

0-795590

На правах рукописи

СТЕПНАЯ ОЛЬГА АНДРЕЕВНА

ЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ *LYSOBACTER SP.*

03.01.04 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

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

Пушкино-2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук

Научный консультант:

член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук, профессор
Кулаев Игорь Степанович

Официальные оппоненты:

Капрельянец Арсений Сумбатович
доктор биологических наук, профессор, Институт
биохимии им. А.Н. Баха РАН, заведующий
лабораторией

Честухина Галина Георгиевна
доктор биологических наук, профессор,
Государственный научный центр РФ ФГУП
Государственный научно-исследовательский
институт генетики и селекции промышленных
микроорганизмов, заведующая лабораторией

Калебина Татьяна Сергеевна
доктор биологических наук, профессор,
Московский государственный университет им.
М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского
Российской академии наук

Защита состоится 22 июня 2012 г. в 10 час. 00 мин. на заседании
Диссертационного совета Д 002.121.01 при Институте биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН по адресу: 142290, Московская обл., г. Пушкино,
Проспект Науки, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Автореферат размещен на официальном сайте
Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской
Федерации vak.ed.gov.ru и на сайте Института www.ibpm.ru.

Автореферат разослан «5» июня 2012 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

Доронина

Доронина Н.В.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КФУ



0000790623

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Состояние вопроса и актуальность проблемы

Литические ферменты*, разрушающие клеточные оболочки бактерий, были впервые обнаружены в слюне человека и описаны Александром Флемингом в 1922 году (Fleming, 1922). Вещество называли лизоцимом, что означает «фермент, растворяющий бактерии». В 1929 г. Флеминг впервые описал антибактериальные свойства гриба *Penicillium notatum* – продуцента первого промышленного антибиотика пенициллина, за что в 1945 г. в соавторстве с Эрнестом Чейном и Говардом Флори был награжден Нобелевской премией. После выпуска пенициллина и до настоящего времени проводится постоянная работа по созданию и производству новых антибиотиков, что вызвано не только необходимостью получать вещества требуемой специфичности и лучшего качества, но также постоянным появлением патогенных микробов, устойчивых к любому, даже самому новому антибиотику (www.who.int). Сложившаяся в связи с этим неблагоприятная ситуация в терапии инфекционных заболеваний заставляет искать новые эффективные антимикробные средства. Многие исследователи указывают на перспективность использования в этих целях литических ферментов, так как способ их воздействия на микробы, а именно растворение микробной клетки, позволяет надеяться на отсутствие появления устойчивых к ним патогенов.

*Термином «литические ферменты» сейчас обозначают гидролазы, разрушающие структурные полимеры клеточных стенок различных микроорганизмов. В зависимости от того, какие именно микроорганизмы они разрушают, литические ферменты разделяют на бактериолитические, дрожжелитические, миколитические. По субстратной специфичности они могут быть подразделены на хитиназы, протеазы, пептидогликангидролазы, глюканазы. Это зависит от того, какие полимеры, входящие в состав клеточных оболочек разных микроорганизмов, разрушают литические ферменты. В свою очередь, например, пептидогликангидролазы, разрушающие пептидогликан – структурный компонент клеточных стенок бактерий, в зависимости от того, какую связь в молекуле пептидогликана они гидролизуют, разделяются на гликозидазы (N-ацетилглюкозаминидазы и N-ацетилмурамидазы (лизосимы)), амидазы и эндопептидазы. Следует особо отметить бактериолитические протеазы. Среди большого количества известных в настоящее время протеаз бактериолитических совсем немного. Но именно эти ферменты в группе литических обладают самым широким спектром действия в отношении микроорганизмов. Они способны разрушать клеточные оболочки бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов, простейших.

В зависимости от контекста в настоящей работе будут использованы термины «литические ферменты», «бактериолитические ферменты», «пептидогликангидролазы», «дрожжелитические ферменты», «литические протеазы».

В период 50х – 70х годов 20 века проводилась интенсивная работа по поиску продуцентов таких ферментов, их выделению и изучению свойств. Сейчас известно, что многие живые организмы – от вирусов до человека – продуцируют литические ферменты. Среди бактерий обнаружены продуценты ферментов, активно лизирующих не только клетки бактерий-конкурентов, но и клетки микроорганизмов других систематических групп – дрожжей, мицелиальных грибов, простейших. Для таких бактерий в 1978 году был сформирован порядок *Lysobacterales*, включающий семейство *Lysobacteraceae* и род *Lysobacter*, объединяющий четыре вида (Christensen and Cook, 1978). В эту систематическую группу были переведены бактерии, ранее относившиеся к другим родам, но по ряду свойств, а главное по литической способности, отличающиеся от их типичных представителей. В дальнейшем интерес к лизирующим бактериям несколько ослаб, однако сейчас они вновь стали интересовать исследователей. В период первого десятилетия 21 века выявлено одиннадцать новых видов рода *Lysobacter*. В результате постоянно ведущейся работы по систематизации известных микроорганизмов было скорректировано и систематическое положение рода *Lysobacter*. Сейчас он включен в семейство *Xanthomonadaceae* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001). В литературе же до сих пор можно наблюдать очевидную путаницу в систематическом положении описываемых продуцентов литических ферментов. Например, продуцент ферментов, по всем свойствам аналогичных ферментам типового вида рода *Lysobacter* – *Lysobacter enzymogenes* – обозначается авторами как *Achromobacter lyticus* (Shiraki et al., 2002, Li et al., 1997).

Для бактерий, продуцирующих внеклеточные литические ферменты, как для любой бактерии, жизненно необходимы внутриклеточные автолитические ферменты, разрушающие ковалентные связи в пептидогликане – основном структурном компоненте их клеточной стенки, и играющие таким образом главную роль в процессах роста и деления. В клетках бактерий-продуцентов внеклеточных литических ферментов идет параллельный синтез и передвижение через цитоплазматическую мембрану к месту своего действия как автолитических ферментов, которые могут локализоваться в мембране, периплазме и клеточной стенке, так и внеклеточных бактериолитических ферментов, секретируемых в окружающую среду. В связи с этим логичен вопрос о механизме и регуляции процесса одновременного функционирования этих ферментов, о том могут ли автолитические ферменты являться предшественниками внеклеточных бактериолитических ферментов? К настоящему времени опубликовано большое количество работ, посвященных выделению и характеристике как внеклеточных, так и внутриклеточных бактериолитических ферментов бактерий. Однако до сих

пор нет сведений по сравнительному изучению у одной и той же бактерии вне- и внутриклеточных литических систем. Автолитические ферменты хорошо изучены у многих представителей грамположительных бактерий (Shockman, Holtje, 1994), у грамотрицательных, за исключением *Escherichia coli* (Holtje, Tuomanen, 1991), их подробно не изучали.

В 1973 году в ИБФМ АН СССР (ИБФМ РАН) по распоряжению Академии наук была начата работа по теме «Создание эффективных средств борьбы с патогенными множественно устойчивыми к антибиотикам микроорганизмами». Культуральная жидкость грамотрицательной бактерии, выделенной в 1976 году из воды реки Оки в районе очистных сооружений г. Пушкино, Московской области, явилась основой препарата, названного лизоамидаза и обладающего бактериолитической и протеолитической активностями. Успешные клинические испытания лизоамидазы позволили зарегистрировать ее в качестве лекарственного средства для лечения наружных инфекций, вызванных грамположительной микрофлорой. По ряду морфологических и биохимических признаков бактерия-продуцент была предположительно отнесена к роду *Xanthomonas*. Однако по ряду существенных свойств, например, по отсутствию подвижности, продуцент лизоамидазы отличался от бактерий этого рода.

Цель и задачи работы

Цель работы – исследование биохимических и генетических особенностей функционирования и взаимосвязи внутриклеточной и внеклеточной литических систем бактерии-продуцента препарата лизоамидаза для создания на основе полученной информации нового поколения антимикробных лекарственных средств.

Основные задачи:

- уточнение таксономического положения бактерии-продуцента;
- установление структуры пептидогликана бактерии-продуцента – субстрата автолитических ферментов;
- выделение и характеристика внеклеточных литических ферментов бактерии-продуцента;
- выделение и характеристика внутриклеточных (автолитических) ферментов продуцента;
- установление структуры генов внеклеточных литических ферментов

продуцента;

- исследование особенностей взаимодействия литических ферментов с различными микроорганизмами-мишенями;
- получение рекомбинантных литических ферментов продуцента и изучение их свойств для оценки возможности использования таких ферментов в качестве основы новых антимикробных препаратов;
- изучение возможности использования лизоамидазы и различных форм литических ферментов продуцента для лечения «внутренних» инфекций на примере сибирской язвы.

Научная новизна работы

На основании установленных морфологических, биохимических и генетических свойств бактерия-продуцент антимикробного препарата лизоамидаза отнесена к роду *Lysobacter*. Исследуемый в настоящей работе штамм *Lysobacter* sp. XL1 был получен путем селекции из исходной культуры и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ В-2249Д). Установлено, что при длительном выращивании этого литически высокоактивного штамма на средах, способствующих секреции внеклеточных продуктов, в популяции возникают и накапливаются за счет большей скорости роста клетки литически низкоактивного штамма *Lysobacter* sp. XL2.

Впервые охарактеризованы эндоклеточная и экзоклеточная литические системы одной и той же бактерии на примере *Lysobacter* sp. XL1 и XL2. В составе эндоклеточной системы обоих штаммов выявлено девять ферментов разной субстратной специфичности и локализации (глюкозидазы, амидазы, эндопептидазы). В составе внеклеточной литической системы *Lysobacter* sp. XL1 обнаружено пять ферментов, среди которых мурамидаза (Л3), амидаза (Л2), три эндопептидазы (Л1, Л4, Л5). Внеклеточная литическая система низкоактивного штамма *Lysobacter* sp. XL2 состоит из мурамидазы и амидазы. Свойства ферментов разных литических систем значительно отличаются друг от друга: внутриклеточные ферменты являются кислыми белками, активными при 29°C – температуре оптимального роста бактерий, высоком значении ионной силы среды и щелочном значении pH; внеклеточные ферменты – щелочные белки, активные при низких значениях ионной силы, щелочном pH и высоких температурах (50°–80°C).

Впервые выявлено, что постсекреторное электростатическое взаимодействие высокомолекулярного кислого полисахарида и ферментов *Lysobacter* sp. XL1 приводит не только к значительной стабилизации ферментов, но и, в ряде случаев, к изменению их активности. Полисахарид усиливает действие мурамидазы на клетки золотистого стафилококка, а литические ферменты, связанные с полисахаридом, становятся способными разрушать покоящиеся споры бактерий рода *Bacillus*. Полисахарид *Lysobacter* sp. XL1 полностью ингибирует активность ряда литических ферментов других продуцентов. Очевидно, что образование микроорганизмами таких внеклеточных комплексов является для них экологически значимым.

Впервые показано, что внеклеточные литические ферменты Л2 и Л5 *Lysobacter* sp. попадают в окружающее клетку пространство внутри образуемых бактерией внешнемембранных везикул. Ферменты, заключенные в везикулы, способны лизировать живые клетки представителей различных групп микроорганизмов, например, грамотрицательных бактерий родов *Pseudomonas*, *Proteus*, *Erwinia*, *Alcaligenes*, грамположительных бактерий, относящихся к родам *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Rothayibacter*, дрожжей рода *Candida*, мицелиального гриба *Sclerotinia sclerotiorum*, в отличие от литических ферментов, находящихся вне везикул. Таким образом, подобный путь секреции литических ферментов имеет для клетки-продуцента важное биологическое значение, так как расширяет спектр микроорганизмов, с которыми она может конкурировать в природе.

Установлены важные особенности взаимодействия внеклеточных литических ферментов *Lysobacter* sp. с нативными клетками-мишенями. Для эффективного гидролиза клеток грамположительных бактерий ферментам необходим предварительный контакт с отрицательно заряженным полимером клеточной стенки (тейхоевыми или тейхуроновыми кислотами), при этом химическая структура полимера не имеет решающего значения. Нативные клетки грамотрицательных бактерий литические ферменты *Lysobacter* sp. (за исключением Л5) разрушают только при условии предварительной дестабилизации внешней мембраны клетки-мишени подходящим способом (температура, полимиксин В, гентамицин, амикацин). Литический фермент Л5 разрушает клетки грамотрицательных бактерий без предварительной обработки.

Практическое значение работы

На основании полученных данных разработан и масштабирован новый регламент получения препарата лизоамидаза с высоким выходом целевого продукта (до 80%).

Разработаны способы получения двух рекомбинантных литических эндопептидаз *Lysobacter* sp. XLI с использованием гетерологичных систем на основе *E. coli* (рефолдинг из телец включения) и *Pseudomonas fluorescens* (очистка секретируемых белков).

Установлена возможность использования препарата лизоамидаза, а также везикул *Lysobacter* sp. XLI для лечения различных форм экспериментальной сибирской язвы.

На основе материалов диссертации получены патенты РФ: № 2139348 (1999), № 2193063 (2002), № 2296576 (2007), № 2407782 (2010), № 2408725 (2011), патент USA № 7,150,985 B2 (2006), патент Китая № 274608 (2006), Европейский патент № 1902719 B1 (2011).

Полученные в работе новые данные используются в курсах по биохимии на биологическом факультете МГУ им М.В. Ломоносова и биологических факультетах других высших учебных заведений.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на третьей и четвертой Всесоюзной конференции «Биосинтез ферментов микроорганизмами», Кобулет, 1986; Ташкент, 1988; Второй Всесоюзной конференции «Раны и раневая инфекция», Москва, 1986; 14 International Congress of Biochemistry, Prague, CSSR, 1988; Всесоюзной конференции «Регуляция микробного метаболизма», Пушкино, 1989; Пятой международной конференции по химии и биотехнологии активных природных соединений, Варна, Болгария, 1989; 1 International symposium «Molecular organization of biological structures», Moscow, 1989; 5 European congress on Biotechnology, Copenhagen, 1990; International conference on antimicrobial activity of nonantibiotics, Copenhagen, 1990; Конференции «Биосинтез и деградация микробных полимеров. Фундаментальные и прикладные аспекты», Пушкино, 1995; International Conference «Microbial polysaccharide», Canada, 1995; First International Conference «Polysaccharide Engineering» Trondheim, Норвегия, 1995; Конференции хирургов, Калуга, 1996; IV симпозиуме «Химия протеолитических ферментов», Москва, 1997; Втором съезде биохимического общества РАН, Москва, 1997;

семинаре-презентации инновационных научно-технических проектов «Биотехнологии Подмосковья-97», Пущино, 1997; International symposium «Modern problems of microbial biochemistry and biotechnology», Pushchino, 2000; международной конференции «Биотехнология на рубеже двух тысячелетий», Саранск, 2001; 3 Съезде биохимического общества, Санкт-Петербург, 2002; Всероссийской конференции «Проблемы медицинской энзимологии. Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия», Москва, 2002; Втором, Пятом, Шестом московских международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2003, 2009, 2011; Первом Всероссийском конгрессе «Успехи медицинской микологии», Москва, 2003; III Conference «Biotechnology: State and Perspective of Investigation», Moscow, 2005; Третьей Всероссийской школе-конференции «Химия и биохимия углеводов», Саратов, 2004; Конференции «Фундаментальные науки-медицине», Москва, 2005; конференции «Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств», Москва, 2008; Всероссийской конференции «Экотоксикология-2010», Тула, 2010; Конференции «Фундаментальные науки - медицине», Москва, 2010, Всероссийском симпозиуме с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее», Москва, 2011.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 84 работы: 1 обзор, 31 экспериментальная статья в рекомендуемых ВАК изданиях, 9 Российских и зарубежных патентов, тезисы 43 докладов.

Структура и объем работы

Работа состоит из введения, обзора литературы, изложения и обсуждения полученных результатов, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 274 страницах, содержит 20 таблиц и 50 рисунков. Список цитируемой литературы включает 597 источников.

Место выполнения работы и личный вклад соискателя.

Основная часть работы выполнена в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ РАН), часть результатов получена при выполнении совместных работ в Институте органической химии им.

Н.Д. Зелинского РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова, Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии.

Личный вклад автора состоял в планировании и проведении исследований, анализе и обобщении полученных результатов, их оформлении для публикаций.

Автор выражает глубокую признательность всем коллегам, принимавшим участие в представленной работе на различных этапах ее выполнения: к.б.н. Цфасман И.М., к.б.н. Бегуновой Е.А., к.б.н. Ситкину Б.В., Ледовой Л.А., к.б.н. Васильевой Н.В., к.б.н. Чайка И.А., к.б.н. Рязановой Л.П., к.б.н. Сузиной Н.Е., д.б.н. Курочкину И.Н., д.б.н. Тульской Е.М., д.б.н. Наумовой И.Б., к.б.н. Стрешинской Г.М., Зубрицкой Л.Г., Барковой Н.Г., к.х.н. Красовской Л.А., к.х.н. Мурановой Т.А., д.х.н. Книрелю Ю.А., к.х.н. Сенченковой С.Н., к.х.н. Лихошерстову Л.М., д.х.н. Шашкову А.С., к.б.н. Шишковой Н.А., к.м.н. Маринину Л.И., к.м.н. Старицину Н.А., к.б.н. Грановскому И.Э., Лаптевой Ю.В., к.б.н. Латыпову О.Р., к.б.н. Калинин А., д.б.н. Крупянко В.И., д.б.н. Северину А.И., к.б.н. Абрамочкину Г.В., д.б.н. Козловскому А.Г., Лысанской В.Я., к.ф.-м.н. Карпову А.В., к.ф.-м.н. Сидорову И.А., д.б.н. Вагабову В.М.

Автор искренне благодарен своему учителю и консультанту настоящей работы чл.-корр. РАН Кулаеву И.С.

Защищаемые положения:

1. На основе отдельных литических ферментов *Lysobacter* sp. (нативных и рекомбинантных), а также внешнемембранных везикул могут быть созданы новые антимикробные препараты широкого спектра действия, активные против множественно устойчивых к антибиотикам патогенных микроорганизмов.
2. Внеклеточная и внутриклеточная системы литических ферментов *Lysobacter* sp. (XL1, XL2) функционируют независимо, количество и свойства литических ферментов разных систем значительно отличаются друг от друга.
3. Полисахарид *Lysobacter* sp. XL1 удерживает, перемещает литические ферменты бактерии в околоклеточном пространстве, стабилизирует ферменты и регулирует их активность, защищает клетку бактерии-продуцента от чужеродных литических ферментов.
4. Внеклеточные литические ферменты *Lysobacter* sp. XL1 в сочетании с полисахаридом эффективно разрушают покоящиеся споры бактерий рода

Bacillus. Установленный факт имеет большое значение для разработки способов борьбы с сибиреязвенной инфекцией.

5. Разрушение клеток грамположительных и грамотрицательных бактерий литическими ферментами имеет различные механизмы.
6. Везикулярный способ секреции бактериальных литических ферментов имеет важное биологическое значение для бактерии-продуцента, расширяя спектр потенциальных микроорганизмов-мишеней.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МЕТОДЫ

Основным объектом исследований являлась бактерия *Lysobacter* sp. (XL1, XL2). В работе использовали также микроорганизмы, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, г. Пушкино); из Государственного института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (ГИСК, г. Москва).

В ходе выполнения работы использовались различные микробиологические, биохимические, молекулярно-биологические, физико-химические методы исследования.

Ферментный препарат лизоамидаза получали на опытно-технологической установке ИБФМ РАН из культуральной жидкости бактерии *Lysobacter* sp. XL1.

В ходе лабораторных исследований *Lysobacter* sp. XL1 и *Lysobacter* sp. XL2 выращивали на средах различного состава, в том числе 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), – 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 %.

Периплазматическую фракцию клеток *Lysobacter* sp. XL1 и *Lysobacter* sp. XL2 получали осмотическим шоком по методу Носсала и Хэппела (Nossal, Heppel, 1966). После обработки осмотическим шоком замороженные при –70 °С клетки разрушали на прессе и разделяли центрифугированием при различных скоростях на клеточные стенки и мембраны (осадок) и цитозоль (надосадочная жидкость).

Разделение белков внешней и цитоплазматической мембран проводили по методу Шнайtmана (Schnaitman, 1971).

Солюбилизацию автолитических ферментов из фракции клеточных стенок и мембран проводили последовательно 5 М раствором LiCl и 1% тритоном X-100 (Brown, 1973; Mett *et al.*, 1980).

Чистоту и природу получаемых после фракционирования клеточных фракций определяли по активности маркерных ферментов. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы определяли по скорости восстановления NADP (Kornberg, Horecker, 1955). Активность лактатдегидрогеназы определяли по скорости окисления NADH (Kornberg, 1966). Активность циклической фосфодиэстеразы определяли по скорости образования *p*-нитрофенола, используя в качестве субстрата натриевую соль бис(*p*-нитрофенил)фосфата (Neu, Heppel, 1965).

Автолитическую активность клеточных фракций определяли по способности лизировать автоклавированные клетки *Lysobacter* sp. XL1, вплавленные в 1%-ный агарозный гель. Автолитическую активность ферментных препаратов определяли по уменьшению оптической плотности суспензии автоклавированных клеток *Lysobacter* sp. XL1 при 400 нм.

Содержание белка измеряли по поглощению при 280 нм, методами Лоури (Lowry *et al.*, 1951) и Брэдфорд (Bradford, 1976).

Электрофоретический анализ автолитических ферментов клеточных фракций *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 проводили в неденатурирующих условиях в полиакриламидном геле (ПААГ), используя анодную (Ornstein, Devis, 1964) и катодную системы (Reisfeld *et al.*, 1962). Электрофорез в присутствии SDS-Na проводили в системе Лэммли (Laemmli, 1970).

Клеточные стенки грамположительных бактерий получали методом Шарона в модификации Шоу (Shaw *et al.*, 1970). Тейхоевую кислоту из клеточных стенок выделяли методом горячей экстракции ТХУ (Armstrong *et al.*, 1960).

Пептидогликан грамотрицательных бактерий получали в два этапа. На первом этапе выделяли пептидогликан-липополисахаридный комплекс бактерии с помощью модифицированных методов Braun and Sieglin (1970) и Goodwin and Shedlarsk (1975). На втором этапе получали пептидогликан по методу Стрешинской и соавт. (1979).

Для определения структуры пептидогликана образцы гидролизovali в 6 н HCl 18 ч. Полученные гидролизаты анализировали по методу Спакмана с соавт. (Spackman *et al.*, 1958) в модификации на автоматическом анализаторе аминокислот Т339 («Microtehn», Чехославакия). Конфигурацию

диаминопимелиновой кислоты определяли методом нисходящей бумажной хроматографии (Rhuland *et al.*, 1955).

Субстратную специфичность литических ферментов определяли по их способности расщеплять *p*-нитрофенил-2-ацетида-2-дезокс- β -D-глюкопиранозид (NADG) – субстрат для глюкозаминидаз (Doson *et al.*, 1991), 3,4-динитрофенил-тетра-N-ацетил- β -D-хитотетраозид (DTAC) – субстрат для мурамидаз (Ballardie, Capon, 1972), Abz-Ala-Ala-Phe-pNA (антраноил-аланил-аланил-фенилаланил-паранитроанилид) – субстрат для N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазы J12.

Присутствие в гидролизате свободных NH_2 -групп определяли методом Гюзена (Ghuysen *et al.*, 1966).

Очистку белков проводили методами ионообменной хроматографии, гельфильтрации, а также электрофореза в полиакриламидном геле. Структуру внеклеточного кислого полисахарида *Lysobacter* sp. XLI определяли так как описано в работе Лихошерстова с коллегами (Likhosherstov *et al.*, 1995).

Количество полисахарида измеряли антроновым методом (Захарова и Косенко, 1982).

Для изучения действия лизоамидазы и ее компонентов на эндоспоры бактерий рода *Bacillus* использовали следующие методики:

1) К суспензиям спор добавляли лизоамидазу или лизоцим и инкубировали при 37°C в течение 20 часов. Споры собирали центрифугированием и трижды отмывали стерильной водой. Для индуцирования прорастания и инактивации вегетативных клеток споры прогревали при 80 °C в течение 15 минут, после чего споровый материал переносили в жидкую среду для прорастания при 29°C.

2) К спорным суспензиям добавляли лизоамидазу, гомогенные ферменты, полисахарид или различные вариации реконструированных фермент-полисахаридных комплексов. Пробы инкубировали при 37 °C на качалке в течение 24 часов. Споры собирали центрифугированием, дважды отмывали 0,1 М NaCl и 3 раза стерильной водой. Затем для инактивации ферментов лизоамидазы и вегетативных клеток и индуцирования прорастания споры прогревали при 85°C в течение 20 минут. Далее весь споровый материал переносили в жидкую среду для прорастания. Через 0, 7 и 9 часов прорастания делали высевы по 0,1 мл из жидкой среды на чашки с агаризованной средой. Прорастание спор проводили при 29°C. В жидкой среде прорастание контролировали по OD_{600} , на чашках – визуально, по образованию колоний.

N-концевые аминокислотные последовательности белка и пептидов определяли методом автоматической деградации по Эдману. Гидролиз трипсином немодифицированного белка и белка, модифицированного винилпиридином (Friedman, *et al.*, 1970), проводили в N-этилморфолин-ацетатном буфере (pH 8,0). Гидролизат высушивали лиофильно. Затем его растворяли в трифторуксусной кислоте (ТФУ) и разделяли методом обратнотазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в градиенте концентрации ацетонитрила (0–80%).

Везикулы получали из культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1 и *Lysobacter* sp. XL2. Клетки удаляли центрифугированием при 4500 g в течение 20 мин и повторным центрифугированием супернатанта при 22000 g в течение 25 мин. Из полученной культуральной жидкости везикулы осаждали центрифугированием при 140000 g в течение 2 ч при 4 °C, промывали и хранили при –20 °C.

Ультратонкие срезы готовили по Рейнольдсу (Reynolds, 1963).

Для определения литического действия везикул использовали живые клетки грамотрицательных и грамположительных бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов. На подросший газон клеток-мишеней наносили препарат везикул *Lysobacter* sp. XL1 и инкубировали при 29°C до появления зон лизиса.

Иммуноферментный анализ проводили после электрофоретического переноса белков с полиакриламидного геля на мембрану ПВДФ (поливинилиденфторид). Мембрану обрабатывали поликлональными кроличьими антителами к Л11(AlpA) и Л15(AlpB) ферментам или к белку SecA *E. coli*, а затем конъюгатом белка А с пероксидазой хрена и проводили детекцию при помощи хемилюминисцентного субстрата.

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

Общую бактериолитическую активность определяли турбидиметрическим методом по уменьшению оптической плотности автоклавированных клеток *S. aureus* 209P. За единицу бактериолитической активности (ЛЕ) принимали количество фермента, приводящее к уменьшению поглощения клеточной суспензии на 0,01 о.е. при 37° С за 1 мин. Бактериолитическое действие ферментных препаратов определяли также по их способности лизировать автоклавированные клетки *S. aureus* 209P, вплавленные в 1% агарозный гель.

Протеазную активность измеряли по скорости расщепления казеина (Hull, 1974) с модификацией. За единицу протеазной активности (ПЕ) принимали такое количество фермента, которое при 37 °С в течение 10 мин превращало казеин в неосаждаемое ТХУ состояние в количестве, соответствующем повышению оптического поглощения реакционной смеси при 280 нм на 1,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Таксономическое положение бактерии-продуцента препарата лизоамидаза

Бактерия – продуцент препарата лизоамидаза – выделена в 1976 г из воды реки Оки сотрудниками ИБФМ РАН.

Исследуемый в настоящей работе литически высокоактивный штамм (XL1) был получен путем селекции из исходной культуры и депонирован в ВКМ (В-2249Д). На рисунке 1 представлены фотографии клеток бактерии, визуализированных при помощи микроскопии.

Бактерия представляет собой неподвижные грамотрицательные ровные палочки с округлыми концами, одиночные, в парах или цепочках, не образующие спор, без жгутиков. Клетки, выращенные на агаризованных средах, имеют размер 0,5-0,7 x 2,0-5,0 мкм, в жидких – 0,3-0,5 x 3,0-8,0 мкм.

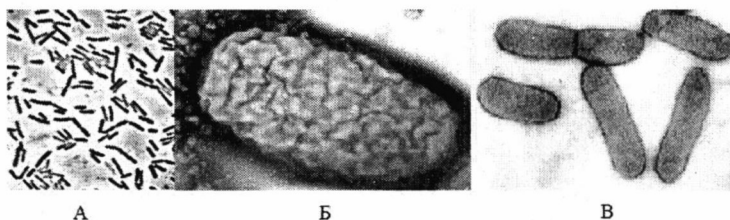


Рисунок 1. Фотографии клеток бактерии.

А - световая микроскопия, x 1320; Б, В - электронная микроскопия, x 72000, x 42000, соответственно.

Морфологические и биохимические свойства позволили отнести этот штамм к роду *Lysobacter* (Christensen and Cook, 1978). Анализ установленной нуклеотидной последовательности гена, кодирующего 16-S РНК продуцента, проведенный при помощи компьютерных программ анализа ДНК и РНК, представленных в базе данных «Ribosomal Database Project» (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), также подтвердил, что изучаемая бактерия относится к роду *Lysobacter*.

Определена химическая структура пептидогликана исследуемой бактерии. В соответствии с классификацией Шлейфера и Кандлера (Schleifer, Kandler, 1972) она относится к A1 γ типу. Гликановая цепь пептидогликанов этого типа состоит из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, каждая мурамовая кислота несет тетрапептид с аминокислотной последовательностью: L-аланин – γ -D-глутаминовая кислота – мезо-диаминопимелиновая кислота – D-аланин. В пептидогликанах A1 γ типа отсутствуют межпептидные мостики, а пептидные субъединицы соседних гликановых цепей соединены при помощи мезо-диаминопимелиновой кислоты в третьем положении одной субъединицы и D-аланина в четвертом положении другой субъединицы. Пептидогликаны A1 γ типа характерны для большинства изученных грамотрицательных бактерий.

Система внутриклеточных (автолитических) пептидогликангидролаз *Lysobacter* sp.

При длительном культивировании *Lysobacter* sp. XL1 на средах, обеспечивающих высокий уровень внеклеточной литической активности, в популяции появляются малоактивные клетки (рисунок 2А), которые со временем вытесняют высокоактивные, так как скорость их роста на таких средах выше (рисунок 2Б). Малоактивный вариант бактерии был обозначен как *Lysobacter* sp. XL2.

Для характеристики системы внутриклеточных автолитических ферментов клетки *Lysobacter* sp. XL1 и *Lysobacter* sp. XL2 выращивали на двух вариантах сред: способствующих продукции внеклеточных литических ферментов (среда 1) и блокирующих их продукцию (среда 2). В клетках *Lysobacter* sp. XL1 и XL2, не продуцирующих внеклеточные ферменты, выявлено девять внутриклеточных пептидогликангидролаз (A1-A6, A8-A10) различной локализации.

Шесть из них обнаружены в цитозоле (A1-A6), один в периплазме (A8), два во фракции клеточных стенок и мембран (A9, A10). При переходе культур от логарифмической к стационарной стадии роста наблюдались изменения в активности цитозольных ферментов – активность фермента A1 значительно

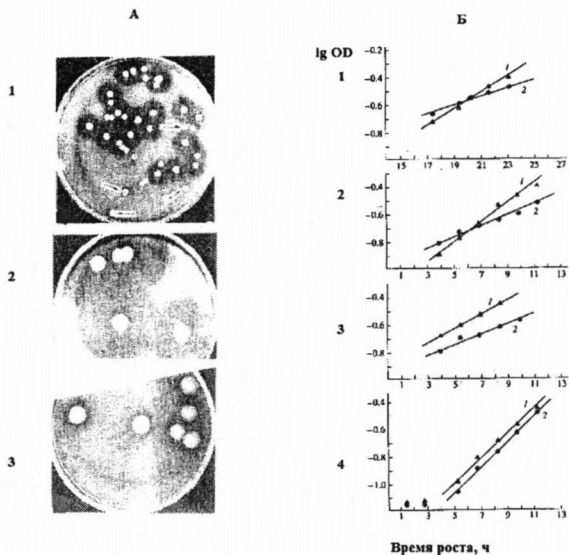


Рисунок 2. Расщепление культуры *Lysobacter* sp.

А - фотографии колоний клеток *Lysobacter* sp. и зон лизиса клеток золотистого стафилококка, вплавленных в агаризованную среду, вокруг них. 1-колонии клеток литически высокоактивного (XL1) и низкоактивного (XL2) штаммов *Lysobacter* sp. Колонии низкоактивного штамма обозначены стрелками. 2- колонии клеток *Lysobacter* sp. XL1. 3- колонии клеток *Lysobacter* sp. XL2.

Б - скорость роста *Lysobacter* sp. XL2 (1) и *Lysobacter* sp. XL1 (2) на различных средах. 1 –минеральная среда, 2- дрожжепептонная среда, 3 - среда 5/5, 4- среда LB «супербульон».

увеличивалась, в то время как активность ферментов A_5 и A_6 уменьшалась. В цитозоле клеток *Lysobacter* sp. XL1, продуцирующих внеклеточные ферменты, в отличие от *Lysobacter* sp. XL2, выявлена дополнительная пептидогликангидролаза A_7 . На основе имеющихся в настоящий момент данных можно предположить, что фермент A_7 является частично процессированной формой предшественника внеклеточной литической эндопептидазы Л5, продуцируемой *Lysobacter* sp. XL1 (см. ниже). На рисунке 3 представлены электрофореграммы цитозольных автолитических ферментов *Lysobacter* sp. XL1. Таким образом, система автолитических ферментов *Lysobacter* sp. XL2 (продуцирующего и непродуцирующего внеклеточные литические ферменты) и *Lysobacter* sp. XL1, непродуцирующего внеклеточные ферменты, включает в себя 9 ферментов, автолитическая система *Lysobacter* sp. XL1, продуцирующего внеклеточные ферменты – 10.

Установлена субстратная специфичность автолитических ферментов *Lysobacter* sp. Периплазматический фермент А8, цитозольный А1 и фермент А10, солибилизованный из клеточных стенок и мембран Тритон X-100, проявляли гликозаминидазную активность. Цитозольный фермент А4 и фермент А9,

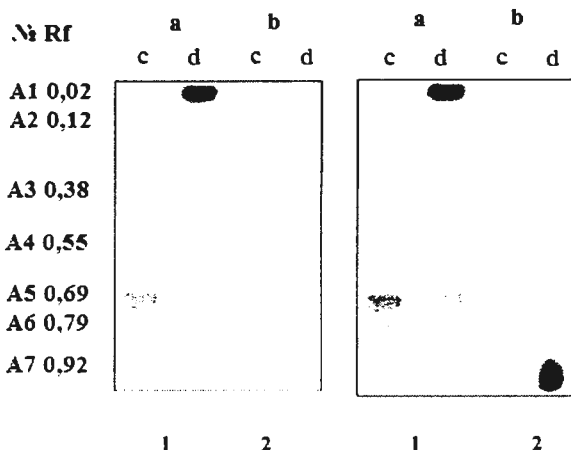


Рисунок 3. Электрофореграмма цитозольных автолитических ферментов *Lysobacter* sp. XL1. а – электрофорез в анодной системе, б – электрофорез в катодной системе, 1 – цитозоль клеток *Lysobacter* sp. XL1. (среда 2), 2 – цитозоль клеток *Lysobacter* sp. XL1. (среда 1), с – цитозоль клеток логарифмической фазы роста, d – цитозоль клеток стационарной фазы роста, А1-А7 – автолитические ферменты, темные пятна – зоны лизиса клеток *Lysobacter* sp. XL1, вплавленных в агарозный гель, на который накладывали ПААГ после электрофореза.

солибилизованный из клеточных стенок и мембран LiCl, являются мурамидазами. Цитозольные ферменты А3 и А6 – N-ацетилмурамоил-L-аланин-амидазы. А5 – диаминопимелиноил-аланин эндопептидаза.

Изучены некоторые физико-химические свойства ферментов А5, А6 – наиболее активных автолитических ферментов цитозоля *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 – и фермента А7, присутствующего только в цитозоле клеток *Lysobacter* sp. XL1, продуцирующих внеклеточные литические ферменты (таблица 1). Таким образом, внутриклеточные автолитические ферменты *Lysobacter* sp. в основном являются кислыми белками, активными при 29 °С – температуре оптимального роста бактерии, высоком значении ионной силы среды и щелочном значении pH.

Таблица 1. Свойства некоторых автолитических ферментов *Lysobacter* sp.

Фермент	Оптимальные условия активности			Температура полуинактивации, °С
	pH	Концентрация буфера, mM	T, °С	
Глюкозаминидаза A1	8,0	30-300	37-40	47
Эндопептидаза A5	7,5	50-200	29	45
Амидаза A6	7,5-8,0	50-200	29	40
Эндопептидаза A7	7,0	25-100	29	50

Внеклеточные продукты *Lysobacter* sp.

Система внеклеточных пептидогликангидролаз *Lysobacter* sp.

Lysobacter sp. XL1 на средах, способствующих образованию внеклеточных продуктов, секретирует пять литических ферментов: мурамидазу Л3, амидазу Л2, три эндопептидазы (Л1, Л4, Л5). *Lysobacter* sp. XL2 – только два (Л2, Л3) (рисунок 4). Все ферменты в той или иной степени охарактеризованы (таблица 2).

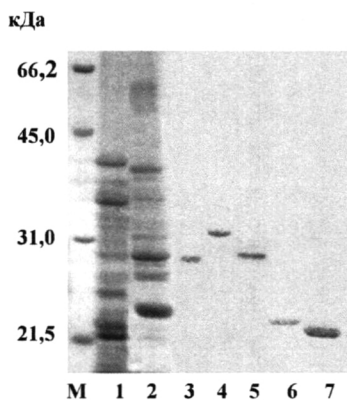


Рисунок 4. Электрофореграммы культуральных жидкостей *Lysobacter* sp. XL1 и *Lysobacter* sp. XL2 и очищенных литических ферментов. М – маркеры (БСА – 66,2 кДа, овальбумин – 45,0 кДа, карбоангидраза – 31 кДа, ингибитор трипсина – 21,5 кДа), 1 – культуральная жидкость *Lysobacter* sp. XL1 (1мл на дорожку), 2 – культуральная жидкость *Lysobacter* sp. XL2 (10 мл на дорожку), 3 – мурамидаза (Л3), 4 – амидаза (Л2), 5 – эндопептидаза Л5, 6 – эндопептидаза Л1, 7 – эндопептидаза Л4.

Таблица 2. Сравнительная характеристика свойств внеклеточных бактериолитических ферментов *Lysobacter* sp.

Фермент	ММ, кДа	Оптимум рН	Трис- HCl, мМ*	Оптимум темпера- туры, °С	Ингибитор	Субстратная специфичность	N-концевая аминокислотная последовательность	Номер в UniProt Knowledge base
Л11	22	7 - 11	50,0	70	ФМСФ, п-ХМБ	Gly-Gly эндопептидаза, N-ацетилмурамоил-L- аланинамидаза ЕС 3.4.21.12	V N V L G G I E Y S I N N A T L C S V G F S V	P27459
Л12	29	8,0	50,0	65	ЭДТА, ФМСФ	N-ацетилмурамоил-L- аланинамидаза	x N V V F L N x P x P Q V	P85143
Л13	25	8,0	0,1	60	н.о.	Мурамидаза	I A I Q G G x G Y L x Q P G D G Y K Y A	P85152
Л14	21	8,0	50,0	50-55	ФМСФ, п-ХМБ	Диаминопимелиноил- аланин эндопептидаза	A V V N G V N Y V G E T T A A	P85155
Л15	24	7,5	10,0	80	ФМСФ	Эндопептидаза	A T V Q G G I x Y R M P	P85158

*) Оптимальная концентрация

x – Неидентифицированные аминокислотные остатки

н.о. – не определяли

Из таблицы 2 следует, что внеклеточные литические ферменты *Lysobacter* sp. являются белками с небольшой молекулярной массой в пределах от 21 до 29 кДа. Оптимальными для проявления активности ферментов являются щелочные значения pH и низкие значения ионной силы реакционной смеси. Следовательно, свойства внеклеточных литических ферментов заметно отличаются от свойств ферментов автолитической системы этой же бактерии (таблицы 1 и 2). Вероятно, различия в свойствах обусловлены тем, что автолитические ферменты функционируют внутри клетки-продуцента, а функцией внеклеточных ферментов является разрушение клеточной оболочки микроорганизмов-конкурентов снаружи.

Последовательность аминокислот N-концевой части молекулы фермента Л1 оказалась гомологичной последовательности аминокислот α -литической протеазы *Lysobacter enzymogenes*. Аминокислотные последовательности внутренних участков фермента Л1 также гомологичны соответствующим участкам α -литической протеазы (70% гомологии). Полученные данные позволили провести работу по установлению нуклеотидной последовательности гена фермента Л1. Была определена нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК *Lysobacter* sp. XL1 размером около 8 т.п.н., в составе которого идентифицированы две открытые рамки считывания (ОРС). Одна, размером 1197 п.н., кодирует эндопептидазу Л1 (AlpA), вторая ОРС, размером 1200 п.н., кодирует гомологичную (степень гомологии 59%) последовательность. N-концевая последовательность бактериолитической эндопептидазы Л5 полностью совпала с соответствующим участком нуклеотидной последовательности второй ОРС. Таким образом, была установлена также нуклеотидная последовательность гена, кодирующего литическую эндопептидазу Л5 (AlpB) (GenBank acc.# GU 188567). Структура генов *alpA* и *alpB* свидетельствует о том, что белки AlpA и AlpB синтезируются в виде препробелков. Это характерно для ряда бактериальных внеклеточных белков. Гомологии остальных внеклеточных ферментов *Lysobacter* sp. с известными в литературе белками не выявлено.

Гомологичные бактериолитические сериновые протеазы Л1 и Л5 были охарактеризованы по способности лизировать живые и «убитые» клетки различных видов микроорганизмов. Результаты представлены в таблицах 3 и 4, и проиллюстрированы на рисунке 5.

Таблица 3. Литическое действие эндопептидазы Л5 на клетки тест-культур

Микроорганизмы	А	Б
<u>Грамположительные бактерии</u>		
<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	н.о.*	14000
<u>Грамотрицательные бактерии</u>		
<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
<u>Дрожжи</u>		
<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

А - действие на нативные клетки (наносили фермент на газон микроорганизмов);
Б - действие на автоклавированные клетки (тестировали турбидиметрически), Е/мг белка
*) не определяли;
«—» - нет литического эффекта;
«+» - есть литический эффект;
«++» - очень хороший литический эффект.

Из таблицы 3 видно, что литическая 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 под действием фермента Л5. Так, например, живые клетки *B. cereus* 217, *C. xerosis*, *S. aureus* 209P, *R. tritici*, *P. fluorescens* 1472, *E. caratovora* B15, *T. delbrueckii* BKM Y-706, *S. cerevisiae* M660, *P. fusiformata* BKM Y-2821

оказались устойчивыми к действию фермента. Объяснить это можно тем, что полимеры, входящие в состав клеточных стенок живых микроорганизмов, образуют супрамолекулярные структуры, способные защитить клетку от действия литических ферментов.

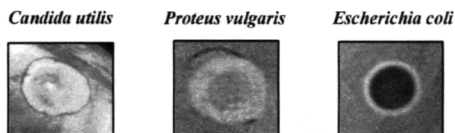


Рисунок 5. Литическое действие фермента Л5 на живые клетки тест-культур. Представлены фрагменты чашек с местом нанесения образца, где образовались зоны лизиса.

Следует особо отметить, что фермент Л5 способен лизировать нативные клетки грамотрицательных бактерий. Из литературы известны единичные примеры таких ферментов (Takahara *et al.*, 1974; Suzuki *et al.*, 1985a,b; Ensing and Wolfe, 1965, 1966).

Гомологичные Л1 и Л5 ферменты имеют разный спектр микроорганизмов, которые они могут лизировать (таблица 4).

Таким образом, внеклеточные литические ферменты *Lysobacter* sp. XL1, отличаясь друг от друга по способности лизировать различные микроорганизмы, при совместном действии лизируют широкий спектр микробов.

Таблица 4. Сравнение действия эндопептидаз Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 на различные живые микроорганизмы

Субстрат	Нативный фермент	
	Л1(AlpA)	Л5(AlpB)
<u>Грамотрицательные бактерии</u>		
<i>Alcaligenes faecalis</i>	—	++
<i>E. coli</i>	—	++
<i>P. putida</i>	—	+
<u>Грамположительные бактерии</u>		
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	—
<i>Micrococcus roseus</i>	—	+
<i>Micrococcus luteus</i>	+	+
<i>Corynebacterium xerosis</i>	—	—
<i>Brevibacterium flavum</i>	—	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	—

Таблица 4. (Продолжение)

Субстрат	Нативный фермент	
	Л1(AlpA)	Л5(AlpB)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	—	—
<i>Candida utilis</i>	+	+
<i>Candida boidinii</i>	+	+
<i>Candida guilliermondii</i>	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	—
<i>Pseudozyma fuziformata</i>	—	—

Внеклеточный полисахарид *Lysobacter* sp. XL1

Lysobacter sp. XL1, кроме белков, секретирует в среду роста большое количество высокомолекулярного кислого полисахарида (ММ 300 kDa). Установлена структура полисахарида. Повторяющаяся единица, образующая структуру полисахарида, состоит из N-ацетилглюкозамина, N-ацетилманурановой и N-ацетилглюкуроновой кислот (рисунок 6).

Большая часть внеклеточных литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1 является щелочными белками, и в условиях своей оптимальной активности заряжены положительно.

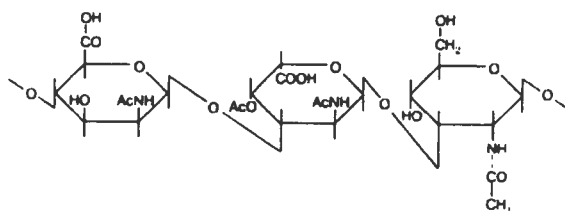


Рисунок 6.
Структурная единица экзополисахарида *Lysobacter* sp. XL1. Слева направо: N-ацетилманурановая кислота, N-ацетилглюкуроновая кислота, N-ацетилглюкозамин.

Очевидно, что положительно заряженные белки в среде взаимодействуют с отрицательно заряженным полисахаридом. Это взаимодействие приводит к стабилизации литических ферментов (рисунок 7).

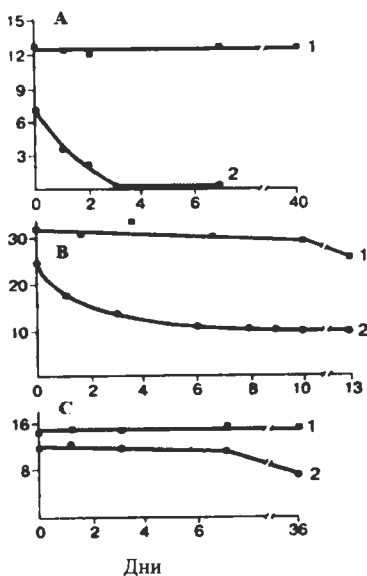


Рисунок 7. Влияние полисахарида на стабильность литических ферментов. А – мурамидаза, В – эндопептидаза Л1, С – амидаза Л2, 1 – с полисахаридом, 2- без полисахарида. На оси ординат представлена литическая активность ферментов по отношению к автоклавированным клеткам золотистого стафилококка (JЕ/мл).

Кроме того, взаимодействие ферментов с полисахаридом изменяет кинетические параметры их активности. Были исследованы реакции расщепления мурамидазой и эндопептидазой Л1 синтетических и природных субстратов без полисахарида и в его присутствии. В качестве синтетических субстратов использовали для мурамидазы 3,4-динитрофенил-тетра-N-ацетил- β -D-хитотетразид, для эндопептидазы – антраноил-аланил-аланил-фенилаланил-пара-нитроанилид. В качестве природного субстрата использовали клетки золотистого стафилококка. В ходе работы было показано, что взаимодействие ферментов с полисахаридом приводит к увеличению максимальной скорости лизиса клеток стафилококка (рисунок 8 А, В) и ингибированию их активности по отношению к низкомолекулярным синтетическим субстратам (рисунок 8 Б, Г).

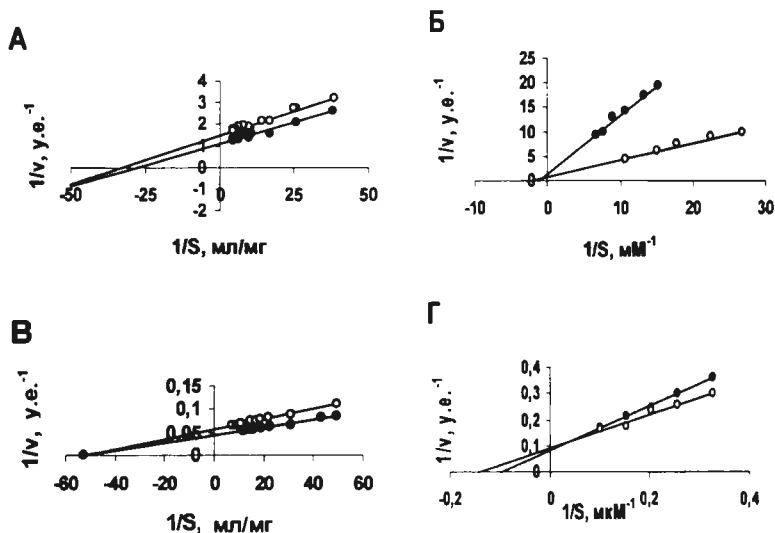


Рисунок 8. Влияние полисахарида на активность ферментов лизоамидазы. А - мурамидаза, субстрат - клетки *S. aureus*; Б - мурамидаза, синтетический субстрат; В - эндопептидаза, субстрат - клетки *S. aureus*; Г - эндопептидаза, синтетический субстрат. ○ – без полисахарида, ● – в присутствии полисахарида.

Следует отметить, что в первом случае в связи с особенностями используемого субстрата активности ферментов и кинетические параметры выражены в условных единицах. Было также исследовано влияние полисахарида *Lysobacter* sp. XL1 на активность некоторых щелочных ферментов, выделенных из других источников и электростатически взаимодействующих с ним. Оказалось, что полисахарид полностью ингибирует активность лизоцима яичного белка и лизостафина *S. staphylophilus*. Ферментный комплекс *Streptomyces albus* и мурамидазу *S. globisporus* полисахарид активировал на 90 и 50% соответственно. Полисахарид не влиял на активность ферментов, которые в условиях своей оптимальной активности с ним не связаны. Полученные данные позволили сделать вывод о том, что электростатическое взаимодействие ферментов с полисахаридом *Lysobacter* sp. XL1 сопровождается изменением параметров катализируемых ферментами реакций – K_m , V_0 . Это изменение может быть как положительным, так и отрицательным и зависит от типов фермента и субстрата. Следовательно, секретируемый *Lysobacter* sp. XL1 во внешнюю среду кислый

полисахарид удерживает, перемещает ферменты продуцента в околоклеточном пространстве и регулирует их активность. Обладая способностью ингибировать некоторые чужеродные бактериолитические ферменты, полисахарид защищает клетку от их воздействия.

Действие лизоамидазы и ее компонентов на различные микроорганизмы

Внеклеточные вещества *Lysobacter* sp. XL1 являются основой препарата лизоамидаза. Исследовалась способность лизоамидазы разрушать вегетативные клетки бактерий, дрожжей, гифы и споры грибов, бактериальные споры. В частности, лизоамидаза оказалась способна разрушать клетки грамположительных бактерий: *S. aureus* (79 штаммов), *Micrococcus lysodeikticus*, *Streptomyces azureus*, *S. chrysomallus*, *Streptococcus mutans* (2 штамма), *Peptostreptococcus intermedius*, *Corynebacterium flavum*, вегетативные клетки, прорастающие и покоящиеся споры *Bacillus subtilis* (4 штамма), *B. cereus*, *B. anthracis* (4 штамма); клетки грамотрицательных бактерий: *Fusobacterium necroforum*, *Prevotella melaninogenica*, в сочетании с полимиксином В *Pseudomonas aeruginosa* (6 штаммов) *Salmonella marcescens*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* (3 штамма), в сочетании с гентамицином или амикацином *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*; дрожжи: *Saccharomyces cerevisia* (3 штамма), *Torulaspora delbrueckii* (2 штамма), *Cryptococcus terreus*, *Phichia fermentes*, *Pseudozyma fuiziformiata*, *Candida boidinii*, *C. azyma*, *C. catenulata*; грибы: *Aspergillus terreus*, *A. japonicus*, простейшие - *Blastocystis homonis*.

Как известно, в состав клеточных стенок грамположительных бактерий наряду с пептидогликаном – основным структурным компонентом, являющимся субстратом бактериолитических ферментов, входят полимеры, придающие клеточной стенке отрицательный заряд. Структура этих полимеров разнообразна (Потехина, 2006). Два основных класса – тейхоевые кислоты (фосфорсодержащие полимеры) и тейхуроновые кислоты (не содержащие фосфор полимеры). Влияют ли компоненты клеточных стенок грамположительных бактерий на гидролиз связей пептидогликана бактериолитическими ферментами? В качестве субстратов отдельных литических ферментов лизоамидазы и полного комплекса были использованы: а) клеточные стенки различных бактерий, содержащих разные пептидогликаны и разные типы тейхоевых и тейхуроновых кислот, б) клеточные стенки, содержащие один тип пептидогликана и разные типы анионных полимеров, в) клеточные стенки *B. subtilis* W-23 (клетки выращены на бесфосфорной среде и вследствие этого содержат в клеточных стенках

тейхуроновые кислоты вместо тейхоевых), подвергнутые периодатному окислению, которое нарушает структуру тейхуроновых кислот, но сохраняет их заряд, и г) чистый пептидогликан клеточных стенок. Литические ферменты с разной скоростью гидролизуют все субстраты, за исключением чистых пептидогликанов. На основании этого был сделан вывод, что для эффективного гидролиза пептидогликанов грамположительных бактерий необходимо электростатическое взаимодействие бактериолитических ферментов лизоамидазы с анионными полимерами клеточной стенки, в частности, с тейхоевыми или тейхуроновыми кислотами, причем для действия ферментов в первую очередь важен отрицательный заряд полимера, а не его структура. На основании этих данных была предложена гипотетическая схема механизма действия внеклеточного фермент-полисахаридного комплекса *Lysobacter* sp. XL1 на грамположительные бактерии-мишени (рисунок 9).

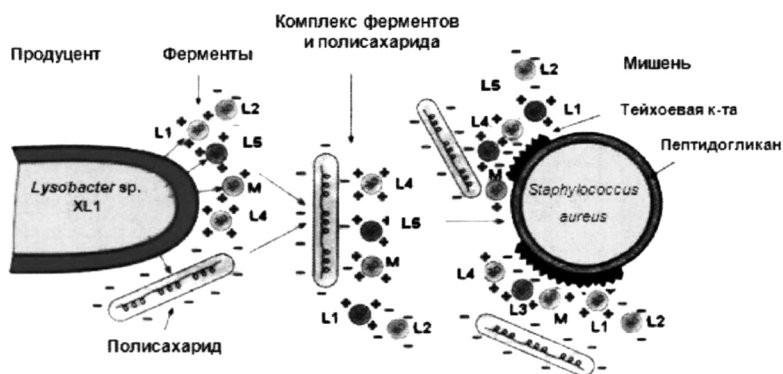


Рисунок 9. Схема действия фермент-полисахаридного комплекса *Lysobacter* sp. XL1 на грамположительные бактерии-мишени.

Как было отмечено, литические ферменты *Lysobacter* sp. XL1 – компоненты препарата лизоамидаза – способны гидролизовать пептидогликан грамотрицательных бактерий, выделенный из клетки, однако нативные клетки грамотрицательных бактерий практически не лизировали (за исключением фермента L15). Оказалось, что липополисахарид, входящий в состав клеточных стенок этих бактерий полностью ингибировал процесс гидролиза пептидогликана бактериолитическими ферментами *Lysobacter* sp. XL1 (таблица 5).

Таблица 5. Действие внеклеточных литических ферментов на компоненты клеточных стенок грамотрицательных бактерий

Субстрат	Активность ферментов, ЛЕ/мл			
	лизоамидаза	Л1	Л2	Л3
Пептидогликан <i>E. coli</i>	25,5	7,9	5,8	1,2
Пептидогликан <i>P. putida</i>	15,2	3,3	1,3	0
Пептидогликан-липополисахаридный комплекс <i>E. coli</i>	0	0	0	0
Пептидогликан-липополисахаридный комплекс <i>P. putida</i>	0	0	0	0
Пептидогликан <i>E. coli</i> + липополисахарид <i>E. coli</i>	0	0	0	0

Лизис нативных клеток грамотрицательных микроорганизмов ферментами становился возможным только после изменения проницаемости внешней мембраны клеток-мишеней обработкой полимиксином В или гентамицином.

Спорообразующие бактерии рода *Bacillus*, в состав которого входят как непатогенные, так и патогенные для человека бактерии, имеют сложный жизненный цикл: вегетативная клетка, предспора, зрелая спора, прорастающая спора. Вследствие особенностей строения внешней оболочки бактериальные эндоспоры практически неуязвимы для внешнего воздействия, что создает ощутимые сложности при разработке эффективных методов борьбы с потенциально-патогенными (*B. cereus*) и патогенными (*B. anthracis*) спорообразующими бактериями. Обработка лизоамидазой зрелых спор *B. subtilis* 168, *B. subtilis* W 23 и *B. cereus* 217 приводила к повреждению их оболочки и утрате способности к прорастанию. На рисунке 10 проиллюстрировано действие лизоамидазы на споры *B. subtilis* W 23. Интересно было выяснить какие именно компоненты лизоамидазы проявляют спороцидные свойства. Оказалось, что только литические ферменты и только в сочетании с полисахаридом *Lysobacter* sp. XL1 проявляют спороцидное действие по отношению к зрелым спорам бактерий рода *Bacillus*. Литические ферменты без полисахарида и полисахарид без литических ферментов были неэффективны по отношению к спорам (рисунок 11).

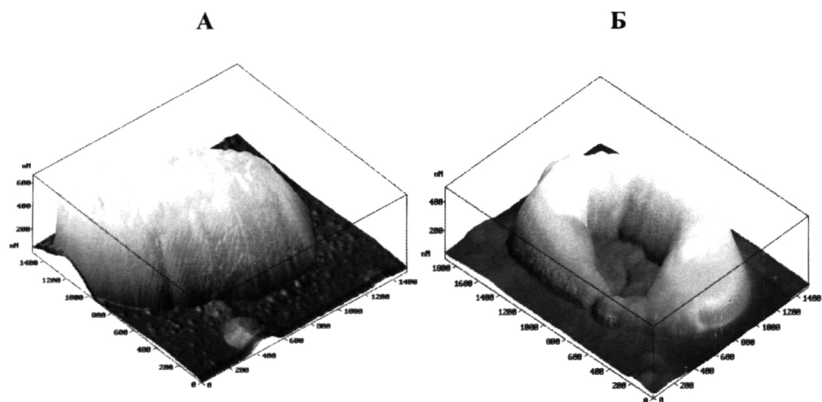


Рисунок 10. Атомно-силовая микроскопия спор *B. subtilis* до (А) и после (Б) действия лизоамидазы.

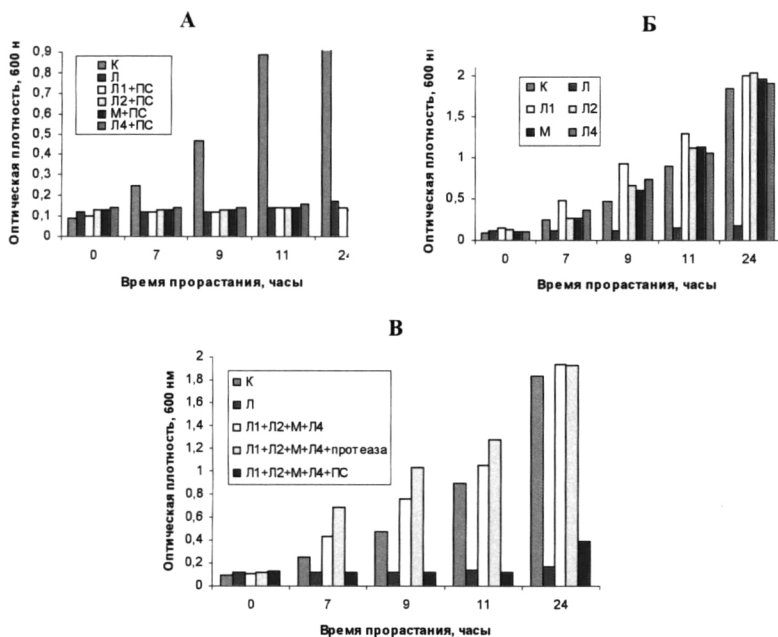


Рисунок 11. Действие ферментов и полисахарида лизоамидазы на споры бацилл. А - фермент плюс полисахарид; Б - ферменты без полисахарида; В - комбинации ферментов с полисахаридом. К - контроль без обработки, Л - после обработки лизоамидазой; М, - мурамидазой; Л1, Л4 - эндопептидазами, Л2 - амидазой, ПС - полисахаридом.

Внешнемембранные везикулы *Lysobacter* sp.

Известно, что грамтрицательные бактерии могут образовывать внешнемембранные везикулы, которые содержат компоненты периплазмы. Например, внешнемембранные везикулы *P. aeruginosa* PAO1 содержат автолитические ферменты (Beveridge, 1999). Образуют ли клетки *Lysobacter* sp. внешнемембранные везикулы? И если да, то могут ли внеклеточные литические ферменты выводиться из клетки при помощи везикул? Было проведено электронномикроскопическое исследование клеток *Lysobacter* sp. XL1 и XL2. Для этого использовали два варианта условий роста культур на агаризованных средах: 1 – среда, способствующая продукции внеклеточных белков, 2 – среда, при выращивании на которой бактерия не продуцирует внеклеточные белки. Из рисунка 12а 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 (рисунок 12в). В межклеточном пространстве *Lysobacter* sp. XL1 и XL2, выращенных на среде 2, наблюдается много мелких везикул диаметром около 20 нм (рисунок 12б, 12г).

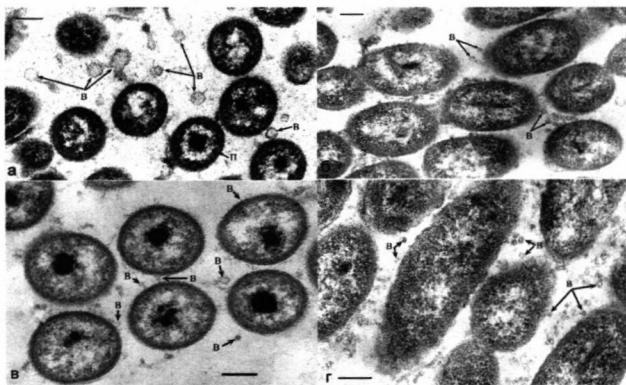


Рисунок 12. Электронная микроскопия ультратонких срезов колоний клеток *Lysobacter* sp. XL1 (а, б) и *Lysobacter* sp. XL2 (в, г). а, в – клетки выращены в условиях, способствующих продукции внеклеточных белков; б, г – клетки выращены в условиях, подавляющих продукцию внеклеточных белков. В – везикулы. Метка соответствует 200 нм.

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

Препараты везикул были получены из культуральной жидкости обоих штаммов *Lysobacter* sp., выращенных на среде, способствующей секреции бактериолитических ферментов. Как правило, везикулы грамотрицательных бактерий образуются в результате выпячивания и отщуривания фрагмента внешней мембраны (Beveridge, 1999). Для подтверждения внешнемембранной природы выделенных везикул *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 определяли в них содержание 2-кето-3-дезоксид-маннооктоната (КДО), который является специфическим компонентом липополисахарида (ЛПС) внешних мембран. Результаты представлены в таблице 6.

Оказалось, 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 клеток, содержание КДО в препаратах указывает 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. XL связан с присутствием в них большего количества белка. Из таблицы 6 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 в препаратах внешних мембран обоих штаммов не отличалась.

Таблица 6. 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

Было также проведено сравнение белкового состава везикул с белковым составом внешних мембран (рисунок 13).

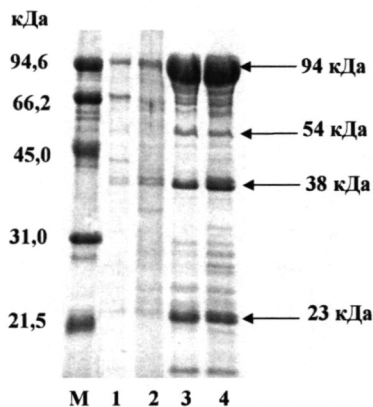


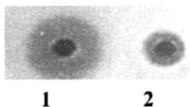
Рисунок 13. Сравнительная характеристика белкового состава везикул и внешних мембран *Lysobacter* sp. М – маркеры, 1 – везикулы *Lysobacter* sp. XL1, 2 – везикулы *Lysobacter* sp. XL2, 3 – белки внешних мембран *Lysobacter* sp. XL1, 4 – белки внешних мембран *Lysobacter* sp. XL2.

При сравнении обнаружили, что внешние мембраны *Lysobacter* sp. XL1 и *Lysobacter* sp. XL2 практически не отличаются по составу мажорных белков (94, 54, 38 и 23 кДа), но имеют незначительные различия по соотношению минорных (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 (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 67 и 41 кДа, а в везикулах *Lysobacter* sp. XL2 белок с ММ 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 на основании обнаруженных ими различий в структуре ЛПС везикул и внешних мембран *P. aeruginosa* PAO1 (Li *et al.*, 1996; Kadurugamuwa, Beveridge, 1996). В препарате везикул *Lysobacter* sp. была обнаружена активность циклической фосфодиэстеразы – маркера на периплазматические белки, но не найдена активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – маркера на цитозольные белки. Таким образом, можно утверждать, что 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 расплавленным в агарозный гель автоклавированными клетками *S. aureus* 209P. Как видно из рисунка 14, 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. Известно, что автолитические системы обоих штаммов *Lysobacter* sp. являются идентичными (Ситкин и др., 2003а, 2003б). 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.

Lysobacter sp. XL1



Lysobacter sp. XL2

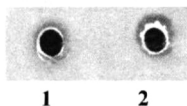


Рисунок 14. Бактериолитический эффект культуральной жидкости и везикул *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 на чашках с расплавленным в агарозный гель автоклавированными клетками *S. aureus* 209P.

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.

Lysobacter sp. XL1 и XL2 секретируют бактериолитические ферменты с разной субстратной специфичностью, что можно было 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, который может попадать в везикулы в процессе их образования (Ситкин и др., 2003а, б). Поэтому 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. В препарате везикул штамма XL2 выявлена активность, характерная для амидазы Л2. Мурамидазная активность в препарате везикул не была обнаружена. Эти результаты позволили сделать 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 мурамидазная активность не выявлена. Следовательно, 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 было установить присутствуют ли эти ферменты в везикулах *Lysobacter* sp. XL1.

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 (рисунок 15а). Однако иммуноферментный анализ с использованием антител к Л5 ферменту (рисунок 15б) показал, что после осаждения из культуральной жидкости везикул, содержание в ней фермента Л5 сильно уменьшается. Вместе с этим, фермент достоверно выявлялся в везикулах. Это указывало на то, что подавляющее количество эндопептидазы Л5 присутствует в культуральной жидкости внутри везикул. Небольшое количество фермента попадает в культуральную жидкость при их разрушении. Иммуноблоттинг с использованием антител к бактериолитическому ферменту Л1 (рисунок 15в) показал, что его содержание в культуральной жидкости после осаждения везикул не изменялось, и в везикулах этот фермент не обнаруживался.

Выше было отмечено, что Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 синтезируются в виде препробелков. Наличие сигнальной последовательности на N-конце (пре-часть синтезированной полипептидной цепи) позволяло 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 обнаружения в клетках *Lysobacter* sp. XL1 SecA белка был проведен иммуноферментный анализ клеточных белков этой бактерии с антителами к SecA

E. coli. Было выявлено наличие в клетках *Lysobacter* sp. XL1 белка, имеющего такую же электрофоретическую подвижность, как и белок SecA *E. coli*. Основываясь на полученных результатах, можно утверждать, что *Lysobacter* sp. XL1 имеет Sec экспортный механизм транслокации белков через цитоплазматическую мембрану в периплазму.

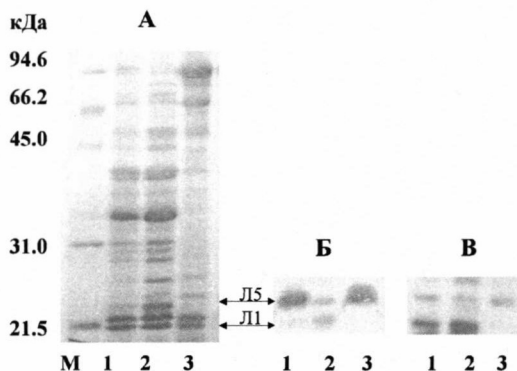


Рисунок 15. Электрофорез и иммуноферментный анализ везикул *Lysobacter* sp. XL1. А – электрофорез белков культуральной жидкости и везикул; Б – иммуноблоттинг с антителами к Л5 бактериолитическому ферменту; В – иммуноблоттинг с антителами к Л1 бактериолитическому ферменту. 1 – культуральная жидкость до 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.

По совокупности полученных данных предложена схема секреции бактериолитических ферментов Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 из цитозоля бактерии в окружающую среду (рисунок 16).

Бактериолитические ферменты Л1 и Л5 синтезируются в виде препробелков и транслицируются через цитоплазматическую мембрану в периплазму, используя, скорее всего, Sec экспортный механизм.

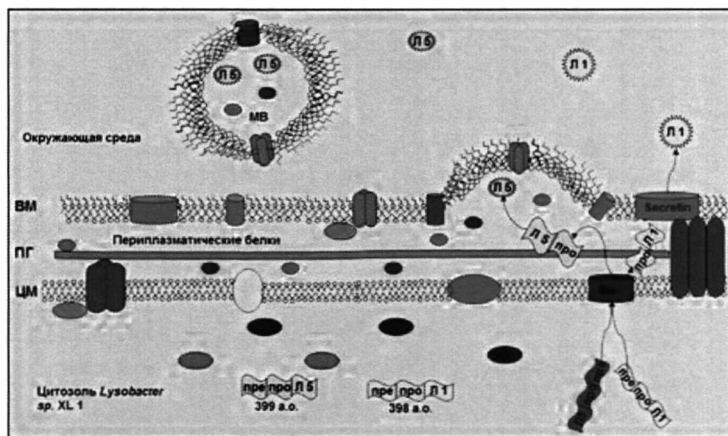


Рисунок 16. Механизм секреции бактериолитических ферментов Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 из цитозоля бактерии в окружающую среду. ВМ – внешняя мембрана; ЦМ – цитоплазматическая мембрана; ПГ – пептидогликан; МВ – мембранные везикулы; препоЛ1 и препоЛ5 – предшественники Л1 и Л5 ферментов.

После отщепления сигнального пептида остается пробелок. Для а-литической протеазы *L. enzymogenes*, которая является гомологом Л1 и Л5 ферментов, показано, что в периплазме происходит сворачивание пробелка в практически нативную конформацию, способствующую транслокации через внешнюю мембрану, предположительно, посредством второго (II) типа секреции через специализированную пору. 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 зрелый Л5 фермент обнаружен в везикулах, можно предположить, что предшественник этого белка уже в периплазме превращается в зрелый фермент и захватывается везикулами в процессе их образования.

Получены новые, ранее не известные данные о том, что внеклеточные бактериолитические ферменты Л2 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 и XL2 попадают в окружающую среду при участии везикул.

Биологическая роль везикулярного способа секреции бактериолитических ферментов

Установлено, что везикулы *Lysobacter* sp. XL1 лизируют живые клетки практически всех выбранных тест-культур (лабораторные штаммы) за исключением *Torulaspora delbrueckii* ВКМ Y-706, *S. cerevisiae* М660 и *Sclerotinium sclerotiorum*. Результаты представлены на рисунке 17 и в таблице 7.

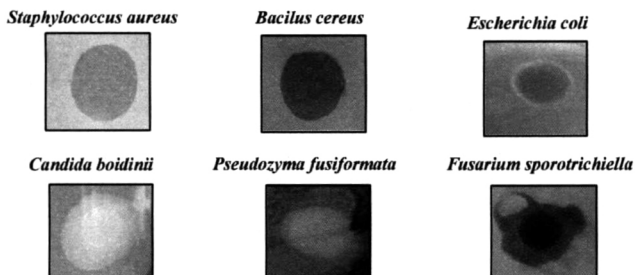


Рисунок 17. Литическое действие везикул *Lysobacter* sp. XL1 на некоторые виды выбранных тест-культур. Прозрачное пятно в центре каждой фотографии – место нанесения везикул, где образовалась зона лизиса.

Кроме того, везикулы эффективно лизировали клинические изоляты множественно устойчивых к антибиотикам грамотрицательных и грамположительных бактерий (*Serratia marcescens* 570, *B. subtilis* var *niger*, *B. cereus* 504, *B. cereus* 164, *B. megaterium* 1433, *B. thuringiensis* 1373, *B. thuringiensis* EG 7566, *B. mesentericus*, *B. brevis* 1409, *B. polymyxa* 1396, *B. anthracis* M71, *B. anthracis* STI, *B. anthracis* STI PR, *B. anthracis* STI pBC16, *B. anthracis* STI 5, *Listeria monocytogenes* L, *L. monocytogenes* R), а также клинические изоляты метициллинустойчивых *S. aureus* (MRSA) - *S. aureus* 54, *S. aureus* 78, *S. aureus* 175, *S. aureus* 227, *S. aureus* 246, *S. aureus* 53, *S. aureus* 136, *S. aureus* 159, *S. aureus* 245, *S. aureus* 261, *S. aureus* 53.

Исходя из полученных данных предложена схема действия везикул на клетки грамположительных и грамотрицательных бактерий (рисунок 18). В случае действия на грамположительные бактерии, в месте прикрепления везикулы к клеточной стенке клетки-мишени нарушается ее целостность, 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 таким образом защищает свое литическое содержимое от внешнего воздействия.

Таблица 7. Литическое действие везикул *Lysobacter* sp. XL1 на живые клетки

Микроорганизмы	Действие везикул
Грамположительные бактерии	
<i>B. subtilis</i> 168	++
<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.

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 субстрату – пептидогликану.

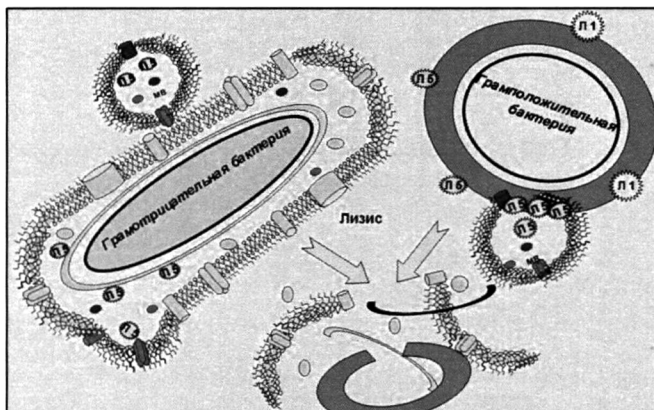


Рисунок 18. Схема действия везикул на клетки грамположительных и грамотрицательных бактерий. Л1, Л5 – литические ферменты; MB – мембранные везикулы.

Действие везикул на грамотрицательные бактерии может происходить 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. Литическое действие везикул на клетки грибов и дрожжей объясняется тем, что литические протеазы Л2 и Л5 разрушают структурные белки, входящие в состав клеточных стенок этих микроорганизмов. Везикулы *Lysobacter* sp. XL1 имеют более широкий спектр литического действия, чем гомогенный фермент Л5 (таблицы 1, 7), а также намного эффективнее лизируют живые клетки различных микроорганизмов. Вклад фермента Л2 в литическое действие везикул *Lysobacter* sp. XL1, по-видимому, незначительный.

Получение рекомбинантных эндопептидаз *Lysobacter* sp. XL1.

Гомологичные сериновые протеазы Л1 (AlpA) и Л5 (AlpB) имеют разную N-концевую последовательность аминокислот, разный способ секреции из клетки продуцента, разный спектр действия на живые клетки микроорганизмов (таблица 4). Следовательно, на основе этих ферментов, используя их отдельно, или комбинируя друг с другом, или с антибиотиками, можно получать лекарственные препараты с нужной специфичностью. Это определяло перспективность работы по получению рекомбинантных эндопептидаз Л1 и Л5.

В качестве бактерии-реципиента на первом этапе была выбрана *E. coli*. В ходе работы выявили, что клетки *E. coli* не способны секретировать образующиеся рекомбинантные литические эндопептидазы, а образование даже небольшого количества зрелого белка приводило к гибели клеток вследствие лизиса.

Поэтому был разработан способ получения зрелых эндопептидаз рефолдингом из телец включения. Поскольку этот метод оказался весьма трудозатратным, в дальнейшем в качестве бактерии-реципиента выбрали почвенные псевдомонады, близкие по ряду свойств *Lysobacter*. Ни один из потенциальных штаммов-реципиентов не секретировал во внешнюю среду бактериолитические ферменты. Чувствительность или устойчивость к различным антибиотикам явились критерием выбора для дальнейшей работы *P. fluorescens* Q2-87. Была сконструирована система экспрессии: ген литической протеазы Л1 или Л5 под контролем промотора T7lac и ген белка репрессора лактозного оперона были встроены в хромосому штамма-хозяина. Источником T7 РНК-полимеразы служит плаزمид, в которой ген этого фермента находится под контролем *lac*-промотора. На твердой индикаторной среде с вплавленными клетками стафилококка было показано, что рекомбинантные штаммы псевдомонад экспрессируют гены *alpA* и *alpB*. Это проявлялось в образовании зон лизиса вокруг выросших клеток *Pseudomonas*. При выращивании рекомбинантных штаммов на жидких средах разного состава в культуральных жидкостях при помощи антител было выявлено присутствие искоемых белков. Максимальное количество накапливалось к 48 часам на средах LB и среде, специально разработанной для выращивания *Lysobacter* sp. XL1. Последняя была выбрана для выращивания рекомбинантных штаммов в условиях ферментации, так как адаптирована для этого. На рисунке 19 показано, что *P. fluorescens* Q2-87 с геном *alpB* к 18 часам роста имеет максимальную плотность культуры и литическую

активность культуральной жидкости, которые при дальнейшем культивировании мало изменяются.

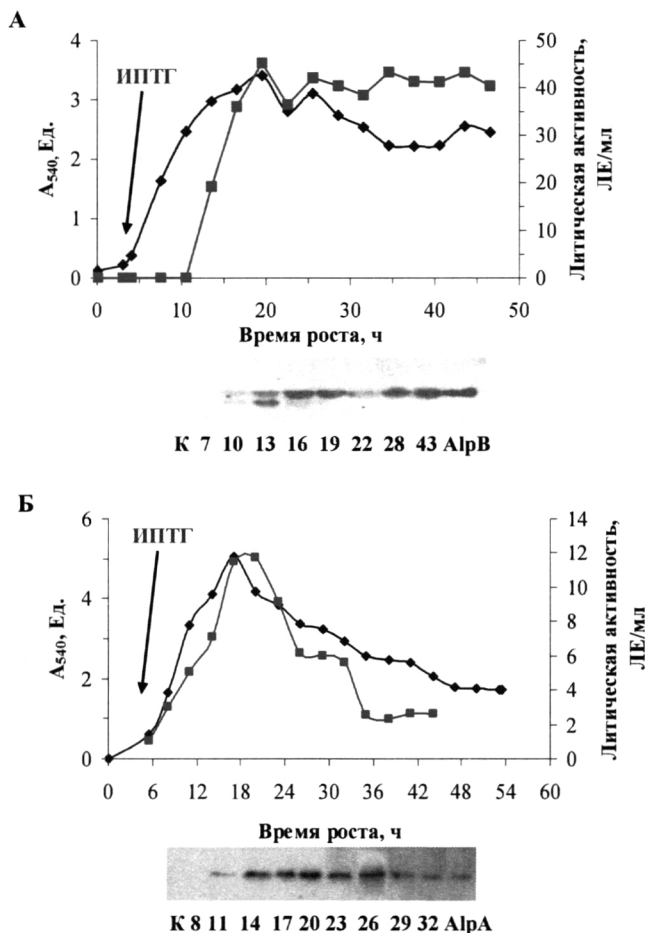


Рисунок 19. Динамика экспрессии рекомбинантных AlrA и AlrB в условиях культивирования рекомбинантных штаммов *P. fluorescens* Q2-87 в ферментере. А – экспрессия AlrB (динамика роста, активности и иммуноблоттинг), Б – экспрессия AlrA (динамика роста, активности и иммуноблоттинг), ♦ - рост культуры, ■ – активность, К – культуральная жидкость *P. fluorescens* Q2-87, не содержащего генов литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1, AlrA и AlrB – нативные ферменты, нанесенные на гель в качестве маркеров.

Это подтвердили данные иммуноблоттинга. Другую картину наблюдали при культивировании *P. fluorescens* Q2-87 с геном *alpA*. Также к 18 часам оптическая плотность и активность достигали максимума, затем культура лизировалась и активность уменьшалась. Это сопровождалось уменьшением содержания белка AlpA в культуральной жидкости, что, возможно, связано с протеолизом или автолизом. Рекомбинантные белки AlpA (Л1) и AlpB (Л5) были очищены в I стадию ионообменной хроматографией (monoS). Выход белков составил около 1 мг/л культуры, что достаточно хорошо для таких потенциально смертельных для микробной клетки ферментов. Свойства рекомбинантных белков оказались аналогичны свойствам нативных. Таким образом, разработана система получения рекомбинантных литических эндопептидаз *Lysobacter* sp. XL1, которые могут явиться основой новых антимикробных препаратов.

Лечение модельной сибирской язвы внесклеточными продуктами

Lysobacter sp. XL1.

На основании вышеизложенных материалов можно было предположить, что лизоамидаза, гомогенные литические ферменты (нативные и рекомбинантные), везикулы могут быть использованы для лечения сибиреязвенной инфекции как препараты, вводимые внутрь организма. Для лечения и профилактики модельной сибиреязвенной инфекции были использованы препарат лизоамидазы, нативные и рекомбинантные ферменты Л1 (AlpA) и Л5 (AlpB), внешнемембранные везикулы, содержащие литический фермент AlpB и литическую протеазу Л2. Работа проводилась в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ, г. Оболенск).

Были получены следующие результаты:

- лизоамидаза оказывала лечебный эффект по отношению к экспериментальной генерализованной сибиреязвенной инфекции, вызванной у беспородных белых мышей введением спор *B. anthracis* 71/12 (II вакцины Ценковского) – 100% выживаемость зараженных животных при подкожном введении лизоамидазы в концентрации 1 мг/мышь. В контрольной группе животных выживаемость – 0%;
- при лечении лизоамидазой легочной формы сибирской язвы, вызванной спорами *B. anthracis* 71/12, лечебный эффект отмечали при подкожном введении препарата (выживаемость – 60%);

- лечение лизоамидазой мышей, зараженных спорами *B. anthracis* 71/12 внутривенно, приводило к 90% и 100% выживаемости животных в случае введения препарата внутривенно и подкожно соответственно.

- лизоамидаза оказывала лечебный эффект (90% выживаемости) по отношению к сибиреязвенной инфекции, вызванной вегетативными клетками *B. anthracis* СТИ-1;

- применение лизоамидазы для лечения мышей, зараженных штаммом *B. anthracis* СТИ-ПРТС (устойчивый к рифампицину, ампициллину, тетрациклину, доксициклину) демонстрировало 100%-ную выживаемость животных при заражающей дозе 10^5 и 10^6 спор;

- применение лизоамидазы для лечения золотистых хомяков, зараженных вирулентным штаммом *B. anthracis* Ч-7 в дозе 100 ЛД₅₀, приводило к 100% -ной выживаемости в случае введения препарата (5мг/хомяка) в ту же лапу, в которую проводили заражение, и к 60%-ной выживаемости, если препарат вводили в другую конечность;

- показано, что рекомбинантный и нативный литический фермент AlpA оказывает лечебное действие лишь на 20-40% опытных животных, зараженных спорами или вегетативными клетками *B. anthracis* 71/12 (II вакцина Ценковского);

- рекомбинантный и нативный литический фермент AlpB не обладает лечебным эффектом, профилактическую защиту в 80% случаев оказывает препарат AlpB, введенный мышам за 72 часа до заражения, в концентрации 5 мг на мышь, более низкие концентрации препарата не обладают профилактическим действием;

- везикулы успешно лечат генерализованную инфекцию у мышей (100%-ная выживаемость), вызванную спорами *B. anthracis* 71/12 и антибиотикорезистентного штамма – *B. anthracis* СТИ-Тс при однократном введении, а доксициклин даже при 5-дневном применении оказался не эффективным: после его отмены начиналась гибель животных с 7 по 10 день.

Таким образом, отдельные литические ферменты лизоамидазы AlpA и AlpB, находящиеся в растворимом состоянии, демонстрируют низкое лечебное и профилактическое действие в отношении модельной сибиреязвенной инфекции, в отличие от препарата лизоамидаза и везикул, в которые «упакован» фермент AlpB, оказывающих 100%-ную защиту опытных животных в случае лечения и профилактики сибиреязвенной болезни.

ВЫВОДЫ

1. Бактерия-продуцент препарата лизоамидаза, штамм XL1, отнесена к роду *Lysobacter*, семейства *Xanthomonadaceae*. При длительном выращивании литически высокоактивного штамма *Lysobacter* sp. XL1 на средах, способствующих секреции внеклеточных продуктов, в популяции возникают и накапливаются за счет более высокой скорости роста клетки литически низкоактивного штамма *Lysobacter* sp. XL2. Оба штамма *Lysobacter* sp. при любых условиях роста образуют внешнемембранные везикулы.

2. Впервые показано, что внутриклеточная и внеклеточная литические системы бактерии *Lysobacter* sp. (XL1, XL2) функционируют независимо. Свойства литических ферментов – компонентов этих систем – значительно отличаются друг от друга: внутриклеточные ферменты являются кислыми белками, активными при 29°C, высоком значении ионной силы среды и щелочном значении pH; внеклеточные ферменты – щелочные белки, активные при низких значениях ионной силы, щелочном pH и высоких температурах (50°-80°C). В составе внеклеточной литической системы *Lysobacter* sp. XL1 обнаружено пять ферментов: мурамидаза, амидаза, три эндопептидазы, в составе литической системы *Lysobacter* sp. XL2 – амидаза и мурамидаза. В составе внутриклеточной литической системы *Lysobacter* sp. выявлено девять пептидогликангидролаз разной субстратной специфичности и локализации в клетках бактерий.

3. Впервые обнаружено, что постсекреторное электростатическое взаимодействие высокомолекулярного кислого полисахарида и ферментов *Lysobacter* sp. XL1 приводит к значительной стабилизации ферментов и в ряде случаев к изменению их активности. В частности полисахарид усиливает действие мурамидазы на клетки золотистого стафилококка, а литические ферменты, связанные с полисахаридом, становятся способными разрушать покоящиеся споры бактерий рода *Bacillus*. Полисахарид *Lysobacter* sp. XL1 полностью ингибирует активность ряда литических ферментов других микроорганизмов.

4. Впервые показано, что бактерия *Lysobacter* sp. транспортирует литические ферменты, разрушающие клетки микробов-конкурентов, в окружающее клетку пространство внутри внешнемембранных везикул. Везикулы, содержащие такие ферменты, способны лизировать живые клетки представителей различных групп микроорганизмов, например, грамотрицательных бактерий родов *Pseudomonas*, *Proteus*, *Erwinia*, *Alcaligenes*, грамположительных бактерий,

относящихся к родам *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Rothayibacter*, дрожжей рода *Candida*, мицелиального гриба *Sclerotinia sclerotiorum* в отличие от литических ферментов, находящихся вне везикул. Следовательно, такой способ секреции литических ферментов имеет для продуцента важное биологическое значение, расширяя спектр микроорганизмов, с которыми он может конкурировать в природе.

5. Установлены особенности взаимодействия литических ферментов *Lysobacter* sp. с нативными клетками-мишенями. Для эффективного гидролиза клеток грамположительных бактерий ферментам необходим предварительный контакт с отрицательно заряженным полимером клеточной стенки (тейхоевыми или тейхуроновыми кислотами), химическая структура этих полимеров не имеет решающего значения. Липополисахарид клеточной стенки грамотрицательных бактерий ингибирует активность литических ферментов. Нативные клетки грамотрицательных бактерий ферменты Л1-Л4 разрушают только при условии предварительной дестабилизации внешней мембраны клетки тем или иным способом (температура, полимиксин В, гентамицин, амикацин). Эндопептидаза Л5 способна лизировать нативные клетки ряда грамотрицательных бактерий без предварительной обработки внешней мембраны.

6. Установлена структура генов двух литических эндопептидаз *Lysobacter* sp. XL1 – Л1 (AlpA) и Л5 (AlpB); показано, что белки синтезируются как препроферменты, пре- части состоят из 33 и 28 а.о., про- части – из 166 а.о., зрелые ферменты – из 199 и 205 а.о. соответственно. Получены и охарактеризованы рекомбинантные AlpA и AlpB.

7. Показана возможность использования лизоамидазы и внешнемембранных везикул *Lysobacter* sp. XL1 для лечения и профилактики сибиреязвенной инфекции.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Обзор

Степная О.А., Ледова Л.А., Кулаев И.С. Бактериолитические ферменты. Успехи биологической химии, 1999, с. 327-354.

Экспериментальные статьи

1. Степная О.А., Северин А.И., Кулаев И.С. Некоторые физико-химические свойства литической протеазы Л2 ферментного препарата лизоамидаза, выделенного из бактерии семейства *Pseudomonadaceae*. Биохимия, 1986, том 51, вып. 6, с. 909-915.
2. Степная О.А., Северин А.И., Круглая О.В., Кулаев И.С. Ответственные за бактериолитическую активность компоненты препарата лизоамидаза, выделенного из бактерии семейства *Pseudomonadaceae*. Биохимия, 1989, том 54, вып. 2, с. 201-205.
3. Степная О.А., Кудрявцева А.И., Северин А.И., Крупяно В.И., Козловский А.Г., Кулаев И.С. Ферменты бактериолитического препарата лизоамидаза. Некоторые свойства бактериолитической протеиназы Л2. Прикладная биохимия и микробиология, 1992, том 28, вып. 5, с. 666-673.
4. Степная О.А., Ледова Л.А., Кулаев И.С. Бактериолитический комплекс лизоамидаза. Определение природы взаимодействия ферментов и полисахарида, входящих в состав комплекса. Биохимия, 1993, том 58, вып. 10, с. 1523-1528.
5. Чумак Н.Е., Степная О.А., Черменская Т.С., Несмеянова М.А., Кулаев И.С. Особенности секреции бактериолитических ферментов и полисахарида у бактерии семейства *Pseudomonadaceae*. Микробиология, 1995, том 64, вып. 1, с. 55-62.
6. Лихошерстов Л.М., Сенченкова С.Н., Книрель Ю.А., Шашков А.С., Шibaев В.Н., Степная О.А., Кулаев И.С. Структура кислого полисахарида, входящего в состав бактериолитического комплекса лизоамидаза. Биохимия, 1995, том 60, вып. 3, с. 617-624.
7. Likhosherstov L.M., Senchenkova S.N., Knirel Yu.A., Shashkov A.S., Shibaev V.N., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. Structure of an acidic polysaccharide present in the bacteriolytic complex lysoamidase. FEBS Letters, 1995, v. 368, 113-116.
8. Кулаев И.С., Наумова И.Б., Стрешинская Г.М., Тульская Е.М., Степная О.А.,

- Северин А.И., Бегунова Е.А. Литическое действие лизоамидазы из *Xanthomonas* sp. коррелирует с присутствием в клеточной стенке грамположительных бактерий-мишеней рибиттейхоевых кислот. Микробиология, 1996, том 65, № 3, с. 326-332.
9. Степная О.А., Цфасман И.М., Ледова Л.А., Петрикевич С.Б., Бегунова Е.А., Кулаев И.С. Сравнение состава комплекса бактериолитических ферментов бактерии *Xanthomonas* sp. - продуцента бактериолитического ферментного препарата лизоамидаза и ее малоактивной формы. Микробиология, 1996, том 65, № 3, с. 339-344.
10. Степная О.А., Бегунова Е.А., Цфасман И.М., Кулаев И.С. Бактериолитический ферментный препарат лизоамидаза: выделение и некоторые физико-химические свойства внеклеточной мурамидазы бактерии *Xanthomonas* sp. Биохимия, 1996, том 61, вып. 4, с. 648-655.
11. Степная О.А., Бегунова Е.А., Цфасман И.М., Кулаев И.С. Бактериолитический ферментный препарат лизоамидаза: очистка и некоторые свойства бактериолитической пептидазы Л1. Биохимия, 1996, том 61, вып. 4, с. 656-663.
12. Цфасман И.М., Степная О.А., Бажанова Н.В., Кулаев И.С. Внутриклеточная глюкозаминидаза бактерии *Xanthomonas campestris* ИБФМ В-124: очистка и некоторые свойства. Биохимия, 2000, том 65, вып. 9, с. 57-62.
13. Степная О.А., Рязанова Л.П., Крупянко В.И., Кулаев И.С. Влияние кислого экзополисахарида *Xanthomonas campestris* ИБФМ В-124 на кинетические параметры внеклеточных бактериолитических ферментов. Биохимия, 2001, том 66, вып. 6, с. 816-821.
14. Ситкин Б.В., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С. Внутриклеточные пептидогликангидролазы бактерии *Xanthomonas campestris* XL1. Биохимия, 2003, том 68, вып. 4, с. 562-569.
15. Ситкин Б.В., Лысанская В.Я., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С. Структура пептидогликана бактерии *Lysobacter* sp. - продуцента внеклеточных бактериолитических ферментов. Микробиология, 2003, том 72, № 1, с. 136-137.
16. Бегунова Е.А., Степная О.А., Лысанская В.Я., Кулаев И.С. Специфичность действия ферментов препарата лизоамидазы на клеточные стенки *Staphylococcus aureus* 209 Р. Биохимия, 2003, том 68, вып. 7, с. 896-901.
17. Ситкин Б.В., Цфасман И.М., Степная О.А., член-корреспондент РАН Кулаев

- И.С. Могут ли автолизины бактерий являться предшественниками внеклеточных бактериолитических ферментов? Доклады Академии наук, 2003, том 392, № 3, с. 406-409.
18. Муранова Т.А., Красовская Л. А., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С. Структурные исследования и идентификация внеклеточной бактериолитической эндопептидазы Л1 *Lysobacter* sp. XL 1. Биохимия, 2004, том 69, вып. 5, с. 617-622.
19. Степная О. А., Бегунова Е. А., Цфасман И. М., Тульская Е. М., Стрешинская Г. М., Наумова И.Б., Кулаев И.С. Роль анионных полимеров клеточных стенок грамположительных бактерий-мишеней в механизме действия на них внеклеточных бактериолитических ферментов *Lysobacter* sp. Микробиология, 2004, том 73, № 4, с. 479-485.
20. Бегунова Е.А., Степная О.А., Цфасман И.М., Кулаев И.С. Действие внеклеточных бактериолитических ферментов *Lysobacter* sp. на грамотрицательные бактерии. Микробиология, 2004, том 73, № 3, с. 320-325.
21. Степная О.А., Цфасман И.М., Логвина И.А., Рязанова Л.П., Муранова Т.А., Кулаев И.С. Выделение и характеристика новой внеклеточной бактериолитической эндопептидазы *Lysobacter* sp. XL1. Биохимия, 2005, том 70, вып. 9, стр. 1250-1257.
22. Рязанова Л.П., Ледова Л.А., Цурикова Н.В., Степная О.А., Силин А.П., Кулаев И.С. Воздействие протеолитических ферментов *Bacillus licheniformis* и лизоамидазы *Lysobacter* sp. XL1 на клетки *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*. Прикладная биохимия и микробиология, 2005, том 41, № 5, стр. 558-563.
23. Ryazanova L.P., Stepnaya O.A., Suzina N.E., Kulaev I.S. Effect of lysoamidase preparation on yeast and mycelial fungi. Process Biochemistry, 2005, v. 40, № 2, p. 557-564.
24. Бегунова Е. А., Чайка И.А., Степная О.А., Сафиева Д.О., Будашов И.А., Курочкин И.Н., Варфоломеев С.Д., Кулаев И.С. Изучение действия лизоамидазы на споровую форму бактерий рода *Bacillus*. Доклады Академии наук, 2006, том 408, № 4, с. 550-552.
25. Цфасман И.М., Ситкин Б.В., Лысанская В.Я., Степная О.А., Кулаев И.С. Субстратная специфичность и некоторые физико-химические свойства автолитических ферментов бактерии *Lysobacter* sp. XL1. Биохимия, 2007, том 72, вып. 7, с. 760-765.
26. Степная О.А., Цфасман И.М., Чайка И.А., Муранова Т.А., Кулаев И.С.,

- Внеклеточный дрожжелитический фермент бактерии *Lysobacter* sp.XL1. Биохимия, 2008, том 73, вып. 3, с. 381-387.
27. Vasilyeva N.V., Tsfasman I.M., Suzina N.E., Stepnaya O.A. and I. S. Kulaev Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles. FEBS Journal, 2008, v. 275, p. 3827-3835.
28. Зырина Н.В., Ильясов П.В., Кувичкина Т.Н., Степная О.А., Решетилов А.Н. Оценка эффективности литического действия пептидогликангидролаз на основе дыхательной активности клеток тест-культуры. Вестник биотехнологии, 2008, том 46, № 2, с. 5-11.
29. Васильева Н.В., Цфасман И.М., Сузина Н.Е., Степная О.А., Кулаев И.С. Внешнемембранные везикулы *Lysobacter* sp. Доклады Академии наук, 2009, том 426, № 2, с. 257-260.
30. Mikouliniskaia G.V., Odinkova I.V., Zimin A.A., Lysanskaya V.Ya., Feofanov S.A., Stepnaya O.A. Identification and characterization of the metal ion-dependent L-alanoyl-D-glutamate peptidase encoded by bacteriophage T5. FEBS Journal, 2009, v. 276, N 24, p. 7329-7342.
31. Красовская Л.А., Руденко Н.В., Аббасова С. Г., Шувалова О.П., Видягина Е.О., Сухаричева Н.А., Ледова Л.А., Степная О.А., Кулаев И.С. Моноклональные антитела к пропептиду эндопептидазы AlpB *Lysobacter* sp. XL1 для изучения AlpB-белковых взаимодействий в клетках бактерии. Доклады Академии наук, 2011, №6, т.441, №, с.841-844.

Патенты

1. Патент РФ № 2139348, 1999, Степная О.А., Ледова Л.А., Кулаев И.С., Прудникова О.В. Средство для лизиса клеток грамположительных и грамотрицательных бактерий.
2. Патент РФ № 2193063, 2002, Кулаев И.С., Степная О.А., Цфасман И.М., Черменская Т.С., Акименко В.К., Ледова Л.А., Зубрицкая Л.Г. Бактериолитический комплекс, способ его получения и штамм для осуществления способа.
3. Патент США № 7,150,985 B2, 2006, Kulaev I.S., Stepnaya O.A., Tsfasman I.M., Chermenskaya T.S., Akimenko V.K., Ledova L.A., Zubritskaya L.G. Bacteriolytic complex, method for producing said complex and strain for carrying out said method.
4. Патент Китая № 274608, 2006, Kulaev I.S., Stepnaya O.A., Tsfasman I.M.,

Chermenskaya T.S., Akimenko V.K., Ledova L.A., Zubritskaya L.G. Bacteriolytic complex, method for producing said complex and strain for carrying out said method.

5. Патент РФ № 2296576, 2007, Кулаев И.С., Степная О.А., Бегунова Е.А., Цфасман И.М., Логвина И.А., Маринин Л.И., Старицын Н.А., Шишкова Н.А. Средство, обладающее бактерицидным действием в отношении вегетативных и споровых клеток *Bacillus anthracis*, способ профилактики и лечения сибирской язвы.
6. Заявка PCT WO 2006/123962 A2 Schischova N.A., Starizin N.A., Marinin L.I., Stepnaya O.A., Kulaev I.S., Tsfasman I.M., Begunova E.A., Chaika I.A. Agent exhibiting bactericidal action with respect to vegetative and spore cells *Bacillus anthracis*, anthrax preventing and treating method.
7. Патент РФ № 2407782, 2010, Грановский И. Э., Калинин А.Е., Лаптева Ю.С., Латыпов О.Р., Васильева Н.В., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С., Муранова Т.А., 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.
8. Патент РФ № 2408725, 2011, Грановский И. Э., Калинин А.Е., Лаптева Ю.С., Латыпов О.Р., Васильева Н.В., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С., Муранова Т.А., 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.
9. Европейский патент № 1902719 B1, 2011, Schischova N.A., Starizin N.A., Marinin L.I., Stepnaya O.A., Kulaev I.S., Tsfasman I.M., Begunova E.A., Chaika I.A. Agent exhibiting bactericidal action with respect to vegetative and spore cells *Bacillus anthracis*, anthrax preventing and treating method.

Тезисы докладов

1. Северин А.И., Абрамочкин Г.В., Степная О.А., Кулаев И.С. Характеристика лизоамидазы – нового бактериолитического комплекса, перспективного терапевтического средства для лечения ран и ожогов. Тезисы докладов четвертой Всесоюзной конференции «Биосинтез ферментов микроорганизмами», Ташкент, 1988, с. 17.

2. Severin A.I., Abramochkin G.V., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. Characteristic of lysoamidase – a new bacteriolytic complex, perspective therapeutic remedy for treating wounds and burns. 14 International Congress of Biochemistry, Prague, CSSR, Abstract, 1988, p.59.
3. Степная О.А., Кулаев И.С. Характеристика ферментов литического препарата лизоамидаза. Тезисы Всесоюзной конференции «Регуляция микробного метаболизма», Пушкино, 1989, с. 41.
4. Северин А.И., Степная О.А., Кулаев И.С. Ферменты бактериолитического препарата лизоамидаза: выделение и характеристика. Пятая международная конференция по химии и биотехнологии активных природных соединений, Варна, Болгария, 1989, Тезисы докладов, с. 51.
5. Severin A.I., Abramochkin G.V., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. Lysoamidase – a new polyenzymatic staphylolytic bacteriolytic therapeutic remedy. 1 International symposium «Molecular organization of biological structures», Moscow, 1989, Abstract book, p. 19-24.
6. Северин А.И., Абрамочкин Г.В., Степная О.А., Кулаев И.С., Кругляк В.И., Валиахметов А.Я., Кудрявцева А.И., Ильченко В.Я., Плотникова З.С., Зякун А.М., Козловский А.Г. Бактериолитический препарат лизоамидаза. Физиологические, биохимические и клинические аспекты. Сборник научных трудов, Пушкино, 1989, с. 80-99.
7. Stepnaya O.A., Kudriavtseva A.I., Krupyanko V.I., Kozlovsky A.G., Kulaev I.S. Some properties of bacteriolytic proteinase L2 of the polyenzyme bacteriolytic preparation lysoamidase obtained from the *Pseudomonas* culture liquid. 5th European Congress on Biotechnology, Copenhagen, 1990, Abstract book, p. 272.
8. Severin A.I., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. Lysoamidase: a novel antibacterial drug. International conference on antimicrobial activity of nonantibiotics, Copenhagen, 1990. Abstract book, p. 33.
9. Kulaev I.S., Krupyanko V.I., Severin A.I., Stepnaya O.A., Kozlovsky A.G. Neutral phosphatase from a bacterium of the family *Pseudomonadaceae*: isolation and properties. Abstracts of European congress on biotechnology, Copenhagen, 1990, p. 273.
10. Лихошерстов Л.М., Сенченкова С.Н., Книрель Ю.А., Шашков А.С., Шибанов В.Н., Степная О.А., Кулаев И.С. Структура кислого полисахарида, входящего в состав бактериолитического комплекса лизоамидаза. Тезисы докладов конференции «Биосинтез и деградация микробных полимеров.

- Фундаментальные и прикладные аспекты». Пушино, 1995, с. 34.
11. Степная О.А., Ледова Л.А., Бегунова Е.А., Цфасман И.М., Кулаев И.С. Бактериолитические ферменты бактерии рода *Xanthomonas*. Конференция «Биосинтез и деградация микробных полимеров. Фундаментальные и прикладные аспекты». Тезисы докладов, Пушино, 1995, с. 50.
 12. Likhoshesterov L.M., Senchenkova S.N., Knirel Y.A., Shashkov A.S., Shibaev V.N., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. The structure of an exopolysaccharide from a lysoamidase bacteriolytic complex. International Conference «Microbial polysaccharide», Canada, 1995, Abstract book, p. 48.
 13. Likhoshesterov L.M., Senchenkova S.N., Knirel Y.A., Shashkov A.S., Shibaev V.N., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. The structure of an exopolysaccharide from a lysoamidase bacteriolytic complex. First International Conference «Polysaccharide Engineering», 1995, Trondheim, Abstract book, p.65.
 14. Кулаев И.С., Ежов В.А., Степная О.А., Ледова Л.А., Ляшедько П.П., Блатун Л.А., Галицкий А.П., Карповский А.И., Толстых П.И. Лизоамидаза - новый ферментный антибактериальный препарат. Конференция хирургов, Калуга, 1996, Тезисы докладов, с. 30.
 15. Степная О.А., Северин А.И., Цфасман И.М., Бегунова И.М., Штерандова А.И., Крупяно В.И., Кулаев И.С. Протеиназы медицинского препарата «лизоамидаза». IV Симпозиум «Химия протеолитических ферментов», Москва, 1997, Тезисы докладов и стендовых сообщений, с. 54.
 16. Степная О.А., Бегунова Е.А., Цфасман И.М., Ледова Л.А., Рязанова Л.П., Стрешинская Г.М., Тульская Е.М., Наумова И.Б., Кулаев И.С. Механизм действия бактериолитических ферментов лизоамидазы на грамположительные и грамотрицательные клетки-мишени. Второй съезд биохимического общества РАН, Москва, 1997, Тезисы докладов, ч. I, с. 236-237.
 17. Скрыбин Г.К., Кулаев И.С., Северин А.И., Ежов В.А., Козловский А.Г., Степная О.А., Ледова Л.А., Шульга А.В. Лизоамидаза - комплексный ферментный препарат для медицинских целей. Семинар-презентация инновационных научно-технических проектов «Биотехнологии Подмосковья-97», Пушино, 1997, Тезисы докладов, с. 12.
 18. Кулаев И.С., Ежов В.А., Степная О.А., Козловский А.Г., Ледова Л.А. Новое эффективное средство для лечения инфекционных заболеваний. «Биотехнологии Подмосковья», 1998, Сборник тезисов, с. 21.
 19. Кулаев И.С., Степная О.А., Ежов В.А., Ледова Л.А., Цфасман И.М., Рязанова

- Л.П., Козловский А.Г., Шульга А.В. Лизоамидаза - новый ферментный антибактериальный препарат. Международный семинар-презентация инновационных научно-технических проектов. Пущино, 1999, Сборник тезисов, с. 30.
20. Stepnaya O.A., Karpov A.V., Sidorov I.A., Ryazanova L.P., Krupyanko V.I., Likhoshesterov L.M., Shibaev V.N., Kulaev I.S. Interaction of *Xanthomonas campestris* XL1 acidic polysaccharide with exoenzymes: role of O-acetyl groups of polysaccharide in muramidase presentation. International symposium «Modern problems of microbial biochemistry and biotechnology», Pushchino, 2000, Abstracts book, p. 78-79.
 21. Stepnaya O.A., Tsfasman I.M., Ledova L.A., Ryazanova L.P., Sitkin B.V., Kulaev I.S. Bacteriolytic enzymes of *Xanthomonas campestris* XL1. International symposium «Modern problems of microbial biochemistry and biotechnology», Pushchino, 2000, Abstracts book, p. 80-81.
 22. Ситкин Б.В., Цфасман И.М., Степная О.А. Внутриклеточные пептидогликангидролазы бактерии *Xanthomonas campestris* XL1. 5-я Пушкинская конференция молодых ученых «Биология-наука XXI века», Пущино, 2001, Тезисы докладов, с. 51-51.
 23. Ситкин Б.В., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С. Внутриклеточные бактериолизитические ферменты *Xanthomonas campestris* XL1 – продуцента антибактериального препарата лизоамидаза. Международная конференция «Биотехнология на рубеже двух тысячелетий», Саранск, 2001, Тезисы докладов, с.199-201.
 24. Ситкин Б.В., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С. Внутриклеточные пептидогликангидролазы бактерии *Xanthomonas campestris* XL1. 3-й Съезд биохимического общества. Санкт-Петербург. 2002, Тезисы докладов с. 106-107.
 25. Степная О.А., Цфасман И.М., Ледова Л.А., Рязанова Л.П., Кулаев И.С. Ферментный антибактериальный препарат «Лизоамидаза». Российско-Южно-Корейский семинар-презентация инновационных научно-технических проектов в области биотехнологии, Пущино, 12-13 сентября 2002 г., Тезисы докладов, с. 5.
 26. Степная О.А., Цфасман И.М., Ледова Л.А., Рязанова Л.П., Кулаев И.С. Ферментный антибактериальный препарат лизоамидаза. Всероссийская конференция «Проблемы медицинской энзимологии. Современные

- технологии лабораторной диагностики нового столетия», Москва, 2002 г., Труды конференции, с. 194-195.
27. Логвина И.А., Цфасман И.М., Степная О.А. Выделение, очистка и исследование свойств нового внеклеточного фермента Л4 бактерий *Lysobacter* sp. «Биология – наука 21 века»: 7-ая Пушинская школа - конференция молодых ученых, Пушино, 2003, Сборник тезисов, с. 348.
28. Кулаев И.С., Степная О.А., Цфасман И.М., Рязанова Л.П., Бегунова Е.А., Ледова Л.А. Бактериолитический препарат лизоамидазы: новые перспективы использования в медицине. II Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 2003, Сборник тезисов, часть вторая, с.181.
29. Рязанова Л.П., Ледова Л.А., Степная О.А. Действие лекарственного препарата лизоамидазы на клетки грибов. Первый Всероссийский конгресс «Успехи медицинской микологии», Москва, 2003, Сборник тезисов, т.1, с. 109-110.
30. Safieva D.O., Budashov I.A., Doncova K.A., Kurochkin I.N., Logvina I.A., Begunova E.A., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. «Atomic-force microscopy analysis of alive *Bacillus* spores in different environmental conditions. Abstract of III conference «Biotechnology: State and Perspective of Investigation», Moscow, 2005, Abstracts book, p. 210-211.
31. Степная О.А., Рязанова Л.П., Крупянко В.И., Лихошерстов Л.М., Шибаев В.Н., Карлов А.И., Сидоров И.А., Кулаев И.С. Взаимодействие кислого экзополисахарида *Lysobacter* sp. XL1 с экзоферментами. Роль О-ацетильных групп экзополисахарида при взаимодействии с мурамидазой. 3-я Всероссийская школа-конференция «Химия и биохимия углеводов», Саратов, 2004, Сборник тезисов, с. 57.
32. Логвина И.А., Бегунова Е.А., Степная О.А., Изучение действия лизоамидазы на споры *Bacillus subtilis* и *B. Cereus*. «Биология - наука XXI века»: 8-ая международная Пушинская школа - конференция молодых ученых, Пушино, 2004. Сборник тезисов, с.121.
33. Stepnaya O. Lisoamidase, an antimicrobial preparation based on bacterial lytic enzymes, 2-nd International Conference «Science-Business-Education», Pushchino, 2005, с. 75.
34. Кулаев И.С., Лаптева Ю.С., Калинин А.Е., Хохлова О.Н., Шляпников М.Г., Цфасман И.М., Степная О.А., Грановский И.Э. Антимикробный ферментный препарат лизоамидазы: клонирование и экспрессия в *E. coli* генов

- бактериолитических эндопептидаз Л1 (*alp A*) и Л5 (*alpB*). Тезисы конференции «Фундаментальные науки-медицине», Москва, 2005, с.171-172.
35. Чайка И.А., Цфасман И.М., Степная О.А., Муранова Т.А. Дрожжелитическое действие металлопротеазы лизоамидазы. «Биология - наука XXI века»: 10-ая Пушкинская школа - конференция молодых ученых, Пушкино, 2006, Сборник тезисов, с.99.
36. Кулаев И.С., Степная О.А., Цфасман И.М., Грановский И.Э., Лаптева Ю.С., Шишкова Н.А., Маринин Л.И. Антимикробный ферментный препарат лизоамидаза: создание штаммов-суперпродуцентов бактериолитических ферментов лизоамидазы. Материалы симпозиума «Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств», Москва, 2008, Сборник тезисов, с. 103-104.
37. Кулаев И.С., Степная О.А., Шишкова Н.А., Маринин Л.И. Бактериолитические ферменты для профилактики и лечения сибирской язвы. Тезисы докладов пятого московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2009, Москва, Сборник тезисов, с. 88.
38. Васильева Н.В., Цфасман И.М., Сузина Н.Е., Степная О.А., Кулаев И.С. Бактериолитическая эндопептидаза Л5 *Lysobacter* sp. XL1 и ее секрция в окружающую среду. Тезисы докладов 4 Российского симпозиума «Белки и пептиды», Казань, 2009, Сборник тезисов, с. 371.
39. Лаптева Ю.С., Михайлова И.М., Красовская Л.А., Цфасман И.М., Степная О.А., Грановский И.Э. Создание гетерологичной системы экспрессии генов бактериолитических эндопептидаз Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 на основе бактерий рода *Pseudomonas*. Тезисы докладов 4 Российского симпозиума «Белки и пептиды», Казань, 2009, Сборник тезисов, с. 374.
40. Сухаричева Е.О., Видягина Н.В., Руденко Н.В., Латыпов О.Р., Красовская Л.А., Степная О.А. Выявление моноклональными антителами белковых комплексов, образующихся в клетках *Lysobacter* sp. XL1 в процессе секрции литической эндопептидазы AlpB. Материалы всероссийской конференции «Экотоксикология-2010», Тула, 2010, Сборник тезисов, с. 41.
41. Кулаев И.С., Степная О.А., Цфасман И.М., Васильева Н.В., Грановский И.Э., Латыпов О.Р., Шишкова Н.А., Маринин Л.И. Проверка лечебной эффективности внешнемембранных везикул, содержащих литическую эндопептидазу, на моделях сибиреязвенной инфекции. Материалы

конференции «Фундаментальные науки - медицине», 2010, Москва, Сборник тезисов, с. 28.

42. Шишкова Н.А., Маринин Л.И., Васильева Н.В., Ледова Л.А., Кулаев И.С., Цфасман И.М., Степная О.А. Антимикробный потенциал внешнемембранных везикул *Lysobacter* sp. XL1. Всероссийский симпозиум с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее», Москва, 2011, Сборник тезисов, с. 141.
43. Красовская Л.А., Васильева Н.В., Лаптева Ю.С., Грановский И.Э., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Степная О.А., Кулаев И.С. Получение рекомбинантных литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 в гетерологичной системе *Pseudomonas*. Всероссийский симпозиум с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее», Москва, 2011, Сборник тезисов, с.70.

Подписано в печать: 04.04.2012

Заказ № 6905 Тираж - 120 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

www.autoreferat.ru

