

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАГОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА KPP10, ДЕЙСТВУЮЩЕГО НА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Н. П. Антонова^{1,2}, В. Ю. Балабаньян², А. П. Ткачук¹, В. В. Макаров³, В. А. Гушчин^{1,3,4} ✉

¹ Лаборатория трансляционной биомедицины, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

² Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

³ ФГБУ «ЦСП» Минздрава России, Москва

⁴ Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Одним из наиболее перспективных современных подходов для преодоления множественной лекарственной устойчивости можно назвать применение рекомбинантных эндолизин. Нами получены данные о физико-химических и литических свойствах бактериолизина фага KPP10 — рекомбинантного эндолизина, который эффективно действовал на штаммы *Pseudomonas aeruginosa* в концентрации от 3 мкг/мл. Слитый в одной рамке трансляции с фрагментом положительно заряженного пептида SMAP-29, артилизин KPP10 действует на лабораторные штаммы и клинические изоляты *Pseudomonas aeruginosa* без использования пермеабилizаторов. Полученные результаты позволяют рассчитывать на успешное проведение доклинических испытаний эффективности артилизина AL-KPP10 с использованием инфекционных моделей.

Ключевые слова: внутрибольничные инфекции, антибиотикорезистентность, бактериофаги, эндолизины бактериофагов, фаг KPP10, артилизин AL-KPP10

Финансирование: статья подготовлена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках проекта RFMEFI60117X0018.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Алексеевич Гушчин
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; wowaniada@gmail.com, vladimir.a.gushchin@gamaleya.org

Статья получена: 02.02.2018 **Статья принята к печати:** 23.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.010

PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT KPP10 PHAGE LYSINS AND THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Antonova NP^{1,2}, Balabanyan VYu², Tkachuk AP¹, Makarov VV³, Gushchin VA^{1,3,4} ✉

¹ Laboratory for Translational Biomedicine,
N. F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow

² Faculty of Fundamental Medicine,
Lomonosov Moscow State University, Moscow

³ Center for Strategic Planning of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

⁴ Department of Virology, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Moscow

One of the most promising approaches to combatting multiple drug resistance is based on the use of recombinant endolysins. In this work we study physical, chemical and lytic properties of phage KPP10, a recombinant endolysin effective against *Pseudomonas aeruginosa* at concentrations of 3 µg/ml. Fused with a fragment of positively charged SMAP-29 peptide into one reading frame, artilysin KPP10 is effective against laboratory strains and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of permeabilizers. Our findings encourage preclinical trials of this artilysin in infectious models.

Keywords: nosocomial infections, antimicrobial resistance, bacteriophages, lysins of bacteriophages, phage KPP10, artilysin KPP10

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation as part of the project RFMEFI60117X0018.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir Gushchin
Gamaleya 18, Moscow, 123098; wowaniada@gmail.com, vladimir.a.gushchin@gamaleya.org

Received: 02.02.2018 **Accepted:** 23.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.010

Одной из современных проблем здравоохранения является стремительное увеличение количества штаммов бактерий, устойчивых к существующим антибактериальным средствам. Некоторые из них выработали резистентность даже к наиболее эффективным в настоящее время препаратам и препаратам резерва. Все больше штаммов приобретают множественную или широкую лекарственную устойчи-

вость. В отдельных случаях выявляются «супербактерии», не восприимчивые ни к одному применяемому для данной инфекции антибиотику. Быстрое появление и распространение разнообразных механизмов устойчивости к антибактериальным средствам обуславливает необходимость разработки принципиально новых подходов борьбы с бактериями. В краткосрочной перспективе существенным

представляется повышение эффективности использования известных антибиотиков, например, с помощью разработки усовершенствованных подходов к терапии. В долгосрочной перспективе необходима разработка антибактериальных средств, для которых развитие устойчивости будет маловероятным.

Одной из альтернатив антибиотикам и синтетическим антибактериальным средствам являются бактериофаги. Уже много лет они используются для борьбы с инфекциями, вызванными различными возбудителями [1, 2]. Применение бактериофагов имеет множество преимуществ: автоматическое дозирование в зависимости от степени заражения, минимальное нарушение естественной микрофлоры, низкая вероятность развития устойчивости, совместимость с антибиотиками, быстрая скорость разработки средств на основе фагов и их низкая стоимость, уничтожение биопленок, возможность единоразового введения и применения низких доз, а также низкая степень нагрузки на окружающую среду [3]. Однако есть и недостатки применения таких лекарственных препаратов. Работа с бактериофагами трудоемка — их сложно выделять из бактериальных культур с требуемой степенью чистоты, необходимо постоянно определять и нормировать их фармакокинетические характеристики, меняющиеся в процессе хранения. Между тем культивирование необходимо проводить на близких к патогену видах и штаммах, для которых отсутствуют эффективные стандартные протоколы культивирования и применяются высокие требования к безопасности в работе. К тому же, бактериофаги могут переносить гены бактериальных токсинов, а появление к ним устойчивости все же вероятно. И, наконец, фаги в высокой степени иммуногенны, что впоследствии снижает эффективность их повторного применения [3–5].

Новым классом антибактериальных агентов, которому не присущи вышеуказанные минусы, являются фаголизины (эндолизины). Фаголизины — это кодируемые бактериофагами специфические ферменты, расщепляющие пептидогликан клеточной стенки бактерий. В ходе своего жизненного цикла бактериофаги выделяют фаголизины для проникновения в клетку фаговой ДНК при инфицировании бактерий, а также для высвобождения новых вирионов из клетки. За счет действия своих каталитических доменов фаголизины способны расщеплению различных связей в пептидогликане. Гибель бактерии происходит вследствие гипотонического лизиса из-за различия в осмотическом давлении внутри и снаружи клетки [6].

Существует ряд неоспоримых преимуществ использования фаголизин по отношению к другим антимикробным агентам. Во-первых, это селективность. Воздействуя на определенный вид бактерий, фаголизины не влияют на представителей нормальной микрофлоры организма. Во-вторых, фаголизины очень быстро действуют на пептидогликан клеточной стенки, не задевая длительные метаболические процессы, что приводит к быстрому лизису бактерии. Время лечения таким препаратом может значительно снижаться по сравнению с терапией антибактериальными средствами. В-третьих, очень важным аспектом является низкая вероятность развития резистентности к фаголизинам. Фаголизины действуют на специфические молекулы-мишени, которые необходимы для нормальной жизнедеятельности клеток-хозяев, в связи с этим возникновение устойчивых изолятов маловероятно, поскольку должно сопровождаться коренной перестройкой бактериальной клеточной стенки. В-четвертых, фаголизины действуют на антибиотикоустойчивые штаммы бактерий, что

решает одну из важнейших проблем здравоохранения. И, в-пятых, вследствие своей способности дестабилизировать пептидогликан клеточной стенки фаголизины способны не только уничтожать клетки бактерий, находящихся в различных метаболических состояниях (состоянии покоя или при активном делении), но и разрушать образующие патогенами биопленки [7].

Одним из опаснейших возбудителей внутрибольничных инфекций является синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*). Борьба с ней сильно затруднена в связи с ее стремительно растущей устойчивостью к антибиотикам, способностью образовывать биопленки, а также разнообразием видов инфекций, вызываемых ею [8]. Создание новых лекарственных средств с активностью против *Pseudomonas aeruginosa* становится особенно важным.

Бактериофаг KPP10 обладает широким спектром действия на различные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* [9], в связи с чем его рекомбинантный фаголизин представляется перспективным белком для изучения физико-химических свойств и спектра литической активности, а также для создания на его основе антибактериального средства против *Pseudomonas aeruginosa*. В настоящей статье приводятся полученные нами данные по наработке рекомбинантного артилизина бактериофага KPP10, изучению его физико-химических свойств, а также бактерицидной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков AL-KPP10 и L-KPP10

Последовательности генов, кодирующих белки эндолизин L-KPP10 и артилизин AL-KPP10, были получены с использованием коммерческого синтеза (Евроген, Россия) в составе вектора pAL2-T. Последовательность была проверена на отсутствие ошибок с использованием секвенирования по Сэнгеру. В дальнейшем синтезированный ген в векторе pAL2-T, кодирующий последовательность L-KPP10, был расщеплен эндонуклеазами рестрикции по сайтам BamH – SacI и BamHI – PstI соответственно. По тем же сайтам был расщеплен экспрессионный вектор pQE-30. Полученные рестрикционные фрагменты разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле и после визуализации в УФ-свете выделяли необходимые фрагменты с помощью специального набора «Silica Bead DNA Extraction Kit» (Thermo, США). Далее проводили лигирование соответствующих рестрикционных фрагментов вставки и вектора в стандартном лигазном буфере T4 лигазой (Thermo, США).

Два полученных экспрессионных вектора pQE-30 (несущих гены AL-KPP10 и L-KPP10) помещали в компетентные клетки *Escherichia coli* штамма M15 с помощью трансформации методом «Heat Shock» для дальнейшей продукции белков. Для этого к компетентным клеткам добавляли полученные лигазные смеси, инкубировали в течение 25 мин на льду, затем нагревали при 42 °C в течение 45 с, помещали на лед на 2 мин, а затем добавляли среду LB, подрачивали клетки при 37 °C в течение 1 ч и высевали на чашки Петри. После инкубации чашек Петри при 37 °C в течение ночи, полученные колонии высевали в жидкую среду LB с необходимыми антибиотиками.

После наращивания клеток-продуцентов до $OD_{600} = 0,6$ и индукции в течение 3 ч с помощью добавления 1 mM IPTG проводили очистку на колонке с Ni-NTA – агарозой. Для этого индуцированные клетки лизировали буфером,

содержащим 6 М гидрохлорида гуанидина, 10 мМ Трис, 100 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (pH 8,0) в течение 1 ч, а затем лизат, в котором находится целевой белок, наносили на колонку в режиме gravity flow. Белок элюировали с сорбента путем понижения pH в градиенте буферов (состоящем из 8 М мочевины, 10 мМ Трис, 0,1 М $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, при pH от 8,0 до 5,5).

Далее полученные фракции белков AL-KPP10 и L-KPP10 очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке HisTrap HP (GE Healthcare, Великобритания). Раствор белка наносили на колонку в буфере, состоящем из 8 М мочевины, 10 мМ Трис, 0,1 М $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 мМ имидазола. Целевой белок элюировали с колонки с помощью буфера, содержащего 8 М мочевины, 10 мМ Трис, 100 мМ Na_2HPO_4 и 500 мМ имидазола (pH 5,5). Полученные фракции белков диализовали от буфера, в состав которого входят 5 мМ HEPES и 1 мМ DTT (pH 5,5) при 4 °C. Концентрацию белков измеряли спектрофотометрически на приборе HITACHI U-2900 (Hitachi, Япония) в кюветах с длиной пути 1 см. Измеряли оптическую плотность растворов белков при 280 нм. Концентрацию рассчитывали с учетом коэффициента поглощения $E_{280}^{0,1\%}$ нм, равного 1,455 и рассчитанного с помощью приложения ProtParam [10].

Физико-химические методы измерения

1. Измерение спектров кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма рекомбинантных белков, полученных в денатурирующих условиях и диализованных от 0,1 М фосфатного буфера, измеряли на модифицированном дихрографе Jobin-Ivon Mark V (Horiba, Япония) при комнатной температуре в кюветах с длиной оптического пути 1 мм, при концентрациях белков около 200 мкг/мл. Область измерения спектров составила 190–260 нм.

2. Динамическое лазерное светорассеяние

Гидродинамический диаметр частиц в растворе определяли на приборе ZetaSizer Nano-ZS компании Malvern Instruments LTD (Malvern, США) при 25 °C в специальных полистироловых кюветах с длиной пути 1 см. Длина волны лазера составляла 633 нм. Использовали пробы белков, полученных в денатурирующих условиях согласно методике, описанной выше с последующим диализом. Концентрация проб белков была заранее измерена на спектрофотометре. Полученные данные были обработаны с помощью программы Dispersion Technology Software version 5.10 (Malvern, США).

3. Измерение спектров флуоресценции

Спектры триптофановой флуоресценции проб белков с известной концентрацией (40 мкг/мл), полученных в денатурирующих условиях и очищенных на хроматографе, снимали на флуориметре FluoroMax-3 производителя HORIBA Jobin Yvon GmbH (Horiba, США) при комнатной температуре в специальных кюветах с длиной оптического пути 1 см, при возбуждающей эмиссии длине волны (соответствующей поглощению триптофана) равной 280 нм. Область измерения спектров составила 300–400 нм.

Изучение антибактериальных свойств

1. Изучение бактерицидной активности

Использовали препараты L-KPP10 и AL-KPP10, очищенные на хроматографической колонке и диализованные от буфера, содержащего 5 мМ HEPES и 1 мМ DTT (pH 5,5). Концентрацию белков доводили до необходимого значения тем же буфером.

Ночную культуру (2 мл в среде LB) бактериального штамма разбавляли и растили до оптической плотности $\text{OD}_{600} = 0,6$. Полученную культуру (2 мл) осаждали центрифугированием (3000 g, 10 мин), клетки ресуспендировали в таком же объеме 5 мМ HEPES (pH 5,5); мутность полученной суспензии должна соответствовать стандарту мутности по МакФарланду 0,5. Далее бактериальную культуру разбавляли в 100 раз таким же буфером (конечная плотность клеток составила 10^6 кл./мл). В 96-луночном планшете готовили следующие смеси:

1) 100 мкл суспензии бактерий, 50 мкл препарата в нужной концентрации и 50 мкл ЭДТА (конечная концентрация 0,5 мМ);

2) 100 мкл суспензии бактерий и 100 мкл препарата в нужной концентрации;

3) 100 мкл суспензии бактерий и 100 мкл буфера (контроль);

4) 100 мкл суспензии бактерий, 50 мкл буфера и 50 мкл ЭДТА (контроль).

Полученные смеси инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем делали 10-кратные разведения в фосфатном буфере (pH 7,2) и 100 мкл каждого разведения наносили на чашки Петри с агаризованной средой LB. Колонии на чашках подсчитывали после ночной инкубации при 37 °C.

В микробиологических исследованиях были задействованы штамм *Pseudomonas aeruginosa* PA103, а также клинические изоляты Ts 38–16, Ts 43–16, Ts 44–16, Ts 47–16, Ts 48–16 и Ts 49–16, депонированные в коллекции Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи Минздрава России.

2. Электронная микроскопия

AL-KPP10 в концентрации 50 мкг/мл добавляли к 10^6 КОЕ чувствительного штамма Ts 43–16 в буфере HEPES и инкубировали в течение 10, 20 или 30 мин при комнатной температуре.

10 мкл смеси наносили на специальную сеточку, высушивали при комнатной температуре, затем окрашивали 1% раствором уранилацетата, помещая сеточку на 30 с в каплю красителя. Остаток уранилацетата убирали, отмывая сеточку в капле воды в течение 30 с, промокивали фильтровальной бумагой и высушивали при комнатной температуре. Полученные препараты просматривали на электронном микроскопе JEOL JEM-101 (FEI Phenom World, Голландия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение и характеристика физико-химических свойств рекомбинантных молекул эндолизина и артилизина

В ходе работы были получены два рекомбинантных белка: эндолизин L-KPP10 и его модифицированный вариант — артилизин AL-KPP10, содержащий на С-конце своей структуры фрагмент миелоидного антимикробного пептида SMAP-29 ([K2,7,13]-SMAP-29(1–17)). Конструкции были получены с использованием коммерческого синтеза генов. Для получения экспрессионных конструкций оба варианта гена были перенесены в вектор pQE-30. Два полученных экспрессионных вектора (несущих гены AL-KPP10 и L-KPP10) помещали в компетентные клетки штамма M15 *Escherichia coli* с помощью трансформации методом «Heat Shock», наращивали клетки-продуценты и индуцировали

продукцию белка с помощью добавления синтетического аналога лактозы ИПТГ (изопропил- β -D-1-тиогактопиранозид). Далее клетки лизировали, полученные в денатурирующих условиях клеточные лизаты фракций белков AL-KPP10 и L-KPP10 очищали методом аффинной хроматографии с помощью гистидинового тага с N-концов белковых молекул и рефолдировали путем диализа.

На следующем этапе характеризовали различные физико-химические свойства полученных белков. Для определения структуры L-KPP10 и его модифицированного варианта AL-KPP10 проводили эксперименты в денатурирующих условиях и после ренатурации. В результате были исследованы: спектры кругового дихроизма для изучения вторичной структуры, спектры триптофановой флуоресценции для изучения наличия третичной структуры, а также динамическое лазерное светорассеяние белков для изучения их способности к агрегации/олигомеризации.

Изучение спектров кругового дихроизма показало, что AL-KPP10 и L-KPP10 имеют форму спектра, типичную для $\alpha\beta$ -белков с некоторым вкладом неупорядоченных структур (рис. 1А). Присутствие в структуре AL-KPP10 пептида [K2,7,13]-SMAP-29(1–17) не влияет на вторичную структуру белка, так как спектры практически полностью совпадают.

При помощи изучения спектров триптофановой флуоресценции исследовали наличие третичной структуры белков (рис. 1Б). По сравнению с денатурированными белками, у ренатурированных белков наблюдается смещение максимумов эмиссии в более коротковолновую область. Это смещение свидетельствует об уменьшении числа контактов триптофана в составе внутреннего белкового кора с молекулами растворителя вследствие восстановления

третичной структуры. Данный результат позволяет рассчитывать, что после ренатурации AL-KPP10 и L-KPP10 способны проявлять ферментативную активность.

Для изучения стабильности растворов полученных рекомбинантных белков был применен метод динамического лазерного светорассеяния. Данный метод позволяет определить гидродинамический размер белкового комплекса в растворе и способность молекулы белка к агрегации. Небольшие размеры наблюдаемого комплекса (3–7 нм) свидетельствуют о том, что белок находится в виде мономеров, а такое состояние является показателем стабильности белков в растворе. В случае изучаемых эндолизина динамическое лазерное светорассеяние показало, что большая часть белков в нативном состоянии находится в виде агрегатов размером около 60 нм, что является нормой для рекомбинантных белков, полученных с использованием процедуры ренатурации (рис. 1В, 1Г).

Противомикробная активность рекомбинантных молекул эндолизина и артилизина по отношению к *Pseudomonas aeruginosa*

Для изучения противомикробной активности рекомбинантных эндолизина и артилизина KPP10 использовали коллекцию лабораторных штаммов и клинических изолятов лаборатории трансляционной биомедицины Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи Минздрава России. Для изучения бактерицидного эффекта заданное количество предварительно подготовленных клеток нужных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* обрабатывали раствором с

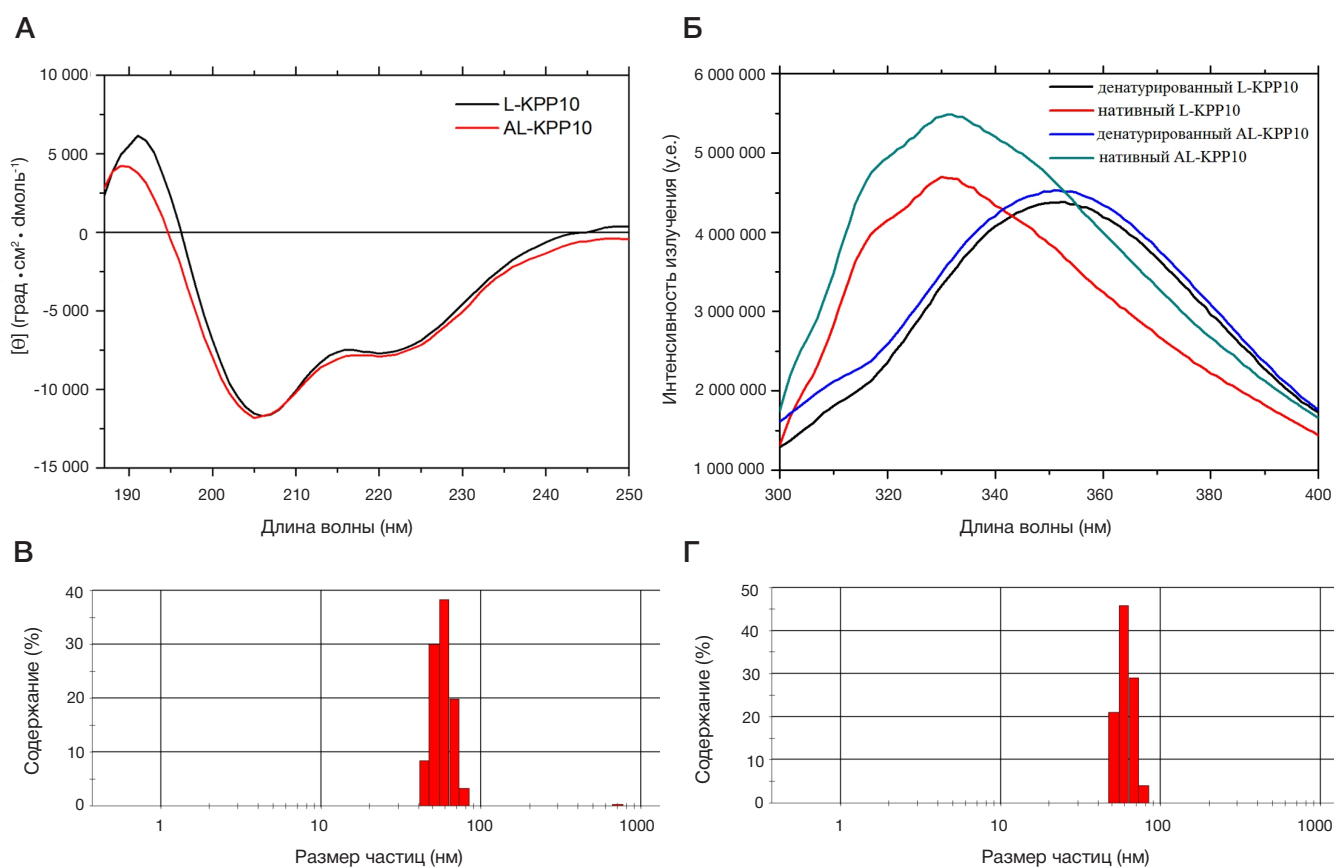


Рис. 1. Физико-химические свойства эндолизина L-KPP10 и артилизина AL-KPP10. Спектры кругового дихроизма белков AL-KPP10 и L-KPP10 (А). Спектры триптофановой флуоресценции белков в денатурирующих и нативных условиях (Б). Динамическое лазерное светорассеяние в растворах нативных белков AL-KPP10 (В) и L-KPP10 (Г)

различными концентрациями рекомбинантных фаголизина и артилизина, после чего производили посев на плотную агаризованную среду LB.

В результате экспериментов было показано, что эндолизин L-KPP10 не обладает бактерицидным эффектом на коллекционный штамм PA103 в исследованных концентрациях (рис. 2А). Данный результат был ожидаем, так как наличие наружной мембраны не позволяет белку проникнуть к молекулярным мишеням клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Так, совместная обработка бактериальных клеток белком L-KPP10 и ЭДТА в концентрации 0,5 мМ, повышающей проницаемость мембран, приводит к появлению литического эффекта в концентрациях уже от 3 мкг/мл (рис. 2Б).

Наличие положительно заряженного пептида в составе артилизина существенно изменяло наблюдаемую картину. Так, противомикробная активность артилизина AL-KPP10 проявлялась не только на штамме PA103, но и на четырех из шести клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* (табл. 1 и рис. 3). Инкубация артилизина с клетками бактерий в количестве 10^6 в течение 30 мин приводила к снижению числа колониеобразующих единиц *Pseudomonas aeruginosa* на 10^5 кл. в концентрациях 25 и 50 мкг/мл (рис. 3А).

Для визуализации процесса лизиса клетки использовали электронную микроскопию. Для этого восприимчивый к действию артилизина клинический изолят *Pseudomonas aeruginosa* Ts 43–16 обрабатывали AL-KPP10. Для обработки использовали концентрацию 50 мкг/мл. Инкубировали при комнатной температуре в течение 10, 20 и 30 мин. Визуализировали процесс лизиса под электронным микроско-

пом после окраски уранилацетатом (рис. 3Б). Как видно из рисунка, клетки *Pseudomonas aeruginosa* под действием белка теряют клеточную стенку, которую можно наблюдать в виде электронноплотной окрашенной массы, похожей на стружку.

Инкубация AL-KPP10 с чувствительными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* значительно снижает количество бактерий, выросших на чашках Петри, что показано на примере клинического изолята Ts 49–16 (рис. 3В).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время идет активный поиск различных фаголизinov для борьбы как с грамположительными, так и с грамотрицательными бактериями. Однако использование фаголизinov против грамотрицательных возбудителей затруднено из-за наличия наружной мембраны, препятствующей действию фермента на пептидогликан, поэтому необходимы вещества, увеличивающие проницаемость наружной мембраны. В качестве таковых могут использоваться полимиксины и их производные, аминогликозиды, ЭДТА, лимонная кислота и т. д. [11]. Например, были опубликованы результаты по эндолизину KZ144, полученному из антисинегного бактериофага phiKZ. Эндолизин KZ144 проявлял свои антимикробные свойства в присутствии пермеабилizаторов [12]. Еще одним примером служит запатентованный эндолизин OBPgpLYS. Данный белок обладает широким спектром действия на грамотрицательные бактерии и способен снижать количество бактерий на один порядок. При этом было показано, что добавление ЭДТА в небольших концентрациях увеличивает антимикробный

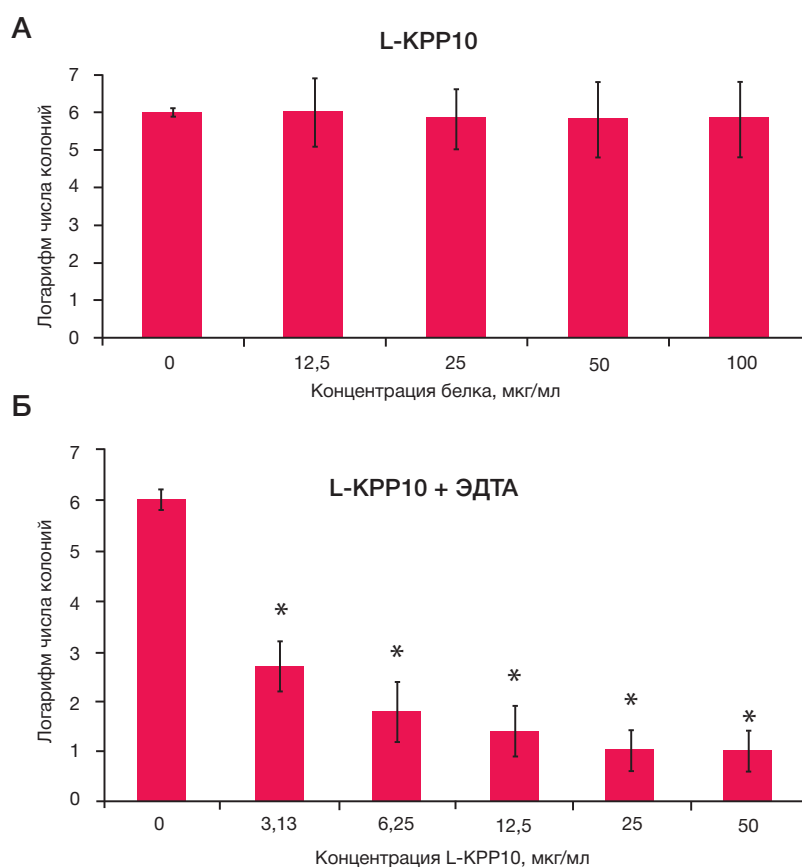


Рис. 2. Противомикробная активность рекомбинантного эндолизина по отношению к штамму PA103 *Pseudomonas aeruginosa*. Обработка различными концентрациями рекомбинантного L-KPP10 в отсутствии пермеабилizирующих агентов (А). Добавление 0,5 мМ ЭДТА к смеси бактерий и L-KPP10 (Б). * — уровень значимости $p = 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Таблица 1. Противомикробная активность артилизина AL-KPP10 по отношению к клиническим изолятам *Pseudomonas aeruginosa*

Штамм/клинический изолят <i>P. aeruginosa</i>	Наличие эффекта
PA103	+
Ts 38-16	–
Ts 43-16	+
Ts 44-16	+
Ts 47-16	–
Ts 48-16	+
Ts 49-16	+

эффект против *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью на 10^2 – 10^3 [13].

Для того чтобы не задействовать дополнительные реагенты, увеличивающие проницаемость наружных мембран, был создан новый класс фаголизин — артилизин [14, 15, 16]. Эти соединения представляют собой слитые в одной рамке трансляции эндолизин и положительно заряженный пептид, который позволяет перенести молекулу через наружную мембрану грамотрицательных бактерий. Один из перспективных пептидов для этих целей —

миелоидный антимикробный пептид овцы SMAP-29. Эта амфифильная молекула связывается с отрицательно заряженными фосфолипидами мембраны и образует в ней поры за счет встраивания своей гидрофобной части [17]. Примером артилизина, в состав которого входит молекула SMAP-29, служит артилизин Art-175 — модифицированный эндолизин бактериофага KZ144. В отличие от KZ144 артилизин Art-175 может проходить через наружную мембрану *Pseudomonas aeruginosa* и уничтожать бактерии, в том числе с множественной резистентностью, уменьшая их количество более чем на 10^4 [16]. При этом было выявлено, что активность фаголизин может быть шире, чем внутривидовая [18]. Так, для Art-175 была показана эффективность артилизина против бактерий *Acinetobacter baumannii*, в том числе штаммов, обладающих лекарственной устойчивостью, а также персистирующих форм [19].

Однако SMAP-29 в неизменном виде проявляет цитотоксичность по отношению к эритроцитам человека. В одном из исследований выявляли зависимость антибактериальной и гемолитической активности от длины пептида SMAP-29 и его первичной последовательности. После удаления и замены нескольких аминокислот была выявлена

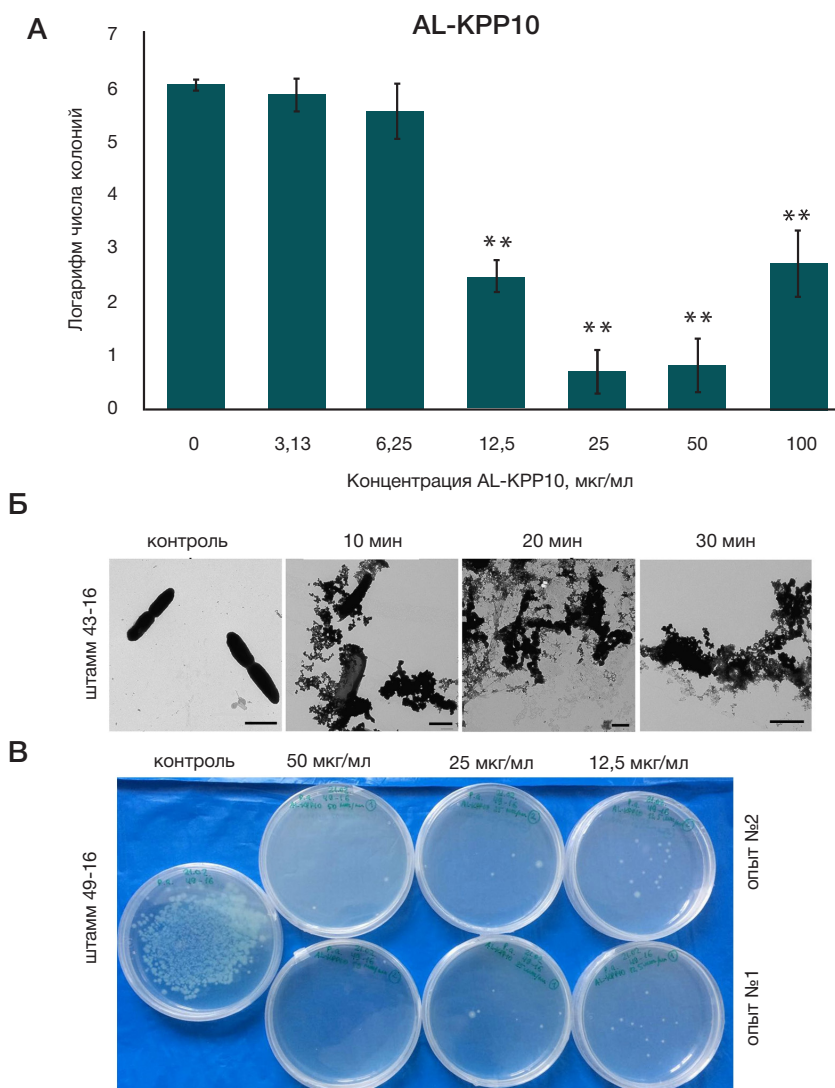


Рис. 3. Противомикробная активность рекомбинантного артилизина AL-KPP10 по отношению к восприимчивым штаммам *Pseudomonas aeruginosa*. Обработка различными концентрациями рекомбинантного AL-KPP10 в присутствии пермеабилизирующих агентов различных чувствительных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (А), $p < 0,01$ (критерий Манна-Уитни). Электронная микроскопия клеток клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa* Ts 43-16 после обработки AL-KPP10 в концентрации 50 мкг/мл в течение 10 мин, 20 мин и 30 мин (Б). Чашки Петри с нанесенной смесью артилизина и клеток клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa* Ts 49-16 после инкубации в течение 30 мин (В)

структура [K2,7,13]-SMAP-29(1–17), обладающая оптимальной активностью и не проявляющая нежелательной цитотоксичности [20, 21].

В ходе настоящей работы было получено два рекомбинантных фаголизина — эндолизин L-KPP10 и его модифицированная форма — артилизин AL-KPP10. Изучение физико-химических свойств эндолизина и артилизина показало наличие у них третичной структуры, которая восстанавливается в процессе ренатурации, что позволяет предположить наличие у них ферментативной активности. Оба белка имеют профиль, позволяющий поддерживать высокую стабильность в растворе. Важно отметить, что присутствие положительно заряженного пептида SMAP-29(1–17) в составе фаголизина KPP10 не меняет структуры и свойств белка (см. рис. 1). Данные результаты позволили перейти к проверке противомикробной активности полученных рекомбинантных молекул.

В ходе работы по проверке бактериолизической активности было показано, что эндолизин L-KPP10 в исследованных концентрациях проявляет активность только в присутствии ЭДТА. ЭДТА как пермеабилизирующий агент способствовал проникновению эндолизина через наружную мембрану к клеточной стенке. Между тем, артилизин AL-KPP10 благодаря наличию в его структуре фрагмента антимикробного миелоидного пептида SMAP-29 ([K2,7,13]-SMAP-29(1–17)) не требует дополнительной пермеабилизации с помощью ЭДТА и оказывает бактерицидный эффект на широкий спектр штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Так, пять из семи исследованных клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* оказались восприимчивыми, а наибольшая активность проявлялась при концентрации белка 25 и 50 мкг/мл. Артилизин в данных концентрациях снижал количество бактерий на 10^5 в течение 30 мин.

Наиболее близким функциональным аналогом описанного в данной статье артилизина AL-KPP10 является артилизин Art-175, представляющий собой эндолизин KZ144, связанный с пептидом SMAP-29 в неизменном виде. Как и в случае с AL-KPP10, артилизин Art-175 может проходить через наружную мембрану *Pseudomonas aeruginosa* и лизировать бактерии. Отличие AL-KPP10 от артилизина Art-175 заключается не только в использовании оригинальной последовательности лизина KPP10, но и наличие модификации укороченного пептида SMAP-29, несущего три аминокислотные замены [позиции K2,7,13], что приводит к снижению цитотоксической активности [20, 21]. Также можно рассчитывать, что активность артилизина AL-KPP10 выше, чем у Art-175, так как, согласно приведенным в настоящей статье данным, AL-KPP10 проявляет активность на порядок выше чем Art-175 [16].

ВЫВОДЫ

Представленные в настоящей статье данные подтверждают работоспособность схемы, при которой возможно достижение литических свойств фаголизина, действующего на грамотрицательные бактерии не только изнутри клетки, но и снаружи с применением пермеабилизирующих агентов или положительно заряженных пептидов. Это согласуется с ранее опубликованными результатами по эндолину KZ144 полученному из антисинегнойного бактериофага phiKZ, а также по эндолину OBPgpLYS, которые проявляли свои антимикробные свойства в присутствии пермеабиллизаторов. Таким образом, в будущем можно рассчитывать на получение положительных результатов разработки на основе рекомбинантных фаголизина препаратов, которые станут реальной альтернативой антибиотикам.

Литература

1. Алешкин А. В., Светоч Э. А., Воложанцев Н. В., Киселева И. А., Рубальский Е. О., Ершова О. Н. и др. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации. Бактериология. 2016; 1 (1): 22–31.
2. Aleshkin A, Volozhantsev N, Popova A, Svetoch E, Rubalsky E, Kiseleva I, et al. Phage-based cocktail for control of hospital-acquired pathogens. Phages 2015 Bacteriophage in Medicine, Food and Biotechnology: Conference handbook; 2015 September 01–02; St Hilda's College, Oxford, UK; 2015. p. 17.
3. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. Bacteriophage. 2011; 1: 111–114.
4. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skropek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. Current Protein & Peptide Science. 2012; 13: 699–722.
5. Nilsson AS. Phage therapy-constraints and possibilities. Upsala Journal of Medical Sciences. 2014; 119: 192–8.
6. Rodríguez-Rubio L, Gutiérrez D, Donovan DM, Martínez B, Rodríguez A, García P. Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. Critical Reviews in Biotechnology. 2016; 36 (3): 542–52.
7. Fischetti VA. Lysin Therapy for Staphylococcus aureus and Other Bacterial Pathogens. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2017; 409: 529–40.
8. Dwivedi GR, Tyagi R, Sanchita, Tripathi S, Pati S, Srivastava SK, et al. Antibiotics potentiating potential of catharanthine against superbug *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2017: 1–15.
9. Uchiyama J, Rashel M, Takemura I, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, et al. Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP10. Archives of Virology. 2012; 157 (4): 733–8.
10. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed). The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press. 2005; 571–607.
11. Briers Y, Walmagh M, Lavigne R. Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Applied Microbiology. 2011; 110 (3): 778–85.
12. Briers Y, Volckaert G, Cornelissen A, Lagaert S, Michiels CW, Hertveldt K, et al. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL. Molecular Microbiology. 2007; 65 (5): 1334–44.
13. Briers Y, Lavigne R, Walmagh M, Miller S, inventors; Lysando AG, Katholieke Universiteit Leuven, K.U. Leuven R&D, assignee. Endolysin OBPgpLYS. United States patent US 8846865 B2. 2014 Sep 30.
14. Gerstman H, Rodríguez-Rubio L, Lavigne R, Briers Y. From endolysins to Artilysin®s: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. Biochemical Society Transactions. 2016; 44 (1): 123–8.
15. Briers Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, Cornelissen A, Cenens W, Aertsen A, et al. Engineered endolysin-based "Artilysin" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. MBio. 2014; 5 (4): e01379–14.
16. Briers Y, Walmagh M, Grymonprez B, Biebl M, Pirnay JP, Defraigne V, et al. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014; 58 (7): 3774–84.
17. Dawson RM, Liu CQ. Cathelicidin peptide SMAP-29:

comprehensive review of its properties and potential as a novel class of antibiotics. *Drug Development Research*. 2009; 70 (7): 481–98.

18. Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010; 300 (6): 357–62.
19. Defraigne V, Schuermans J, Grymonprez B, Govers SK, Aertsen A, Fauvart M, et al. Efficacy of Artilysin Art-175 against Resistant and Persistent *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy. 2016; 60 (6): 3480–8.

20. Skerlavaj B, Benincasa M, Risso A, Zanetti M, Gennaro R. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Letters*. 1999; 463 (1–2): 58–62.
21. Shin SY, Park EJ, Yang ST, Jung HJ, Eom SH, Song WK, et al. Structure–activity analysis of SMAP-29, a sheep leukocytes-derived antimicrobial peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001; 285 (4): 1046–51.

References

1. Aleshkin AV, Svetoch EA, Volozantsev NV, Kiseleva IA, Rubalsky EO, Ershova ON, et al. Innovative directions for using bacteriophages in the sphere of sanitary and epidemiological welfare of the Russian Federation. *Bacteriology*. 2016; 1: 22–31.
2. Aleshkin A, Volozhantsev N, Popova A, Svetoch E, Rubalsky E, Kiseleva I, et al. Phage-based cocktail for control of hospital-acquired pathogens. *Phages 2015 Bacteriophage in Medicine, Food and Biotechnology: Conference handbook*; 2015 September 01-02; St Hilda's College, Oxford, UK; 2015. p. 17.
3. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*. 2011; 1: 111–114.
4. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. *Current Protein & Peptide Science*. 2012; 13: 699–722.
5. Nilsson AS. Phage therapy-constraints and possibilities. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2014; 119: 192–198.
6. Rodríguez-Rubio L, Gutiérrez D, Donovan DM, Martínez B, Rodríguez A, García P. Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016; 36 (3): 542–52.
7. Fischetti VA. Lysin Therapy for *Staphylococcus aureus* and Other Bacterial Pathogens. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2017; 409: 529–40.
8. Dwivedi GR, Tyagi R, Sanchita, Tripathi S, Pati S, Srivastava SK, et al. Antibiotics potentiating potential of catharanthine against superbug *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2017; 1–15.
9. Uchiyama J, Rashel M, Takemura I, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, et al. Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP10. *Archives of Virology*. 2012; 157 (4): 733–8.
10. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed). *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press. 2005; 571–607.
11. Briers Y, Walmagh M, Lavigne R. Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*. 2011; 110 (3): 778–85.
12. Briers Y, Volckaert G, Cornelissen A, Lagaert S, Michiels CW, Hertveldt K, et al. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL. *Molecular Microbiology*. 2007; 65 (5): 1334–44.
13. Briers Y, Lavigne R, Walmagh M, Miller S, inventors; Lysando AG, Katholieke Universiteit Leuven, K.U. Leuven R&D, assignee. Endolysin OBPgpLYS. United States patent US 8846865 B2. 2014 Sep 30.
14. Gerstmans H, Rodríguez-Rubio L, Lavigne R, Briers Y. From endolysins to Artilysin®s: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. *Biochemical Society Transactions*. 2016; 44 (1): 123–8.
15. Briers Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, Cornelissen A, Cenens W, Aertsen A, et al. Engineered endolysin-based "Artilysin" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *MBio*. 2014; 5 (4): e01379–14.
16. Briers Y, Walmagh M, Grymonprez B, Biebl M, Pirnay JP, Defraigne V, et al. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persisters of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58 (7): 3774–84.
17. Dawson RM, Liu CQ. Cathelicidin peptide SMAP-29: comprehensive review of its properties and potential as a novel class of antibiotics. *Drug Development Research*. 2009; 70 (7): 481–98.
18. Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010; 300 (6): 357–62.
19. Defraigne V, Schuermans J, Grymonprez B, Govers SK, Aertsen A, Fauvart M, et al. Efficacy of Artilysin Art-175 against Resistant and Persistent *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016; 60 (6): 3480–8.
20. Skerlavaj B, Benincasa M, Risso A, Zanetti M, Gennaro R. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Letters*. 1999; 463 (1–2): 58–62.
21. Shin SY, Park EJ, Yang ST, Jung HJ, Eom SH, Song WK, et al. Structure–activity analysis of SMAP-29, a sheep leukocytes-derived antimicrobial peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001; 285 (4): 1046–51.