

ВАСИЛЬЕВА НАТАЛЬЯ ВАЛЕРЬЕВНА

**РОЛЬ ВНЕШНЕМЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ В СЕКРЕЦИИ
БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ *LYSOBACTER* SP.**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Пушино – 2010



Работа выполнена в лаборатории биохимии клеточной поверхности микроорганизмов
Учреждения Российской Академии Наук Института биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,
Степная Ольга Андреевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
Моргунов Игорь Григорьевич

доктор биологических наук, профессор
Калебина Татьяна Сергеевна

Ведущая организация:

Учреждение Российской Академии Наук
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита диссертации состоится «18» июня 2010 г. в 10 час.00 мин.

на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при Учреждении Российской
Академии Наук Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.
Скрыбина РАН по адресу: 142290, Московская обл., г. Пушкино, проспект Науки, д. 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской
Академии Наук Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.
Скрыбина РАН. Автореферат размещен на сайте Института: <http://www.ibpm.ru/>

Автореферат разослан «14» июня 2010 г.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000723140

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук

В.М. Вагабов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Многие живые организмы – вирусы, бактерии, растения, животные – продуцируют бактериолитические ферменты, разрушающие клеточные стенки различных бактерий. Они используют такие ферменты либо для борьбы с конкурентными или болезнетворными бактериями, либо для проникновения в бактерию-хозяина и выхода из нее.

Бактерии, характеризующиеся сильно выраженной способностью лизировать различные микроорганизмы, объединены в род *Lysobacter*. Представители этого рода интересны не только с точки зрения изучения взаимоотношений внутри различных биоценозов, но также с биотехнологической точки зрения. К настоящему моменту в медицине сложилась весьма неблагоприятная ситуация в терапии инфекционных заболеваний из-за появления патогенных микроорганизмов, устойчивых к большинству используемых антибиотиков. Одно из актуальных направлений современных биомедицинских исследований в рамках решения данной проблемы связано с исследованием и использованием естественных механизмов антагонизма среди микробов. Продукция бактериолитических ферментов – один из примеров микробного антагонизма. Важным преимуществом бактериолитических ферментов является отсутствие у микроорганизмов устойчивости к их действию.

Грамотрицательная бактерия *Lysobacter* sp. XL1 при выращивании в специально подобранных условиях секретирует в окружающую среду бактериолитические ферменты. На основе культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1 получен антимикробный препарат широкого спектра действия – лизоамидаза (Кулаев и др., 2002). Ранее из культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1 были выделены и охарактеризованы четыре бактериолитических фермента (Л1-Л4). При длительном культивировании *Lysobacter* sp. XL1 на среде, способствующей секреции бактериолитических ферментов, в культуре появляются и со временем накапливаются клетки малоактивного штамма *Lysobacter* sp. XL2, которые способны продуцировать только два бактериолитических фермента – Л2 и Л3 (Степная и др., 1996в). По специфичности действия на бактериальные пептидогликаны литические ферменты этой бактерии являются эндопептидазами (Л1 и Л4) (Степная и др., 1996б, 2005), амидазами (Л1 и Л2) (Степная и др., 1986, 1992, 1996б), мурамидазой (Л3) (Степная и др., 1996а). При изучении генома *Lysobacter* sp. XL1 установлена нуклеотидная последовательность гена, кодирующая бактериолитический фермент Л1, и гомологичная ей последовательность (60% гомологии), кодирующая неизвестный ранее белок, который был обозначен как бактериолитический фермент Л5. Обе последовательности в разной степени гомологичны α -литической протеазе *Lysobacter enzymogenes* (78% и 56% гомологии соответственно) (Кулаев и др., 2005).

Бактериолитический фермент Л5 *Lysobacter* sp. XL1 ранее не был выделен в чистом виде и не были охарактеризованы его свойства. Совершенно никакой информации не имеется относительно путей секреции бактериолитических ферментов бактерий рода *Lysobacter*. При изучении структуры генов, кодирующих ферменты Л1 и Л5, предсказано, что синтезируются они в виде препробелков. Следовательно, секреция этих белков из цитозоля бактерии в окружающую среду должна проходить по одинаковой схеме, в два этапа. Первый этап заключается в секреции через цитоплазматическую мембрану в периплазму. Наличие пре-части (сигнальная последовательность) позволяет предположить участие в этом процессе

Сек-зависимого секреторного пути. Второй этап, т.е. секреция из периплазмы в окружающую среду, может осуществляться несколькими путями, в том числе посредством внешнемембранных везикул, которые образуют многие грамотрицательные бактерии. О способности бактерий рода *Lysobacter* образовывать везикулы ранее не было известно.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования было установить, образует ли бактерия *Lysobacter* sp. (штаммы XL1 и XL2) внешнемембранные везикулы и если да, то исследовать их роль в секреции бактериолитических ферментов. В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать способность клеток *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 образовывать везикулы.
2. Выделить и охарактеризовать везикулы *Lysobacter* sp. XL1 и XL2.
3. Выделить и охарактеризовать бактериолитический фермент Л5 *Lysobacter* sp. XL1.
4. Исследовать клетки *Lysobacter* sp. XL1 на присутствие в них белка SecA – компонента Сек-зависимого механизма секреции белков через цитоплазматическую мембрану.
5. Установить, попадают ли бактериолитические ферменты *Lysobacter* sp. в окружающую среду при помощи везикул.
6. Исследовать литическое действие везикул *Lysobacter* sp. XL1 по отношению к различным микроорганизмам.

Научная новизна работы

Выделен, очищен и частично охарактеризован новый бактериолитический фермент Л5 *Lysobacter* sp. XL1. Впервые для бактерии рода *Lysobacter* показано наличие SecA белка – компонента Сек экспортного механизма секреции белков через цитоплазматическую мембрану в периплазму. Впервые установлена способность клеток *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 образовывать внешнемембранные везикулы. Показано, что Л2 фермент *Lysobacter* sp. XL2 и ферменты Л2 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 попадают в окружающую среду при помощи везикул. Везикулы *Lysobacter* sp. XL1 имеют широкий спектр литического действия по отношению к различным видам микроорганизмов.

Научно-практическое значение

Полученные в работе новые данные расширяют представление о роли внешнемембранных везикул в секреции белков у бактерий и межбактериальных взаимодействиях. Характеристика нового бактериолитического фермента Л5 дополняет знания о структуре антибактериального комплекса лизоамидаза. Результаты работы указывают на возможность применения препарата везикул и очищенного фермента Л5 для лечения и профилактики инфекционных заболеваний, вызванных патогенными для животных и растений микроорганизмами. В Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (г. Оболensk) было проверено лечебное действие везикул *Lysobacter* sp. XL1 и очищенного фермента Л5 на моделях сибиреязвенной инфекции у беспородных белых мышей. Показано, что очищенный фермент Л5 не обладает лечебным действием, в то время как везикулы, содержащие этот же фермент, оказывают лечебный эффект в 100% случаев. Эти результаты позволяют считать целесообразной разработку в дальнейшем методов «упаковки» отдельных бактериолитических

ферментов в искусственные везикулярные структуры для получения эффективных лекарственных средств.

Апробация работы и публикации

Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: Международная школа-конференция, посвященная 100-летию со дня рождения С.И. Алиханяна «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пушино, 2006), The Fourth International Conference on «Science and Business» NanoBio and Related New and Perspective Biotechnologies (Pushchino, 2007), VI симпозиум «Химия протейолитических ферментов» (Москва, 2007), IV Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Казань, 2009). По материалам диссертации опубликовано две статьи, подано две заявки на патенты.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 116 страницах, содержит 6 таблиц и 19 рисунков. Библиографический указатель содержит 193 источника литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным объектом данной работы являлась бактерия *Lysobacter* sp. (штаммы XL1 и XL2), секретирующая внеклеточные бактериолитические ферменты. Культуры выращивали при 29°C на качалке в течение 18 – 21 ч, что соответствовало началу стационарной стадии роста. Культивирование вели на модифицированной среде LB. В состав среды, способствующей продукции бактериолитических ферментов (среда 1) входили: пептон – 5 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 5 г/л, pH 7.5. В состав среды, блокирующей продукцию внеклеточных белков (среда 2) входили: пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 20 г/л, NaCl – 5 г/л, pH 7.5. Агаризованные питательные среды содержали агар в концентрации 1.5 %. Бактериальные штаммы, которые были использованы в качестве тест-культур, выращивали на среде 5/5, содержащей дрожжевой экстракт – 0.1%, соевый экстракт – 3%, триптон – 0.5% и аминокислоты – 6%, pH 7.2. Дрожжи выращивали на сусло среде. Мицелиальные грибы выращивали на глюкозо-картофельном агаре.

Периплазматическую фракцию клеток *Lysobacter* sp. получали осмотическим шоком по методу Носсала и Хэппела с модификациями (Nossal, Heppel, 1966). После обработки осмотическим шоком клетки суспендировали в 50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, замораживали при -70°C, а затем разрушали продавливанием под давлением 9 атмосфер на прессе, разработанном в ИБФМ РАН. Полученную массу центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин для удаления неразрушенных клеток. Затем надосадочную жидкость центрифугировали при 18000 g в течение 30 мин. Осадок содержал клеточные стенки и мембраны, надосадочная жидкость – цитозоль. Разделение белков внешней и цитоплазматической мембран проводили по методу Шнайtmана (Schnaitman, 1971).

Везикулы получали из культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1 и *Lysobacter* sp. XL2. Клетки из 0.6 л культуры удаляли центрифугированием при 4500 g в течение 20 мин и повторным центрифугированием супернатанта при 22000 g в течение 25 мин для удаления оставшихся клеток. Из полученной культуральной жидкости везикулы

осаждали центрифугированием при 140000 g в течение 2 ч при 4°C. Осадок везикул дважды промывали 10 мМ Трис-HCl, pH 8.0 с последующим центрифугированием при той же скорости в течение 1 ч. Затем осадок везикул ресуспендировали в 3 мл 10 мМ Трис-HCl, pH 8.0 и хранили при -20°C.

Для негативного контрастирования препараты изолированных везикул или бактерий обрабатывали 0.2% раствором уранилцетата в воде. Ультратонкие срезы готовили как описано у Рейнольдса (Reynolds, 1963).

Для определения литического действия везикул использовали живые клетки грамотрицательных и грамположительных бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов. На подросший газон клеток-мишеней наносили 25 мкл препарата везикул *Lysobacter* sp. XL1, что соответствовало 24 мкг суммарного белка. Чашки продолжали инкубировать при 29°C до появления зон лизиса.

Электрофорез белков в 12.5% полиакриламидном геле проводили в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na) по методу Лэммли (Laemmli, 1970). В качестве маркеров использовали белковые стандарты (Хеликон, Россия) следующего состава: целлюлаза – 94.6 кДа; бычий сывороточный альбумин (БСА) – 66.2 кДа; овальбумин – 45.0 кДа; карбоангидраза – 31.0 кДа; ингибитор трипсина – 21.5 кДа; лизоцим – 14.4 кДа.

Иммуноферментный анализ проводили после электрофоретического переноса белков с полиакриламидного геля на мембрану ПВДФ (поливинилиденфторид) (Bio Rad, США). Буфер для переноса содержал 25 мМ Трис-HCl, 200 мМ глицин, 20% метанол и 0.02% ДДС-Na. Перенос вели 2 ч с охлаждением при 80 V и 250 mA. Мембрану обрабатывали поликлональными кроличьими антителами к Л1 и Л5 ферментам или к белку SecA *E. coli*, а затем конъюгатом белка А с пероксидазой хрена (Bio Rad, США) и проводили детекцию при помощи хемилюминисцентного субстрата (Pierce, США).

Концентрацию белка измеряли по поглощению при 280 нм и методом Лоури (Lowry *et al.*, 1951).

Содержание 2-кето-3-дезоксид-маннооктоната (КДО) во внешних мембранах и везикулах определяли по реакции окисления КДО периодной кислотой (Karkahnish *et al.*, 1978).

Тейхоевую кислоту из клеточных стенок *S. aureus* 209P выделяли методом горячей экстракции, предложенным Армстронгом с соавторами (Armstrong *et al.*, 1960). Клеточные стенки *S. aureus* 209P и *B. subtilis* W23 были получены в лаборатории ранее методом Шарона в модификации Шоу (Shaw *et al.*, 1970). Клеточные стенки *E. coli* K12 также получены ранее как описано у Стрешинской с соавторами (Стрешинская *и др.*, 1979).

Общую бактериолитическую активность определяли турбидиметрическим методом. Для этого в 0.6 мл суспензии автоклавированных клеток *S. aureus* 209P в 10 мМ Трис-HCl, pH 7.5 – 8.0, с $A_{540}=0.5$ о.е. вносили 10 – 25 мкл ферментного препарата (0.11 – 0.28 мкг фермента Л5) и инкубировали при 37°C 5 – 20 мин. Реакцию останавливали помещением пробирок в лед и измеряли поглощение суспензии при 540 нм. За единицу бактериолитической активности (ЛЕ) принимали такое количество фермента, которое приводило к уменьшению поглощения клеточной суспензии на 0.01 о.е. при 37°C за 1 мин. Бактериолитическое действие ферментных препаратов определяли также по их способности лизировать автоклавированные клетки *S. aureus* 209P в концентрации 1 мг/мл в 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5 – 8.0,

вплавленные в 1% агарозный гель. В геле делали лунки, в которые вносили по 10 мкл каждого образца и инкубировали при 29°C до появления зон лизиса.

Протеазную активность измеряли по скорости расщепления казеина по методу Халла (Hull, 1974) с модификацией. Для этого к 0.2 мл 1% раствора казеина добавляли 0.2 мл раствора ферментного препарата. В контрольные пробирки вносили раствор казеина без фермента. Контрольные и опытные пробирки инкубировали 10 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 0.8 мл 5% ТХУ, а в контрольную пробирку вносили еще 0.2 мл раствора фермента и все пробы вновь инкубировали 10 мин при 37°C для формирования осадка. Полученный осадок отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 5 мин и в супернатанте определяли поглощение при 280 нм. За единицу протеазной активности (ПЕ) принимали такое количество фермента, которое при 37°C в течение 10 мин превращало казеин в неосаждаемое ТХУ состояние в таком количестве, которое соответствует повышению оптического поглощения реакционной смеси при 280 нм на 1.0.

Активность циклической фосфодиэстеразы определяли по скорости образования *p*-нитрофенола, используя в качестве субстрата натриевую соль бис(*p*-нитрофенил)фосфата (Serva, Германия) (Neu, Heppel, 1965).

Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы определяли по скорости восстановления НАДФ (Kornberg, Horecker, 1955).

Активность N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазы обнаруживали по способности препаратов гидролизовать синтетический субстрат Abz-Ala-Ala-Phe-pNA (антраноил-аланил-аланил-фенилаланил-паранитроанилид).

Мурамидазную активность обнаруживали по способности препаратов гидролизовать субстрат 4-нитрофенил β-D-N,N',N''-триацетилхитотриозид (Sigma, Германия) (Ballardie, Capton, 1972).

Очистку бактериолитического фермента Л5 проводили с использованием носителей и колонок фирм «Pharmacia» (Швеция) и «Amersham Biosciences» (Швеция). Чистоту белковых препаратов определяли электрофоретически.

N-концевую аминокислотную последовательность белка определяли методом автоматической деградации по Эдману на белковом секвенаторе "Applied BiosystemTM" (модель 477A, CISA) с автоматической идентификацией фенилтиогидантоиновых производных аминокислот на анализаторе той же фирмы (модель 120A).

Для определения некоторых свойств фермента Л5 в качестве субстрата использовали автоклавированные клетки *S. aureus* 209P. Для определения оптимального значения pH использовали 10 mM растворы Na-ацетатного буфера (pH 5.0 – 6.5), Tris-HCl буфера (pH 6.5 – 8.5) и Na-карбонатного буфера (pH 9.0 – 10.0). Определение оптимальной концентрации буфера проводили в растворах Tris-HCl, pH 7.5 с концентрацией от 5 mM до 350 mM. Зависимость бактериолитической активности фермента Л5 от температуры проводили при 30 - 100°C. Для определения температуры полуинактивации фермента Л5 препарат инкубировали при 40 - 90°C 15 мин, охлаждали, добавляли суспензию клеток *S. aureus* и проводили определение бактериолитической активности при 37°C. Для определения влияния ингибиторов на бактериолитическую активность фермента Л5 использовали: ЭДТА в концентрациях 1 mM и 10 mM, ФМСФ в концентрациях 1 mM и 2.5 mM, п-ХМБ в концентрациях 0.1 mM и 1 mM.

Литическое действие фермента Л5 на живые клетки определяли после нанесения 5 мкл ферментного препарата (0.05 мкг белка) на подросший газон клеток-

мишеней. Чашки инкубировали при 29°C, наблюдая за появлением зон лизиса. Для определения бактериолитического действия на автоклавированные клетки, выбранные тест-культуры выращивали в жидкой среде 5/5 и автоклавировали. После автоклавирования 2 мл каждой культуры клеток центрифугировали при 22000 g 3 мин и дважды промывали 10 mM Трис-HCl, pH 7.5. Плотность суспензии автоклавированных клеток доводили до $A_{540}=0.5$ о.е. тем же буфером и проводили определение бактериолитической активности.

Специфичность действия фермента Л5 определяли с использованием клеточных стенок *S. aureus* 209P, *B. subtilis* W23 и *E. coli* K12. Реакцию проводили аналогично определению общей бактериолитической активности. Для определения типа гидролизуемой связи в пептидогликане *S. aureus* 209P к 0.6 мл суспензии пептидогликана с $A_{540}=0.5$ о.е. в 10 mM Трис-HCl, pH 7.5, добавляли 50 - 100 мкл ферментного препарата, что соответствовало 0.5 - 1.1 мкг белка Л5 в реакционной смеси. Реакцию проводили 5 мин при 80°C и оставляли на ночь при 40°C. После инкубации регистрировали падение оптической плотности суспензии. Присутствие в гидролизате свободных NH_2 -групп определяли методом динитрофенилирования Гюзена и Строминджера (Ghusen *et al.*, 1966).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1 НОВЫЙ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИЙ ФЕРМЕНТ *LYSOBACTER* SP.

Для выделения бактериолитического фермента Л5 из культуральной жидкости *Lyso bacter* sp. XL1 была разработана многостадийная схема очистки. На первом этапе белки культуральной жидкости осаждали сульфатом аммония (80% насыщения). Осадок растворяли в 50 mM Трис-HCl, pH 8.0 и наносили на колонку с DEAE-сефадексом, уравновешенным 50 mM Трис-HCl, pH 8.0. В этих условиях бактериолитические ферменты *Lyso bacter* sp. XL1 не сорбировались на DEAE-сефадексе, но препарат освобождался от балластных белков. Не сорбиовавшиеся белки наносили на колонку с CM-сефадексом при аналогичных условиях. После промывки колонки 50 mM Трис-HCl, pH 8.0, сорбиовавшиеся белки элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 0.3 M в 50 mM Трис-HCl, pH 8.0. Фракции, содержащие бактериолитическую активность, объединяли, лиофильно высушивали, растворяли в небольшом объеме бидистиллированной воды и наносили на колонку Superdex75, уравновешенную 0.1 M Трис-HCl, pH 8.0 с 0.15 M NaCl. Бактериолитическая активность элюировалась с колонки четырьмя пиками. Фракции с наибольшим содержанием бактериолитического фермента Л5 объединяли и вновь наносили на колонку Superdex75, уравновешенную 0.1M Трис-HCl, pH 8.0 с 0.5 M NaCl. После элюции фракции, содержащие фермент Л5, объединяли, диализовали против 50 mM Трис-HCl, pH 8.0 и наносили на колонку monoS, уравновешенную 50 mM Трис-HCl, pH 8.0. Элюцию сорбиовавшихся белков проводили в ступенчатом градиенте концентрации NaCl от 0 до 0.5 M. Фермент Л5 элюировался с колонки при концентрации NaCl равной 0.11 M в активном состоянии и электрофоретически чистом виде (ММ около 24 кДа). Гомогенность полученного препарата была подтверждена также анализом N-концевой аминокислотной последовательности выделенного белка. Была обнаружена только одна последовательность N-концевых аминокислот: A T V Q G G I x Y R M P. Эта последовательность внесена в базу данных UniProt Knowledgebase (номер P85158).

Были изучены оптимальные условия гидролиза ферментом Л5 автоклавируемых клеток *S. aureus* 209Р. Показано, что максимально активен фермент Л5 при значении pH 7.5 и концентрации Трис-НСl буфера 10 мМ. Температурный оптимум составил 80С. Фермент Л5 является термостабильным белком – температура его полуинактивации равна 75°С. ФМСФ в концентрации 2.5 мМ ингибировал фермент на 100%. Была исследована протеазная активность фермента Л5 с использованием в качестве субстрата казеина и синтетического пептида Abz-Ala-Ala-Phe-pNA, а также мурамидазная активность с использованием субстрата 4-нитрофенил β -D-N,N',N''-триацетилхитотриозид. Показано, что фермент Л5 гидролизует казеин и синтетический пептид, но не проявлял мурамидазной активности. На основании полученных результатов можно заключить, что фермент Л5 *Lysobacter* sp. XL1 является бактериолитической сериновой протеазой.

Фермент Л5 был охарактеризован по его способности лизировать живые и «убитые» клетки различных видов микроорганизмов. Результаты представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Таблица 1. Литическое действие фермента Л5.

Микроорганизмы	Живые клетки	Убитые клетки, ЛЕ/мг белка
Грамположительные бактерии		
<i>Bacillus subtilis</i> W23	+	5120
<i>Bacillus cereus</i> 217	-	5270
<i>Micrococcus roseus</i> B1236	+	3260
<i>Micrococcus luteus</i> B1819	+	3880
<i>Corynebacterium xerosis</i>	-	4030
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	-	8990
<i>Rathayibacter tritici</i>	-	4030
<i>Listeria monocytogenes</i> n766	не определяли	14000
Грамотрицательные бактерии		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1472	-	4490
<i>Pseudomonas putida</i>	+	3880
<i>Proteus vulgaris</i> H-19	+	5580
<i>Proteus mirabilis</i> N2	+	5270
<i>Escherichia coli</i> K12	++	5120
<i>Erwinia caratovora</i> B15	-	6510
<i>Alcaligenes faecalis</i>	++	4650
Дрожжи		
<i>Torulaspora delbrueckii</i> BKM Y-706	-	1550
<i>Candida utilis</i> BKM Y-74	+	1860
<i>Candida boidinii</i> BKM Y-34	+	1705
<i>Candida guilliermondii</i> BKM Y-41	+	1395
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M660	-	930
<i>Pseudozyma fusiformata</i> BKM Y-2821	-	1395

- нет литического эффекта; + есть литический эффект; ++ очень хороший литический эффект.

Из таблицы видно, что протеаза Л5 способна лизировать «убитые» клетки всех исследованных микроорганизмов. Очевидно фермент гидролизует пептидные связи в пептидогликанах различной структуры, а также структурные белки клеточных стенок

дрожжей. Однако не все живые клетки подвергались лизису после их обработки ферментом Л5. Так, например, живые клетки *B. cereus* 217, *C. xerosis*, *S. aureus* 209Р, *R. tritici*, *P. fluorescens* 1472, *E. caratovora* В15, *T. delbrueckii* ВКМ Y-706, *S. cerevisiae* М660, *P. fusiformata* ВКМ Y-2821 оказались устойчивыми к действию фермента. Клеточные стенки живых микроорганизмов могут иметь такие особенности структуры, которые способны защитить клетку от действия литических ферментов.

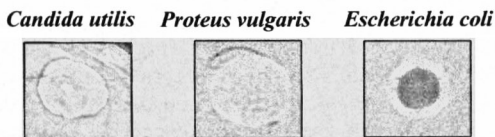


Рис. 1. Литическое действие фермента Л5 на живые клетки ряда выбранных тест-культур. Представлены фрагменты чашек с местом нанесения образца, где образовались зоны лизиса.

Действие фермента Л5 определяли также с использованием в качестве субстрата клеточных стенок *S. aureus* 209Р, *B. subtilis* W23 и *E. coli* K12. В результате проведенных исследований обнаружена способность фермента Л5 гидролизовать пептидогликан с тейхоевыми кислотами (клеточные стенки) и пептидогликан без тейхоевых кислот *S. aureus* 209Р. Активность фермента Л5 на этих субстратах, измеренная турбидиметрическим методом, была низкая (2.75 ЛЕ/мг белка и 1.65 ЛЕ/мг белка соответственно). Вероятно, в процессе гидролиза ферментом Л5 пептидогликана стафилококка образуются большие фрагменты, что приводит к слабому уменьшению поглощения реакционной смеси. Гидролиз клеточных стенок *B. subtilis* W23 и *E. coli* K12 ферментом Л5 был очень эффективным, и активность составила 620 ЛЕ/мг белка и 845 ЛЕ/мг белка соответственно. Известно, что пептидогликаны этих бактерий имеют одинаковое строение и относятся к одному А1γ типу. Такое же строение имеет пептидогликан *Lysobacter* sp. XL1 (Ситкин и др., 2003в). Ранее была установлена способность фермента Л1, гомологичного ферменту Л5, гидролизовать связь между мезо-диаминопимелиновой кислотой и D-аланином пептидной субъединицы пептидогликана *Lysobacter* sp. XL1 (Степная и др., 2005). Исходя из этого можно предположить, что фермент Л5 гидролизует такие же связи в пептидогликане *B. subtilis* W23 и *E. coli* K12.

2 СЕКРЕЦИЯ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ *LYSOBACTER* SP. В ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ

Образование и характеристика везикул *Lysobacter* sp.

Изучение возможного участия внешнемебранных везикул в секреции бактериолитических ферментов в окружающую среду было начато с электронномикроскопического исследования клеток *Lysobacter* sp. XL1 и *Lysobacter* sp. XL2. Для этого использовали два варианта условий роста культур на агаризованных средах: 1 – среда, способствующая продукции внеклеточных белков, и 2 – среда, при выращивании на которой бактерия не продуцирует внеклеточные белки.

Из рисунка 2а видно, что в условиях, способствующих продукции внеклеточных белков (среда 1), в межклеточном пространстве *Lysobacter* sp. XL1

выявляются крупные везикулы диаметром от 100 до 160 нм, заполненные веществом с низкой электронной плотностью, а также более мелкие, размером 50-60 нм. В этих же условиях в межклеточном пространстве *Lysobacter* sp. XL2 присутствуют везикулы диаметром около 50 нм (Рис. 2в). В межклеточном пространстве *Lysobacter* sp. XL1 и XL2, выращенных на среде 2, наблюдается много мелких везикул диаметром около 20 нм (Рис. 2б, 2г)

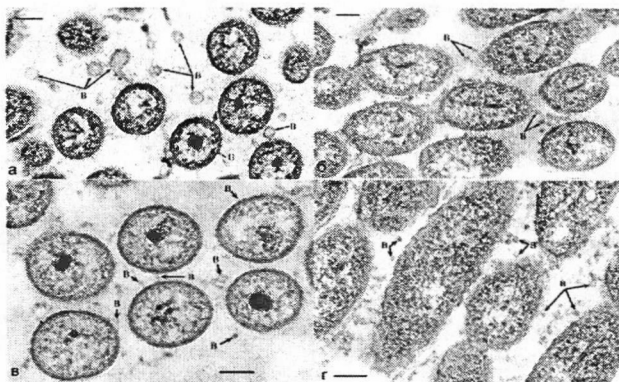


Рис. 2. Электронная микроскопия ультратонких срезов колоний клеток *Lysobacter* sp. XL1 (а, б) и *Lysobacter* sp. XL2 (в, г). а, в – клетки выращены в условиях, способствующих продукции внеклеточных белков; б, г – клетки выращены в условиях, подавляющих продукцию внеклеточных белков. В – везикулы. Метка соответствует 200 нм.

Таким образом, образование везикул у *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 наблюдается в разных условиях роста культур и, вероятно, является естественным физиологическим процессом для этой бактерии.

Препараты везикул были получены из культуральной жидкости обоих штаммов *Lysobacter* sp. при выращивании на среде, способствующей секреции бактериолитических ферментов. Как правило, везикулы грамотрицательных бактерий образуются в результате выпячивания и отшнуровывания фрагмента внешней мембраны (Beveridge, 1999). Для подтверждения внешнемембранной природы выделенных везикул *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 определяли в них КДО, который является специфическим компонентом липополисахарида (ЛПС) внешних мембран. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание КДО и белка во внешних мембранах и везикулах.

Образец	<i>Lysobacter</i> sp. XL1		<i>Lysobacter</i> sp. XL2	
	Белок, мг/мл	КДО, мМ/мл	Белок, мг/мл	КДО, мМ/мл
Везикулы	1.20	0.35	0.02	0.16
Внешние мембраны	44.30	5.50	45.00	7.00

В таблице представлены средние значения трех опытов.

Было показано, что КДО присутствует в препаратах везикул обоих штаммов. При этом в препарате везикул штамма XL2 содержится в два раза меньше КДО, чем в препарате везикул штамма XL1, хотя количество КДО в препаратах внешних мембран обоих штаммов практически не отличается. Поскольку везикулы и внешние мембраны XL1 и XL2 были получены из одинакового количества культуры клеток, то результаты определения КДО указывают на то, что штамм XL2 образует везикулы в меньшем количестве, чем штамм XL1.

Разница в размерах и количестве везикул обоих штаммов может быть связана с их участием в выводе части секретируемых белков во внеклеточное пространство. Можно предположить, что больший размер везикул *Lysobacter* sp. XL1 связан с присутствием в них большего количества белка. Из таблицы 2 видно, что действительно, в препарате везикул *Lysobacter* sp. XL2 концентрация белка составила лишь 0.02 мг/мл, в то время как в препарате везикул *Lysobacter* sp. XL1 - 1.2 мг/мл. Концентрация белка во внешних мембранах обоих штаммов не отличалась.

Было также проведено сравнение белкового состава везикул с белковым составом внешних мембран методом электрофореза в денатурирующих условиях (Рис. 3).

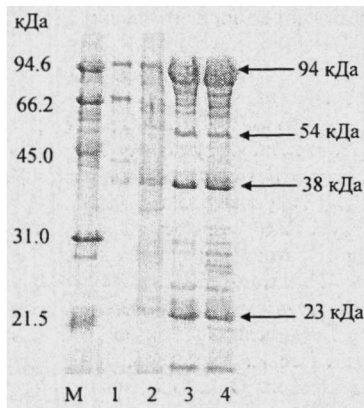


Рис. 3. Сравнительная характеристика белкового состава везикул и внешних мембран *Lysobacter* sp. М – маркеры, 1 – везикулы *Lysobacter* sp. XL1, 2 – везикулы *Lysobacter* sp. XL2, 3 – белки внешних мембран *Lysobacter* sp. XL1, 4 – белки внешних мембран *Lysobacter* sp. XL2.

Как видно из рисунка 3, внешние мембраны *Lysobacter* sp. XL1 и *Lysobacter* sp. XL2 практически не отличаются по составу мажорных белков, где присутствуют белки с молекулярной массой (ММ) около 94, 54, 38 и 23 кДа, но имеются незначительные различия по соотношению минорных (Рис. 3, образцы 3 и 4). В препаратах везикул обоих штаммов наблюдаются мажорные белки с ММ около 94 и 38 кДа и минорные белки, совпадающие по электрофоретической подвижности с белками внешних мембран (Рис. 3, образцы 1 и 2). Это также может служить подтверждением внешнемембранной природы везикул. Но вместе с тем в везикулах *Lysobacter* sp. XL1 присутствуют белки с ММ около 67 и 41 кДа, а в везикулах *Lysobacter* sp. XL2 белок с ММ около 33 кДа, которые не выявлены во внешних мембранах. Неполная идентичность белкового состава внешних мембран и везикул может указывать на локусную природу образования последних, т.е. образование везикул может осуществляться на определенных участках клеточной поверхности.

Подобное предположение ранее было высказано рядом авторов (Li *et al.*, 1996; Kadurugamuwa, Beveridge, 1996) на основании обнаруженных ими различий в структуре ЛПС везикул и внешних мембран *P. aeruginosa* PAO1. *P. aeruginosa* PAO1 экспрессирует два типа боковых цепей О-антигенов липополисахарида – А-тип и В-тип. Везикулы, однако, обогащены ЛПС с более высоким зарядом и более длинной боковой цепью В-типа. Обогащение везикул В-типом боковых цепей ЛПС может происходить в том случае, если они образуются в тех районах внешней мембраны, где расположены молекулы этого типа.

Известно, что процесс образования везикул сопровождается включением в них периплазматического содержимого (Kesty, Kuehn, 2004). В препарате везикул *Lysobacter* sp. XL1 измеряли активность циклической фосфодиэстеразы – маркер на периплазматические белки. Активность этого фермента в везикулах составила 1.6 нмоль/мг суммарного белка. В препарате везикул измеряли также активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в качестве маркера на цитозольные белки. Это определение проводили для проверки вероятности попадания цитозольных компонентов и фрагментов лизированных клеток в препарат везикул. Активность цитозольного фермента в везикулах не была обнаружена.

Таким образом, везикулы *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 имеют внешнемембранную природу и в процессе своего образования захватывают компоненты периплазмы.

Литическая активность везикул

Литическую активность везикул определяли на чашках с вплавленными в агарозный гель автоклавированными клетками *S. aureus* 209Р. Как видно из рисунка 4, зоны лизиса образуются как вокруг препаратов везикул *Lysobacter* sp. XL1, так и вокруг препаратов везикул *Lysobacter* sp. XL2. Это указывает на присутствие в везикулах бактериолитических ферментов. Рисунок также демонстрирует бактериолитический эффект препаратов культуральной жидкости обоих штаммов. Видно, что бактериолитический эффект препаратов везикул и культуральной жидкости штамма XL1 проявляется более четко, чем штамма XL2.

Известно, что автолитические системы обоих штаммов *Lysobacter* sp. являются идентичными (Ситкин *и др.*, 2003а, 2003б), и если бы активность везикул определялась присутствием в них только автолитических ферментов, то и активность везикул XL1 и XL2, вероятно, была бы одинаковой. Однако активность везикул *Lysobacter* sp. XL1 значительно выше, что позволяет предположить присутствие в них более активных внеклеточных бактериолитических ферментов.

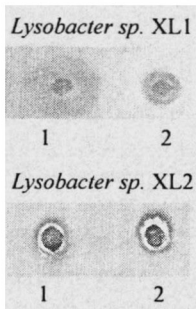


Рис. 4. Бактериолитический эффект культуральной жидкости и везикул *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 на чашках с вплавленными в агарозный гель автоклавированными клетками *S. aureus* 209Р. 1 – культуральная жидкость, 2 – везикулы. Для *Lysobacter* sp. XL1 время инкубации составило 1 сутки, для *Lysobacter* sp. XL2 – 4 суток. В каждую лунку вносили по 10 мкл образца.

Какие именно бактериолитические ферменты попадают в культуральную среду посредством везикул? *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 секретируют бактериолитические ферменты с разной субстратной специфичностью, что можно использовать для выявления конкретных ферментов в везикулах. Амидаза Л2 и мурамидаза Л3 секретируются обоими штаммами *Lysobacter* sp. и проявляют свою активность при использовании синтетических субстратов. Известно также, что в периплазме клеток обоих штаммов *Lysobacter* sp. присутствует автолитический фермент мурамидаза (Ситкин и др., 2003а, 2003б), который может попадать в везикулы в процессе их образования.

Итак, бактериолитическая активность везикул *Lysobacter* sp. XL2 может быть ассоциирована только с двумя внеклеточными бактериолитическими ферментами – амидазой Л2 и мурамидазой Л3, а также с автолитической мурамидазой. Было показано, что в препарате везикул штамма XL2 выявляется активность, характерная для амидазы Л2. Мурамидазная активность в препарате везикул не была обнаружена. На основании этих результатов был сделан вывод о том, что внеклеточная амидаза Л2 *Lysobacter* sp. XL2 выводится за пределы клетки посредством везикул.

Бактериолитическая активность везикул *Lysobacter* sp. XL1 может быть обусловлена пятью бактериолитическими ферментами. В препарате везикул этого штамма также была обнаружена активность амидазы Л2, а мурамидазной активности выявлено не было. Таким образом, внеклеточная амидаза Л2 у *Lysobacter* sp. XL1 также секретируется в культуральную среду при помощи везикул. Помимо амидазы Л2 и мурамидазы Л3 *Lysobacter* sp. XL1 секретирует в окружающую среду еще Л1, Л4 и Л5 бактериолитические ферменты. К бактериолитическим протеазам Л1 и Л5 получены поликлональные кроличьи антитела, с помощью которых можно установить присутствуют ли эти ферменты в везикулах *Lysobacter* sp. XL1.

Секреция бактериолитических протеаз Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1

Секретируемые белки грамотрицательных бактерий, к которым относятся внеклеточные бактериолитические ферменты *Lysobacter* sp. попадают из цитозоля бактерии в окружающую среду, преодолевая две мембраны. Для ферментов Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 известно, что синтезируются они в виде препробелков. Наличие сигнальной последовательности на N-конце (пре-часть синтезированной полипептидной цепи) позволяет предположить, что эти белки транслоцируются через цитоплазматическую мембрану в периплазму посредством Sec экспортного механизма. Многие принципы этого процесса в настоящее время уже установлены для *E. coli*, у которой выявлены и охарактеризованы белковые компоненты секреторного аппарата. В частности, хорошо изучена транслокационная АТФаза SecA – важный компонент цитоплазматической стадии секреции. Для *Lysobacter* не было никаких данных о существовании подобного механизма секреции, и одной из задач настоящего исследования было выявление в клетках *Lysobacter* sp. XL1 транслокационной АТФазы SecA.

Для обнаружения в клетках *Lysobacter* sp. XL1 SecA белка был проведен иммуноферментный анализ клеточных белков этой бактерии с антителами к SecA *E. coli*. В качестве контроля использовали клетки *E. coli*. Результаты представлены на рисунке 5. Иммуноферментный анализ выявил наличие в клетках *Lysobacter* sp. XL1 белка, имеющего такую же электрофоретическую подвижность, как и белок SecA *E. coli*. Однако, интенсивность проявления белковой полосы SecA в клетках *Lysobacter* sp. XL1 меньше, чем в клетках *E. coli*, хотя для анализа было взято одинаковое

количество клеток ($A_{540}=0.02$ о.е.). Разница в интенсивности проявления белковых полос может быть обусловлена либо тем, что в клетках *E. coli* белка SecA больше, либо тем, что SecA *Lysobacter* sp. XL1 является гомологом SecA *E. coli*, на который получены антитела, либо тем и другим.



Рис. 5. Иммуноферментный анализ клеточных белков *E. coli* AD93/pDD72 (1) и *Lysobacter* sp. XL1 (2) с антителами к транслокационной АТФ-азе SecA *E. coli*.

Таким образом, основываясь на полученных результатах, можно утверждать, что *Lysobacter* sp. XL1 имеет Sec экспортный механизм транслокации белков через цитоплазматическую мембрану в периплазму, который может быть использован для секреции предшественников Л1 и Л5 белков.

Для того чтобы установить секретируются ли ферменты Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 из периплазмы в окружающую среду посредством везикул, был проведен иммуноферментный анализ белков культуральной жидкости до и после осаждения везикул и самих везикул с антителами к Л1 и Л5 белкам. Электрофореграмма белков культуральной жидкости до и после осаждения везикул не демонстрирует каких-либо изменений в содержании Л1 и Л5 ферментов (Рис. 6а). Однако, иммуноферментный анализ с использованием антител к Л5 ферменту (Рис. 6б) показал, что после осаждения из культуральной жидкости везикул, содержание в ней фермента Л5 сильно уменьшается. Вместе с этим фермент достоверно выявляется в везикулах. Это указывает на то, что подавляющее количество эндопептидазы Л5 присутствует в культуральной жидкости внутри везикул. Иммуноблоттинг с использованием антител к бактериолитическому ферменту Л1 (Рис. 6в) показал, что его содержание в культуральной жидкости после осаждения везикул не изменяется, и в везикулах этот фермент не обнаруживается. Из-за высокой гомологии ферментов Л5 и Л1, полученные антитела давали перекрестную реакцию, но это не мешало интерпретации данных.

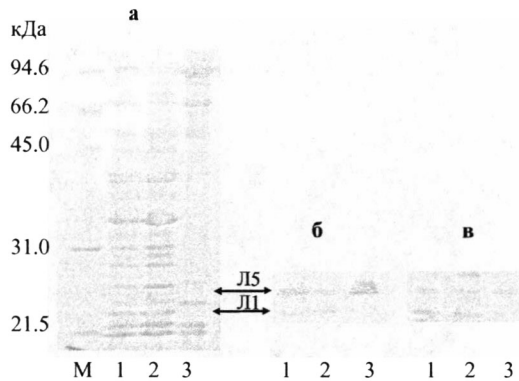


Рис. 6. Иммуноферментный анализ везикул *Lysobacter* sp. XL1. **а** – электрофорез белков культуральной жидкости и везикул; **б** – иммуноблоттинг с антителами к Л15 бактериолитическому ферменту; **в** – иммуноблоттинг с антителами к Л1 бактериолитическому ферменту. 1 – культуральная жидкость до осаждения везикул; 2 – культуральная жидкость после осаждения везикул, 3 – везикулы. Образцы культуральной жидкости содержали 0.5 мг суммарного белка, везикулы – 0.05 мг суммарного белка.

Совокупность полученных данных позволила предложить схему секреции бактериолитических ферментов Л1 и Л15 *Lysobacter* sp. XL1 из цитозоля бактерии в окружающую среду (Рис. 7).

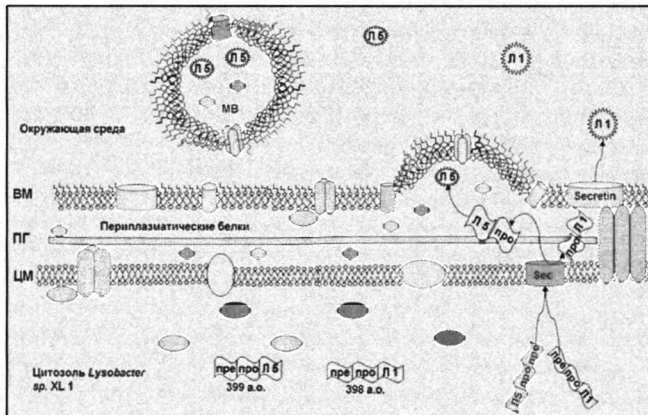


Рис 7. Механизм секреции бактериолитических ферментов Л1 и Л15 *Lysobacter* sp. XL1 из цитозоля бактерии в окружающую среду. ВМ – внешняя мембрана; ЦМ – цитоплазматическая мембрана; ПГ – пептидогликан; МВ – мембранные везикулы; препоЛ11 и препоЛ15 – предшественники Л11 и Л15 ферментов.

Бактериолитические ферменты Л1 и Л5 синтезируются в виде препробелков и транслоцируются через цитоплазматическую мембрану в периплазму, используя, вероятно, Sec экспортный механизм. В периплазме предшественники подвергаются частичному процессингу. Происходит отщепление сигнального пептида (пре-часть препробелков) и остается пробелок. Для α -литической протеазы *Lysobacter enzymogenes*, которая является гомологом Л1 и Л5 ферментов, показано, что в периплазме происходит сворачивание пробелка в практически нативную конформацию, способствующую транслокации через внешнюю мембрану посредством, как предполагается, второго (II) типа секреции. После или во время транслокации происходит автокаталитическое отщепление про-части, сопровождающееся появлением зрелого фермента (Silen, Agard, 1989). Возможно таким же образом происходит созревание и секреция фермента Л1. Поскольку для Л5 фермента показано, что в везикулах выявляется зрелый белок, то можно предположить, что его предшественник уже в периплазме превращается в зрелый фермент и захватывается везикулами в процессе их образования.

Таким образом показано, что внеклеточные бактериолитические ферменты Л2 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 попадают в окружающую среду посредством везикул. Таким же образом из клеток выводится бактериолитический фермент Л2 *Lysobacter* sp. XL2.

Биологическая роль способа секреции бактериолитических ферментов посредством везикул

Известно, что бактерии используют везикулы в агрессивной тактике, что дает им возможность получать преимущество над другими бактериями в условиях окружающей среды. Было проверено литическое действие везикул *Lysobacter* sp. XL1 в отношении различных живых микроорганизмов. Результаты представлены на рисунке 8 и в таблице 3. Установлено, что везикулы обладают литическим действием в отношении практически всех выбранных тест-культур за исключением *T. delbrueckii* BKM Y-706, *S. cerevisiae* M660 и *Sclerotinium sclerotiorum*.

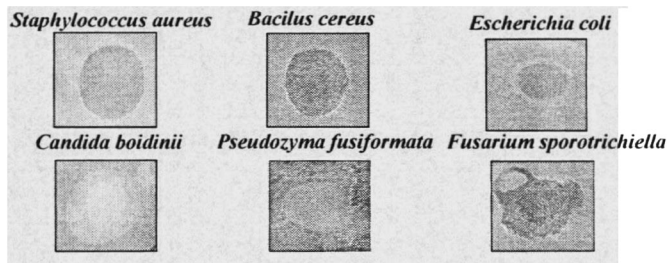


Рис. 8. Литическое действие везикул *Lysobacter* sp. XL1 на некоторые виды выбранных тест-культур. Прозрачное пятно в центре каждой фотографии – место нанесения везикул, где образовалась зона лизиса.

Таблица 3. Литическое действие везикул *Lysobacter* sp. XL1.

Микроорганизмы	Действие везикул
Грамположительные бактерии	
<i>Bacillus subtilis</i> W23	++
<i>Bacillus cereus</i> 217	++
<i>Micrococcus roseus</i> B1236	++
<i>Micrococcus luteus</i> B1819	++
<i>Corynebacterium xerosis</i>	++
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	++
<i>Rathayibacter tritici</i>	++
Грамотрицательные бактерии	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1472	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+
<i>Proteus vulgaris</i> H-19	+
<i>Proteus mirabilis</i> N2	++
<i>Escherichia coli</i> K12	++
<i>Erwinia carotovora</i> B15	++
<i>Alcaligenes faecalis</i>	++
Дрожжи	
<i>Torulaspora delbrueckii</i> BKM Y-706	-
<i>Candida utilis</i> BKM Y-74	+
<i>Candida boidinii</i> BKM Y-34	+
<i>Candida guilliermondii</i> BKM Y-41	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M660	-
<i>Pseudozyma fusiformata</i> BKM Y-2821	+
Мицелиальные грибы	
<i>Sclerotinium sclerotiorum</i>	-
<i>Fusarium sporotrichiella</i>	++

- нет литического эффекта; + есть литический эффект; ++ очень хороший литический эффект.

Исходя из полученных данных, можно предложить схему действия везикул на клетки грамположительных и грамотрицательных бактерий (Рис. 9). В случае действия на грамположительные бактерии везикулы, прикрепляясь к клеточной стенке клетки-мишени, как бы «надламываются», что способствует выходу и связыванию литических ферментов с пептидогликаном. Место прикрепления везикулы, вероятно, является местом концентрированного действия литических ферментов. Можно предположить также, что само везикулярное окружение остается связанным с пептидогликаном и, возможно, таким образом защищает свое литическое содержимое от внешнего воздействия. Иначе происходит действие везикул на клетки грамотрицательных бактерий. Это связано с наличием внешней мембраны на поверхности их клеточной оболочки, которая препятствует доступу литических ферментов к своему субстрату – пептидогликану. Действие везикул на грамотрицательные бактерии происходит, вероятно, за счет слияния мембран клеток-мишеней с везикулярной мембраной. В результате этого слияния бактериолитические ферменты везикул высвобождаются в периплазматическое пространство клетки-мишени, где находится их субстрат – пептидогликан. После попадания в периплазму клетки-мишени литические ферменты везикул разбавляются там и

концентрированного действия, как в случае грамположительных микроорганизмов, не происходит. Действие везикул на клетки грибов и дрожжей направлено, по-видимому, на структурные белки их клеточных стенок. Это действие происходит, вероятно, за счет протеазной активности ферментов Л2 и Л5.

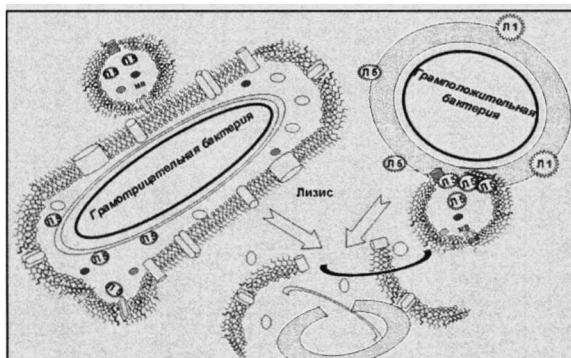


Рис 9. Схема действия везикул на клетки грамположительных и грамотрицательных бактерий. MB – мембранные везикулы.

Везикулы *Lysobacter* sp. XL1 имеют более широкий спектр литического действия, чем гомогенный фермент Л5 (Табл. 1, Табл. 3), а также намного эффективнее лизируют живые клетки различных микроорганизмов. Вклад фермента Л2 в литическое действие везикул *Lysobacter* sp. XL1, по-видимому, незначительный. Литический эффект везикул может быть использован для борьбы с патогенными микроорганизмами. Например, везикулы, содержащие фермент Л5, активно лизируют клетки *B. cereus* 217, а гомогенный фермент Л5 таким свойством не обладает. Известно, что клеточная оболочка *B. cereus* имеет такое же строение, как и оболочка *B. anthracis* – возбудителя сибиреязвенной инфекции. Исходя из этого, предположили, что везикулы *Lysobacter* sp. XL1 могут быть литически активными в отношении сибиреязвенного микроба и использованы для лечения этой инфекции. Для проверки этого предположения препарат везикул, а также препарат гомогенного фермента Л5 были переданы в Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ, г. Оболенск). В центре проверяли лечебное действие препаратов на моделях сибиреязвенной инфекции. Опыт проводили *in vivo* на беспородных белых мышах. В качестве инфицирующего агента использовали споры *B. anthracis* 71/12 (II вакцина Ценковского) в дозе 10^3 спор/мышь. Было показано, что нативный фермент Л5 в концентрации 5 и 10 мкг/мышь, введенный мышам через три часа после заражения, не обладает лечебным действием, в то время как везикулы, содержащие этот же фермент, оказывают лечебный эффект в 100% случаев. Эти результаты позволяют считать целесообразной разработку в дальнейшем методов «упаковки» отдельных бактериолитических ферментов в искусственные везикулярные структуры для получения эффективных лекарственных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые охарактеризован бактериолитический фермент Л5 *Lysobacter* sp. XL1. Показано, что фермент лизирует автоклавируемые клетки *S. aureus* 209P при концентрации буфера Трис-HCl равной 10мМ, при pH равном 7.5 и при температуре реакции равной 80°C. Температура полуинактивации фермента составила 75°C. Помимо автоклавируемых клеток *S. aureus* фермент Л5 гидролизует автоклавируемые клетки *P. fluorescens* 1472, *P. putida*, *P. vulgaris* H-19, *P. mirabilis* N2, *E. coli* K12, *E. caratovora* B15, *A. faecalis*, *B. subtilis* W23, *B. cereus* 217, *M. roseus* B1236, *M. luteus* B1819, *C. xerosis*, *S. aureus* 209P, *R. tritici*, *L. monocytogenes* n766, *T. delbrueckii* BKM Y-706, *C. utilis* BKM Y-74, *C. boidinii* BKM Y-34, *C. guilliermondii* BKM Y-41, *S. cerevisiae* M660, *P. fusiformata* BKM Y-2821; живые клетки *P. putida*, *P. vulgaris* H-19, *P. mirabilis* N2, *E. coli* K12, *A. faecalis*, *B. subtilis* W23, *M. roseus* B1236, *M. luteus* B1819, *C. utilis* BKM Y-74, *C. boidinii* BKM Y-34, *C. guilliermondii* BKM Y-41; клеточные стенки *S. aureus* 209P, *B. subtilis* W23 и *E. coli* K12. Фермент способен гидролизовать казеин и синтетический пептид. Активность фермента полностью подавляется ФМСФ. Таким образом, выделенный фермент является бактериолитической сериновой протеазой.

При изучении механизма секреции внеклеточных бактериолитических ферментов в клетках *Lysobacter* sp. XL1 был обнаружен белок SecA – компонент Sec экспортного механизма секреции белков через цитоплазматическую мембрану в периплазму. Ранее бактерии рода *Lysobacter* не были охарактеризованы относительно наличия подобного экспортного пути.

В представленной работе впервые показана способность клеток *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 образовывать везикулы. Количество везикул, образуемых штаммом XL1, больше, чем штаммом XL2. Установлено, что везикулы обоих штаммов имеют внешнемембранную природу, в процессе своего образования захватывают компоненты периплазмы и обладают бактериолитической активностью. Литическая активность везикул *Lysobacter* sp. XL2 обусловлена присутствием в них амидазы Л2, а литическая активность везикул *Lysobacter* sp. XL1 обусловлена присутствием в них амидазы Л2 и протеазы Л5. Таким образом, везикулы *Lysobacter* sp. являются естественным транспортным средством, обеспечивающим выход некоторых белков за пределы клетки.

Показано, что везикулы *Lysobacter* sp. XL1 имеют широкий спектр литического действия по отношению к различным микроорганизмам, патогенные виды которых могут представлять потенциальную опасность для растений, животных и человека. Везикулы лизируют живые клетки *P. fluorescens* 1472, *P. putida*, *P. vulgaris* H-19, *P. mirabilis* N2, *E. coli* K12, *E. caratovora* B15, *A. faecalis*, *B. subtilis* W23, *B. cereus* 217, *M. roseus* B1236, *M. luteus* B1819, *C. xerosis*, *S. aureus* 209P, *R. tritici*, *C. utilis* BKM Y-74, *C. boidinii* BKM Y-34, *C. guilliermondii* BKM Y-41, *P. fusiformata* и *F. sporotrichiella*. Установлено, что везикулы обладают более выраженным литическим действием на живые клетки выбранных тест-культур, чем очищенный фермент Л5.

Таким образом, секреция бактериолитических ферментов посредством везикул имеет для *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 важное биологическое значение в условиях окружающей среды. При помощи такого механизма секреции значительно расширяется спектр микроорганизмов, с которыми эта бактерия может конкурировать в природе.

ВЫВОДЫ

1. Выделен, очищен и частично охарактеризован не изученный ранее бактериолитический фермент Л5 *Lysobacter* sp. XL1. Новый фермент является бактериолитической сериновой протеазой.

2. В клетках *Lysobacter* sp. XL1 выявлен SecA-подобный белок. Это демонстрирует наличие у бактерии Sec экспортного пути секреции белков через цитоплазматическую мембрану.

3. Показана способность клеток *Lysobacter* sp. XL1 и *Lysobacter* sp. XL2 образовывать везикулы. Везикулы имеют внешнемембранную природу, захватывают в процессе своего образования компоненты периплазмы и обладают литическим действием.

4. Установлено, что внеклеточные бактериолитические ферменты Л2 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 и фермент Л2 *Lysobacter* sp. XL2 попадают в окружающую среду посредством внешнемембранных везикул.

5. Показано, что везикулы *Lysobacter* sp. XL1 имеют широкий спектр литического действия по отношению к различным видам микроорганизмов, в том числе представляющим потенциальную опасность для растений, животных и человека.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Vasilyeva N.V., Tsfasman I.M., Suzina N.E., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. (2008). Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles. FEBS Journal. Vol. 275 (15). P. 3827–3835.

2. Васильева Н.В., Цфасман И.М., Сузина Н.Е., Степная О.А., Кулаев И.С. Внешнемембранные везикулы *Lysobacter* sp. (2009). Доклады Академии Наук. Т.426, №2. С. 257-260.

Заявки на патенты

1. Грановский И. Э., Калинин А.Е., Лаптева Ю.С., Латыпов О.Р., Васильева Н.В., Красовская Л.А., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С., Муранова Т.А. (2009). Литический фермент AlpA бактерии *Lysobacter* sp. XL1, фрагмент ДНК, кодирующий литический фермент AlpA бактерии *Lysobacter* sp. XL1, и способ получения литического фермента AlpA бактерии *Lysobacter* sp. XL1. Заявка на патент № 2009105828.

2. Грановский И. Э., Калинин А.Е., Лаптева Ю.С., Латыпов О.Р., Васильева Н.В., Красовская Л.А., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С., Муранова Т.А. (2009). Литический фермент AlpB бактерии *Lysobacter* sp. XL1, фрагмент ДНК, кодирующий литический фермент AlpB бактерии *Lysobacter* sp. XL1, и способ получения литического фермента AlpB бактерии *Lysobacter* sp. XL1. Заявка на патент № 2009105830.

Тезисы

1. Васильева Н.В. Изучение механизмов секреции бактериолитических ферментов *Lysobacter* sp. XL1 – продуцента медицинского препарата лизоамидаза. (2006). Международная школа-конференция посвященная 100-летию со дня рождения С.И. Алиханяна «Генетика микроорганизмов и биотехнология». Москва-Пушино, 28 ноября-1 декабря. С. 66.

2. Васильева Н.В., Цфасман И.М., Сузина Н.Е., Степная О.А., Кулаев И.С. Внеклеточные бактериолитические ферменты *Lysobacter* sp. XL1: пути секреции и спектр антимикробного действия. (2007). VI симпозиум «Химия протеолитических ферментов». Москва. 23-25 апреля. С. 102-103.

3. Vasil'eva N.V., Tsfasman I.M., Suzina N.E., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. Secretion mechanism of bacteriolytic enzymes of *Lysobacter* sp. XL1 a medical preparation Lysoamidase producer. (2007). The Fourth International Conference on «Science and Business» NanoBio and Related New and Perspective Biotechnologies. Pushchino, October 15-18. P. 237-239.

4. Васильева Н.В., Цфасман И.М., Сузина Н.Е., Степная О.А., Кулаев И.С. Бактериолитическая эндопептидаза L5 *Lysobacter* sp. XL1 и ее секреция в окружающую среду (2009). IV Российский симпозиум «Белки и пептиды». Казань. 23-27 июня. С. 371.

Подписано в печать: 07.05.2010

Заказ № 3706 Тираж - 100 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

www.autoreferat.ru

