}^{-1}$, $K_M = 302 \text{ нМ}$ и $k_{cat}/K_M = 2,1 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Различие в 23000 раз между полученными значениями каталитической эффективности по отношению к встроенному и изолированному пентаглицину, вероятно, объясняется влиянием пептидогликан-связывающего домена лизостафина. Полученные результаты свидетельствуют о применимости разработанного метода для исследования каталитической активности лизостафина. Кроме того, они согласуются с некоторыми данными, описанными в литературе, а существующие расхождения, возможно, объясняются тем, что для их получения использовали эксперименты с использованием различных субстратов.

2 Исследование соотношения между каталитической, пептидогликанолитической и бактериолитической активностью препаратов рекомбинантного лизостафина

Для разграничения влияния каталитического и пептидогликан-связывающего домена лизостафина на его активность 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. Для этого использовали препараты лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента, которые обеспечивают различный уровень активности белка и не влияют на его пептидогликан-связывающий домен. Данные препараты лизостафина получали путём полной «деметаллизации» белка при помощи ЭДТА (препарат лизостафина Lst (EDTA)) с последующим встраиванием в активный центр фермента ионов различных металлов. Внедрение ионов металлов проводили при pH 4,0 для того, чтобы в активный центр лизостафина не встраивался второй ион металла. В результате были получены препараты рекомбинантного лизостафина с ионами Ca^{2+} (Lst-Ca), Co^{2+} (Lst-Co), Cu^{2+} (Lst-Cu), Mg^{2+} (Lst-Mg), Mn^{2+} (Lst-Mn), Ni^{2+} (Lst-Ni) и Zn^{2+} (Lst-Zn) в активном центре белка.

2.1 Исследование каталитической активности препаратов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре белка

Для изучения каталитической активности препаратов рекомбинантного лизостафина Lst (EDTA), Lst-Ca, Lst-Co, Lst-Cu, Lst-Mg, Lst-Mn, Lst-Ni и Lst-Zn

использовали разработанный метод определения каталитической активности лизостафина с использованием 4 мМ пентаглицина в качестве субстрата при 1 мкМ белка. Средние значения рассчитанной для каждого препарата лизостафина каталитической эффективности k_{cat}/K_M приведены в таблице 1 и представлены в виде: среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (количество независимых экспериментов).

Таблица 1 – Каталитическая эффективность препаратов лизостафина без ионов металлов или с ионами различных металлов в активном центре фермента

Вариант лизостафина	k_{cat}/K_M , $M^{-1} \cdot s^{-1}$
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)

Как и ожидалось, наибольшей каталитической активностью с использованием изолированного пентаглицина в качестве субстрата обладал препарат лизостафина с нативным ионом цинка в активном центре фермента, а остальные препараты обладали меньшим уровнем каталитической активности вплоть до её полного отсутствия для препарата лизостафина Lst (EDTA), выступавшего в качестве отрицательного контроля.

2.2 Исследование пептидогликанолитической активности препаратов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре белка и её соотношения с их каталитической эффективностью

Преимущественно активность лизостафина изучают по просветлению клеточной бактериальной суспензии под действием фермента. При этом стоит учитывать, что бактериальные клетки содержат ионы различных металлов, которые способны оказать влияние на наблюдаемый уровень активности лизостафина. В связи с этим для полученных препаратов лизостафина с ионами различных металлов сначала исследовали их пептидогликанолитическую активность с использованием очищенных пептидогликановых оболочек (PG) *S. aureus*, дополнительно обработанных ЭДТА (PGE) для гарантированного удаления всех ионов металлов. При этом по размеру и структуре PG приближены к исходным клеткам, что позволяет максимально контролируемо исследовать пептидогликанолитическую активность препаратов лизостафина по отношению к пентаглицину, встроенному в клеточную стенку, и сравнить её с каталитической активностью по отношению к изолированному пентаглицину, использованному в качестве субстрата. Для предотвращения адгезии лизостафина в ходе проведения эксперимента в реакционную среду добавляли раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA), также обработанного ЭДТА (BSA-E) для удаления из него ионов металлов, способных влиять на активность лизостафина.

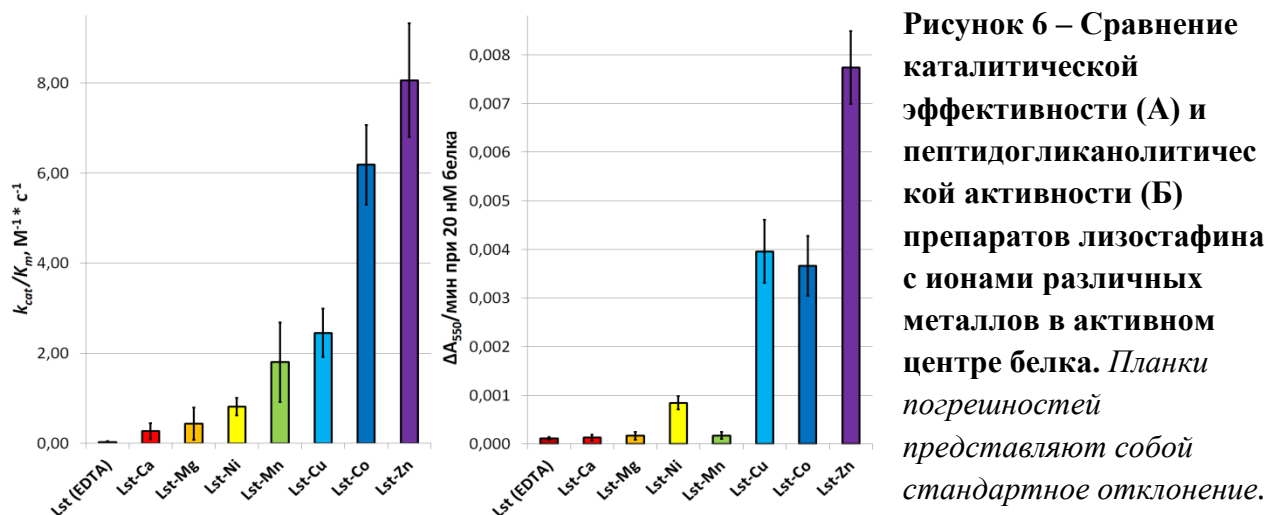
Провели исследование просветления суспензии PGE под действием различных концентраций препаратов лизостафина Lst (EDTA), Lst-Ca, Lst-Co, Lst-Cu, Lst-Mg,

Lst-Mn, Lst-Ni и Lst-Zn и для каждого препарата лизостафина определили скорость просветления суспензии PGE при 20 нМ белка (таблица 2).

Таблица 2 – Пептидогликанолитическая активность препаратов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента

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 препараты лизостафина в порядке возрастания их каталитической эффективности и сравнить между собой уровни их каталитической и пептидогликанолитической активностей, то можно заметить сходную тенденцию в изменении обоих типов активности лизостафина (рисунок 6), из которой по какой-то причине выпадают препараты лизостафина Lst-Mn и, вероятно, Lst-Co. Поскольку препараты 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 препаратов белка, а не только для некоторых из них.



Поскольку PG и BSA способны связывать ионы металлов, то, возможно, после обработки ЭДТА они способны взаимодействовать с ионами металлов в активном центре лизостафина и при низкой аффинности лизостафина к ним забирать эти ионы из активного центра белка. Это может приводить к снижению наблюдаемого уровня пептидогликанолитической активности. Для проверки этого предположения исследовали пептидогликанолитическую активность препаратов лизостафина в присутствии различных количеств соответствующих ионов металлов. В результате было определено, что при добавлении 200 мкМ ионов металлов наступает насыщение PGE и BSA-E

ионами металлов и начинается дополнительное связывание ионов металлов активным центром лизостафина. Добавление ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} не приводит к значимому изменению активности препаратов лизостафина Lst-Mg и Lst-Ca. Добавление ионов Cu^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} в концентрации 200 мкМ и выше приводит к ингибированию активности соответствующих препаратов лизостафина, что свидетельствует о том, что активный центр лизостафина связывает второй ион металла, который ингибирует его активность. При внесении ионов 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 Mn^{2+} (рисунок 7 (А)). Описанное скачкообразное увеличение активности наблюдается, пусть и в несколько меньшей степени, при добавлении ионов Co^{2+} к препарату лизостафина Lst-Co (рисунок 7 (Б)). Это свидетельствует об относительно невысокой аффинности лизостафина по отношению к ионам Mn^{2+} и Co^{2+} , но при этом лизостафин с ионами Mn^{2+} в активном центре белка обладает средним уровнем активности, который обусловлен именно встраиванием ионов Mn^{2+} в активный центр лизостафина. В то время как лизостафин с ионами Co^{2+} обладает высоким уровнем активности. Стоит отметить, что взаимодействие ионов 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 свидетельствует о связывании второго иона металла активным центром лизостафина, причём аффинность данного процесса существенно ниже, чем связывание первого иона металла.

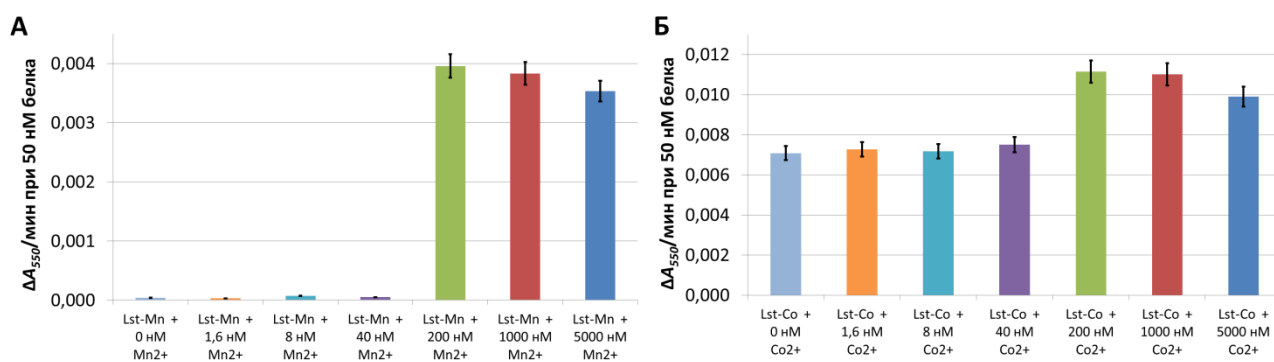


Рисунок 7 – Скорость просветления суспензии PGE в присутствии BSA-E под действием препаратов лизостафина Lst-Mn (А) и Lst-Co (Б) при добавлении различных количеств ионов Mn^{2+} и Co^{2+} соответственно.

Пептидогликанолитическая активность в отношении PGE для препарата лизостафина Lst-Co в присутствии 200 мкМ ионов Co^{2+} и для препарата лизостафина Lst-Mn в присутствии 200 мкМ ионов 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. При использовании этих данных тенденции изменения каталитической эффективности и пептидогликанолитической активности совпадают друг с другом (рисунок 8).

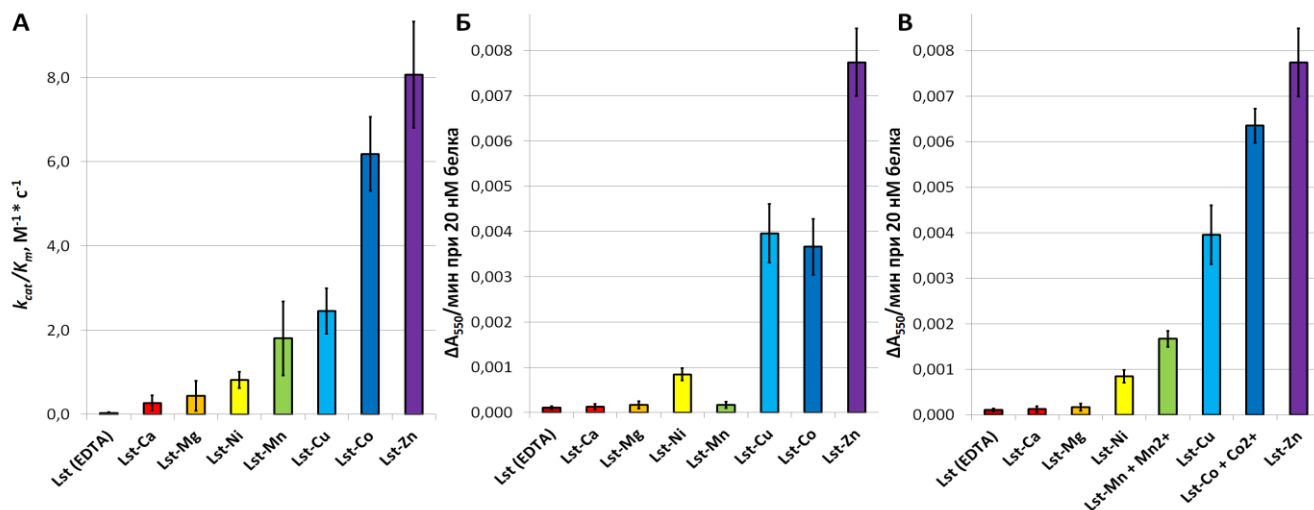


Рисунок 8 – Сравнение каталитической эффективности препаратов лизоцифина с ионами различных металлов в активном центре белка (А) и их бактериолитической активности без добавления ионов металлов (Б) и с добавлением ионов Co^{2+} и Mn^{2+} к соответствующим препаратам лизоцифина (В). Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

При этом зависимость скорости просветления суспензии PGE при 20 нМ препаратов лизоцифина с ионами различных металлов (для препаратов Lst-Co и Lst-Mn значения, полученные в присутствии 200 мкМ соответствующих ионов металлов) от их каталитической эффективности является линейной (рисунок 9).

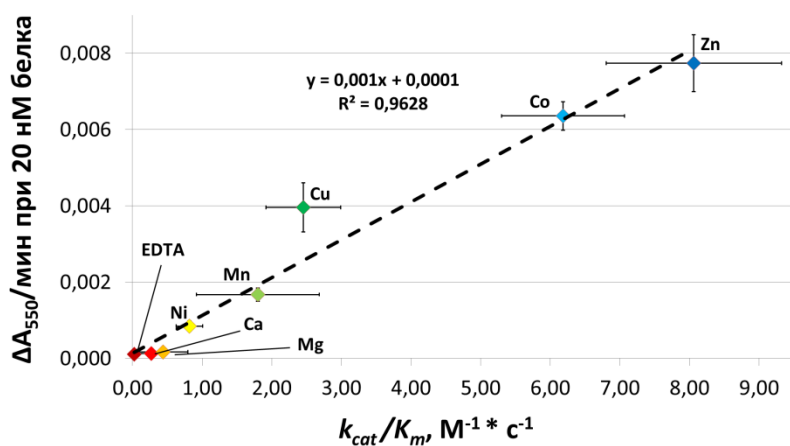


Рисунок 9 – Зависимость пептидогликанолитической активности препаратов лизоцифина с ионами различных металлов в активном центре фермента от их каталитической активности и аппроксимирующая её прямая. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

2.3 Исследование бактериолитической активности препаратов рекомбинантного лизоцифина с ионами различных металлов в активном центре белка и её соотношения с их каталитической эффективностью

Бактериолитическую активность препаратов лизоцифина с ионами различных металлов в активном центре фермента исследовали аналогично изучению их пептидогликанолитической активности при помощи суспензии интактных клеток *S. aureus* вместо суспензии PGE. При этом без добавления ионов металлов бактериолитическая активность препаратов лизоцифина (в виде скорости просветления клеточной суспензии при 20 нМ белка) аналогична их пептидогликанолитической активности (рисунок 10).

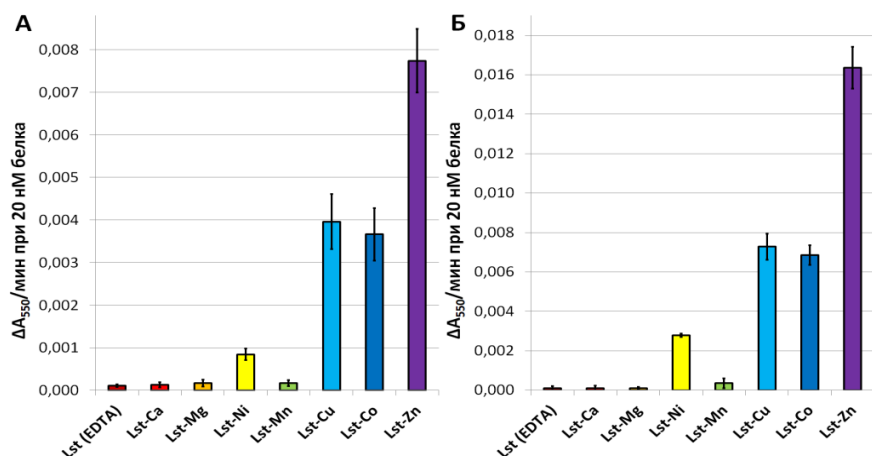


Рисунок 10 – Сравнение пептидогликанолитической (А) и бактериолитической (Б) активности препаратов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

Аналогично пептидогликанолитической активности бактериолитическая активность повышалась с $0,0073 \pm 0,0007$ (3) $\Delta A_{550}/\text{мин}$ до $0,0175 \pm 0,0008$ (3) $\Delta A_{550}/\text{мин}$ для Lst-Co и с $0,0004 \pm 0,0002$ (3) $\Delta A_{550}/\text{мин}$ до $0,0068 \pm 0,0004$ (3) $\Delta A_{550}/\text{мин}$ для Lst-Mn при добавлении к ним ионов Co^{2+} и Mn^{2+} соответственно. Кроме того, аналогично пептидогликанолитической активности, зависимость бактериолитической активности от каталитической эффективности носит линейный характер (рисунок 11).

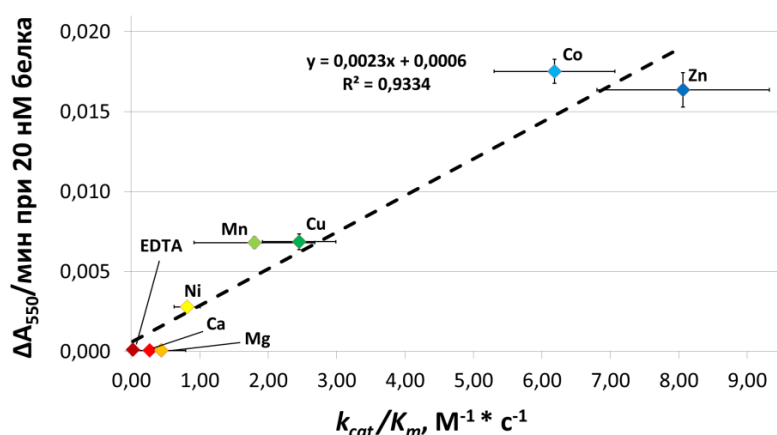


Рисунок 11 – Зависимость бактериолитической активности препаратов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента от их каталитической активности и аппроксимирующая её прямая. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

Несмотря на сложность системы исследования активности лизостафина, использующей суспензию интактных клеток *S. aureus*, полученные результаты каталитической, пептидогликанолитической и бактериолитической активностей препаратов лизостафина с ионами различных металлов в активном центре фермента хорошо согласуются между собой. 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.

3 Исследование влияния хроматографического сорбента на активность рекомбинантного лизостафина

В описанных в литературе исследованиях лизостафин выделяют при помощи различных хроматографических методов, в том числе с использованием никель-хелатной

аффинной хроматографии. Используемые для этого никель-хелатные хроматографические сорбенты различаются типом функциональных групп, координирующих ион Ni^{2+} на сорбенте, и количеством этих координирующих связей. В зависимости от них различается степень связывания иона металла на сорбенте – три связи и относительно слабое связывание у Ni-IDA, четыре связи и средние показатели связывания у Ni-NTA, и сильное связывание у NiMAC (количество связей и тип хелатирующей группы производителем не раскрывается).

Изучение влияния различных никель-хелатных хроматографических сорбентов на активность лизостафина проводили с использованием рекомбинантного лизостафина с С-концевой 6xHis-tag, очищенного при помощи катионообменной хроматографии с использованием WorkBeads 40S (препарат белка Lst-Cex в качестве контроля) или никель-хелатной аффинной хроматографии с использованием WorkBeads NiMAC, WorkBeads 40 Ni-NTA или WorkBeads 40 Ni-IDA (препараты белка Lst-NiMAC, Lst-NTA и Lst-IDA соответственно).

Каталитическую активность препаратов лизостафина Lst-Cex, Lst-NiMAC, Lst-NTA и Lst-IDA исследовали с использованием разработанного и описанного выше метода с использованием пентаглицина и нингидрина. Бактериолитическую активность этих препаратов исследовали аналогично описанным ранее экспериментам и численно оценивали в виде скорости просветления клеточной суспензии *S. aureus* при 20 нм белка. В результате проведенных экспериментов было показано снижение уровня активности лизостафина при его выделении с использованием Lst-NTA и Lst-IDA, усиливающееся с уменьшением силы связывания ионов Ni^{2+} с сорбентом (рисунок 12). Поскольку как каталитическая, так и бактериолитическая активность препаратов лизостафина Lst-Cex и Lst-NiMAC практически не отличаются друг от друга и существенно отличается от активности препаратов лизостафина Lst-NTA и Lst-IDA, была выдвинута гипотеза о том, что при недостаточной аффинности сорбента к ионам Ni^{2+} активный центр лизостафина способен взаимодействовать с ионами металла, адсорбированными на сорбенте. В результате чего может произойти встраивание ионов Ni^{2+} с сорбента в активный центр белка вторым ионом и/или замещение нативного иона Zn^{2+} на ион Ni^{2+} , что приводит к снижению активности лизостафина и может объяснять наблюдаемое явление.

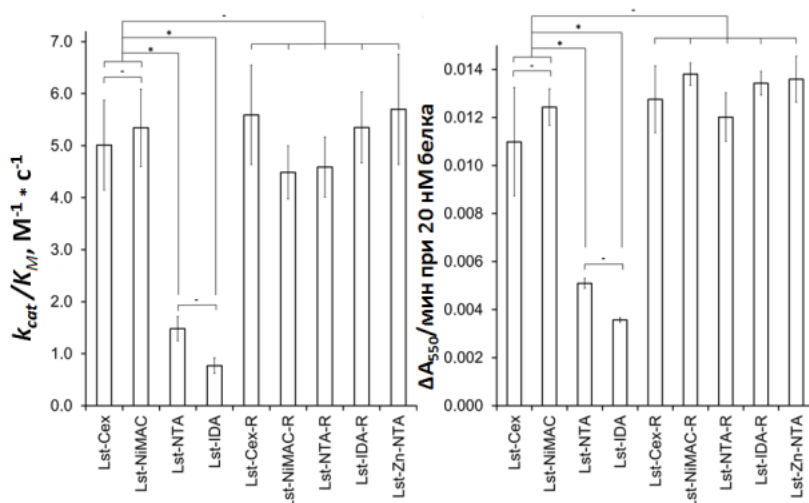


Рисунок 12 – Каталитическая (А) и бактериолитическая (Б) активность препаратов лизостафина, очищенных на различных сорбентах, до и после обработки ЭДТА и цинком. Столбики погрешностей показывают стандартное отклонение. Звездочки (*) указывают на достоверные различия, прочерки (-) указывают на отсутствие достоверных различий.

Из этого следует, что если падение активности препаратов лизостафина 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+} .

Для восстановления каталитической активности препараты лизостафина 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 лизостафина. В результате получили соответственно препараты лизостафина Lst-Cex-R, Lst-NiMAC-R, Lst-NTA-R и Lst-IDA-R. Каталитическая и бактериолитическая активность препаратов лизостафина Lst-Cex-R, Lst-NiMAC-R, Lst-NTA-R и Lst-IDA-R с восстановленной активностью статистически не различалась между собой и была идентична активности препаратов лизостафина Lst-Cex и Lst-NiMAC до восстановления активности. Эти результаты подтверждают предположение о том, что снижение активности препаратов лизостафина Lst-NTA и Lst-IDA связано с взаимодействием каталитического центра лизостафина с ионами никеля, адсорбированными на сорбенте, приводящим к изменению состава ионов металлов в активном центре лизостафина.

Альтернативным способом получить активный лизостафин, вероятно, является выделение и очистка рекомбинантного лизостафина при помощи цинк-хелатного аффинного хроматографического сорбента. Для проверки этого предположения из сорбента WorkBeads 40 Ni-NTA удалили ионы Ni^{2+} и затем загрузили сорбент ионами Zn^{2+} в соответствии с протоколом компании-производителя и использовали полученный сорбент Zn-NTA для выделения препарата лизостафина Lst-Zn-NTA. Значения его каталитической и бактериолитической активностей статистически не отличались от значений каталитической и бактериолитической активностей препаратов лизостафина Lst-Cex, Lst-NiMAC и всех препаратов лизостафина с восстановленной активностью, что подтверждает предположение об использовании цинк-хелатного аффинного хроматографического сорбента Zn-NTA для очистки полнофункционального лизостафина. Полученные результаты могут быть использованы при получении не только лизостафина и других антибактериальных лизинов, но и других металл-зависимых ферментов, как для их лабораторного исследования, так и для разработки промышленных способов их выделения и очистки.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный новый метод на основе хромогенной реакции с нингидрином с использованием пентаглицина в качестве субстрата позволяет эффективно определять каталитическую активность вариантов рекомбинантного лизоафрина.
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 лизоафрина с ионами различных металлов в активном центре.
3. Каталитическая, пептидогликанолитическая и бактериолитическая активность лизоафрина 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 лизоафрина существенно снижает их пептидогликанолитическую и бактериолитическую активности, вероятно, из-за относительно низкой аффинности лизоафрина по отношению к этим ионам.
4. Зависимости пептидогликанолитической и бактериолитической активностей лизоафрина от его каталитической эффективности носят линейный характер.
5. Хроматографическая очистка лизоафрина 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 лизоафрина после его очистки с использованием никель-хелатных хроматографических сорбентов, и может быть адаптирован для других металлсодержащих белков.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI¹

1. Grishin, A.V. The influence of dimerization on the pharmacokinetics and activity of an antibacterial enzyme lysostaphin. / A.V. Grishin, N.V. Lavrova, A.M. Lyashchuk, N.V. Strukova, M.S. Generalova, A.V. Ryazanova, **N.V. Shestak**, I.S. Boksha, N.B. Polyakov, Z.M. Galushkina, L.A. Soboleva, S.S. Vetchinin, V.M. Pavlov, A.S. Karyagina, V.G. Lunin // *Molecules*. — 2019. — Vol. 24, № 1879. — P. 1—13. JIF (для WoS) = **4.2**, (1,50/0,27).
2. Grishin, A.V. Fusion of lysostaphin to an albumin binding domain prolongs its half-life and bactericidal activity in the systemic circulation / A.V. Grishin, **N.V. Shestak**, N.V. Lavrova, A.M. Lyashchuk, L.I. Popova, N.V. Strukova, M.S. Generalova, A.V. Ryazanova, N.B. Polyakov, Z.M. Galushkina, L.A. Soboleva, I.S. Boksha, A.S. Karyagina, V.G. Lunin // *Molecules*. — 2019. — Vol. 24, № 2892. — P. 1—14. JIF (для WoS) = **4.2**, (1,62/0,42).
3. Grishin, A.V. A simple protocol for the determination of lysostaphin enzymatic activity / A.V. Grishin, S.V. Konstantinova, I.V. Vasina, **N.V. Shestak**, A.S. Karyagina, V.G. Lunin // *Antibiotics*. — 2020. — Vol. 9, № 917. — P. 1—10. JIF (для WoS) = **4.3**, (1,16/0,52).
4. **Shestak, N.V.** The choice of chromatographic resin for the purification of recombinant lysostaphin affects its activity / **N.V. Shestak**, A.V. Grishin, A.M. Lyashchuk, V.G. Lunin, A.S. Karyagina // *Protein Expression and Purification*. — 2023. — Vol. 207, № 106274. — P. 1—6. JIF (для WoS) = **1.4**, (0,69/0,55).

ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Шестак Н.В.**, Гришин А.В., Лящук А.М., Лаврова Н.В., Струкова Н.В., Генералова М.С., Рязанова А.В., Карягина А.С., Лунин В.Г. Активность и фармакокинетические свойства лизостафина с альбумин-связывающим доменом // *Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития»*, Москва, 2019, Сборник материалов международного конгресса, С. 197-198. (0,23/0,10)
2. **Шестак Н.В.** Исследование влияния каталитической активности лизостафина на его бактериолитические свойства // *XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022»*, Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2022» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2022. – URL:// lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2022/data/25885/140435_uid684402_report.pdf (дата обращения 01.09.2024). (0,23/0,23)
3. **Шестак Н.В.**, Гришин А.В., Лящук А.М., Карягина А.С., Лунин В.Г. Каталитическая активность рекомбинантного лизостафина, очищенного на различных сорбентах// *Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития»*, Москва, 2022, Сборник материалов международного конгресса, С. 70-71. (0,23/0,15)

¹ В скобках приведён объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах