

УДК 578.81

## СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ФАГОВЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЕПТИДОГЛИКАНГИДРОЛАЗ, НОВОГО КЛАССА АНТИСТАФИЛОКОККОВЫХ ЭНЗИБИОТИКОВ

*Абаев И.В., кандидат медицинских наук,  
тел. 7(4967) 36-00-03, abaev@obolensk.org*  
*Скрябин Ю.П., тел. 7(4967) 36-00-03, info@obolensk.org*  
*Печерских Э.И., тел. 7(4967) 36-00-03, info@obolensk.org*  
*Шишкова Н.А., кандидат биологических наук,  
тел. 7(4967) 36-00-03, info@obolensk.org*  
*Светоч Э.А., доктор ветеринарных наук, профессор,  
тел. 7(4967) 36-00-79, svetoch@obolensk.org*  
**ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии**

**Ключевые слова:** *пептидогликангидролазы, эндолизины, аутолизины, бактериальный лизис, стафилококки.*

*Работа посвящена анализу известных структурных типов бактериальных и бактериофаговых пептидогликангидролаз, рассматриваемых в качестве основы для разработки перспективных антистафилококковых препаратов, прежде всего, против антибиотикорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*. Функциональные характеристики доменов пептидогликангидролаз позволяют создание рекомбинантных белков узконаправленного спектра действия против одного или более родов грамположительных бактерий, например, только стафилококков и стрептококков.*

Патогены с множественной лекарственной устойчивостью являются актуальной проблемой здравоохранения во всем мире. Бактериальные и бактериофаговые пептидогликангидролазы (ПГ) в виде очищенных рекомбинантных белков способны убивать грамположительные бактерии в результате осмотического лизиса и оцениваются как новый класс антибактериальных веществ, расщепляющих различные ковалентные связи пептидогликана бактерий. ПГ представляют собой потенциальный источник нового поколения антимикробных препаратов для лечения лекарственно-устойчивых форм возбудителей.

ПГ разрушают пептидогликан - основной компонент бактериальной стенки [1]. Характерными свойствами ПГ по сравнению с другими возможными источниками новых антибактериальных препаратов являются а) **низкая вероятность возникновения резистентности патогенов к ПГ**, б) узкий спектр литического действия – способность разрушать только целевые бактерии, в) эффективный лизис бактериальных биопленок.

Фаговые ПГ (эндолизины) - продукт ко-эволюция бактерий и фагов. Выживание фага основывается на его способности деградировать пептидогликан и высвободить новые фаговые частицы. Аналогично, бактериальные ПГ (аутолизины) необходимы для обеспечения

процессов роста клеточной стенки, деления клеток, споруляции самой бактериальной клетки. Случаи возникновения бактериальной устойчивости к эндолизинам не были выявлены, несмотря на неоднократные попытки [2]. Вполне вероятно, что ко-эволюция бактерий и фагов сделала мишенью ПГ неизменяемые связи пептидогликана.

Родо – или даже видоспецифичность ПГ по отношению к патогенам позволяет целенаправленно воздействовать только на инфекционный агент, не затрагивая широкий спектр сопутствующей микрофлоры. Специфичность ПГ позволяет избежать многих ошибок, связанных с использованием антимикробных препаратов широкого спектра действия, которые приводят к селекции резистентных штаммов не только у целевого возбудителя, но и у комменсалов, на которые препарат воздействует. Согласно рекомендациям ВОЗ для снижения уровня распространения антибиотикорезистентности следует избегать воздействия антибиотиков широкого спектра действия на бактериальные сообщества комменсалов. ПГ, вследствие родовой и видовой специфичности, выгодно отличаются в этом отношении от антибиотиков.

Высокая степень резистентности к антибактериальным препаратам многих возбудителей и понижение их восприимчивости к фагоцитозу, как известно, обусловлена множественными изменениями в клетках патогена, сопровождающими рост биопленки. Благодаря фиксированным формам бактериальных колоний, биопленки могут закрепляться на поверхности механических или протетических устройств, или прикрепляться к слою клеток млекопитающих. Бактерии в биопленке могут быть на несколько порядков более устойчивыми к воздействию антибиотиков, чем в жидкой культуре [3]. Использование ферментов, способных разрушать биопленки, делает более эффективным лечение стафилококковых инфекций [4]. Для стафилококковых ПГ показана эффективная способность разрушать биопленки *S. aureus* [5].

Перечисленные характеристики стафилококковых ПГ во многом определяются модульной структурой этих ферментов. По локализации гены стафилококковых ПГ разделяют на два типа: 1) гены эндолизинов, которые входят в состав фагов/профагов, 2) гены аутолизинов, которые локализуются в бактериальной хромосоме и плаزمиде. Эндолизины и аутолизины обладают доменной структурой: один-два каталитических домена и субстрат-связывающий домен, который может быть в нескольких повторах. Организация доменной структуры имеет различные варианты по составу и локализации доменов.

По каталитической активности выделяют три основных класса ПГ стафилококков, способные расщеплять пептидные, амидные или гликозидные связи пептидогликана. Соответственно, выделяют эндопептидазные, амидазные и гликозаминидазные каталитические домены [1]. Каждый каталитический домен состоит из коротких последовательностей в 100-200 аминокислот. Среди субстрат-связывающих доменов наиболее часто встречаются два типа: SH3\_5 домен и LysM домен. Для эндолизинов наиболее характерны три основных типа структуры – а) **N-концевая эндопептидаза (цистеин-гистидин-зависимой амидогидролазы (CHAP) (pfam 05257; GO:0008745))**, второй каталитический домен – амидаза-2 (pfam 01510; GO:0008745), и C-терминальный SH3b\_5 домен (pfam08460); б) **N-концевая эндопептидаза (CHAP) и C-терминальный SH3b\_5 домен**; в) **N-концевая эндопептидаза (CHAP) и домен гликозаминидазы (cl00743)**. Отсутствие в составе ряда опубликованных эндолизинов C-терминального SH3\_5 домена, возможно, связано со сложностями идентификации нестандартных вариантов данного домена.

Принципиальным отличием известных аутолизинов от эндолизинов является локализация эндопептидазного домена на C-конце. Всего выделяются три основных варианта структуры: а) **N-концевой LysM домен и C-терминальная эндопептидаза**; б) **C-терминальная эндопептидаза без идентифицированного LysM домена**; и в) домен гликозаминидазы и C-терминальная эндопептидаза.

На сегодняшний день идентифицировано, как минимум, шесть различных вариантов эндопептидазного (CHAP) домена, один вариант эндопептидазного M23A домена, и два варианта амидазного домена.

Информация о наличии доменного разнообразия у ПГ стафилококков важна в свете задач по получению рекомбинантных ферментов, обладающих набором новых свойств, непри- сущих природным пептидогликангидролазам. Как правило, получению новых слитых белков предшествует стадия идентификации ПГ, способных лизировать живые клетки стафилокок- ков, и стадия делеционного анализа и идентификации функциональных литических доменов, сохраняющих активность в виде отдельных белков.

Большинство ПГ, способных лизировать живые клетки *S. aureus*, представляют собой классический вариант эндолизина, состоящего из трех доменов – двух каталитических (СНАР и амидаза) и SH3\_5 домена. Это эндолизин (LysK) фага K, эндолизин фага phi11, эндолизин фага ФSH2 и эндолизин lysWMY фага M [6, 5, 7, 8] и др. Структуры из двух каталитических доменов - гликозаминидазы и С-терминальной эндопептидазы, к которым относится белок 17 вириона фага P68 и белок gp61 фага MR11, также проявляли активность против живых клеток клинических изолятов *S. aureus* [9;10].

Данные делеционного анализа показали исключительный вклад СНАР доменов в ли- тическую активность эндолизинов, тогда как амидазный домен в одиночку, как правило, не имеет литической активности против живых клеток. Известен только один случай доминирую- щего положения амидазного домена [11], способного в виде изолированного белка эффектив- но убивать живые клетки стафилококков. Этот факт представляется важным в свете создания химерных белков, состоящих из трех активных синергетически действующих каталитических доменов.

Способ осуществления субстрат-специфичной функции ПГ остается неясным. Изо- лированные каталитические домены стафилококковых эндолизинов в полной мере сохраняют специфичность, присущую полному белку [6, 7, 11]. При этом наличие субстрат-связываю- щего домена, как правило, мало влияет на литическую активность рекомбинантного белка, но оказывает сильное влияние на такое свойство, как растворимость. Неожиданным фактом является литическая активность против стрептококков и стафилококков рекомбинантной ПГ, полученной на основе слияния каталитического пептидазного домена из стрептококкового эн- долизина и субстрат-связывающего домена стафилококкового фага [12]. Таким образом, функ- циональные характеристики доменов ПГ позволяют создание рекомбинантных белков узкона- правленного спектра действия против одного или более родов грамположительных бактерий, например, только стафилококков и стрептококков.

Терапевтический потенциал ряда стафилококковых рекомбинантных ПГ уже продемон- стрирован результатами экспериментов на мышах *in vivo* [10; 13, 14]. Защитное действие но- вых антимикробных препаратов *in vivo* свидетельствует о высоком потенциале слитых белков, обладающих антимикробным действием, в качестве новых терапевтических средств лечения инфекций, вызванных MRSA, а также других стафилококковых заболеваний.

### **Библиографический список**

1. Lopez R, Garcia E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage // FEMS Microbiol Rev, 2004; 28: 553-580.
2. Fischetti VA. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives // Trends Microbiol 2005; 13: 491-496.
3. Amorena B, Gracia E, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Perez M, Alabart JL, Hernandez-Yago J. Antibiotic susceptibility assay for Staphylococcus aureus in biofilms developed *in vitro* // J Antimicrob Chemother, 1999; 44: 43-55.
4. Otto M. Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation // Curr Top Microbiol Immunol, 2006; 306: 251-258.
5. Sass P, Bierbaum G. Lytic Activity of Recombinant Bacteriophage {phi}11 and {phi}12 Endolysins on Whole Cells and Biofilms of Staphylococcus aureus // Appl Environ Microbiol, 2007; 73, 347-352.

6. Becker SC, Dong S, Baker JR, Foster-Frey J, Pritchard DG, Donovan DM. LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells // FEMS Microbiology letters, 2009; 294, 52-60.
7. Schmelcher M, Korobova O, Schischkova N, Kiseleva N, Kopylov P, Pryamchuk S, Donovan DM, Abaev I. *Staphylococcus haemolyticus* prophage  $\Phi$ SH2 endolysin relies on cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidases activity for lysis 'from without' // J Biotechnol, 2012;162(2-3):289-98.
8. Yokoi KJ, Kawahigashi N, Uchida M, Sugahara K, Shinohara M, Kawasaki K, Nakamura S, Taketo A & Kodaira K. The two-component cell lysis genes holWMy and lysWMy of the *Staphylococcus warneri* M phage var phiWMy: cloning, sequencing, expression, and mutational analysis in *Escherichia coli* // Gene, 2005; 351: 97-108.
9. Takac M, and Blasi U. Phage P68 Virion-Associated Protein 17 Displays Activity against Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* // Microbiology. Antimicrob Agents Chemother, 2005;49(7): 2934-2940.
10. Rashed, M., J. Uchiyama, I. Takemura, H. Hoshiba, T. Ujihara, H. Takatsuji, K. Honke, and S. Matsuzaki. Tail-associated structural protein gp61 of *Staphylococcus aureus* phage phi MR11 has bifunctional lytic activity // FEMS Microbiol. Lett, 2008; 284:9-16.
11. Abaev I, Foster-Frey J, Korobova O, Shishkova N, Kiseleva N, Kopylov P, Pryamchuk S, Schmelcher M, Becker SC, Donovan DM. Staphylococcal Phage 2638A endolysin is lytic for *Staphylococcus aureus* and harbors an inter-lytic-domain secondary translational start site // Appl Microbiol Biotechnol, 2012; [Epub ahead of print]
12. Becker SC, Foster-Frey J, Stodola AJ, Anacker D, Donovan DM. Differentially conserved staphylococcal SH3b\_5 cell wall binding domains confer increased staphylolytic and streptolytic activity to a streptococcal prophage endolysin domain // Gene, 2009; 443:32-41.
13. Daniel A, Euler C, Collin M, Chahales P, Gorelick KJ, Fischetti VA. Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // Antimicrob Agents Chemother, 2010; 54(4):1603-12.
14. Fenton M, Casey PG, Hill C, Gahan CG, Ross RP, McAuliffe O, O'Mahony J, Maher F, Coffey A. The truncated phage lysin CHAP(k) eliminates *Staphylococcus aureus* in the nares of mice // Bioeng Bugs, 2010; 1(6):404-407.

## **SYSTEM ANALYSIS OF GENETIC STRUCTURE OF PHAGE AND BACTERIAL PEPTIDOGLYCAN HYDROLASES, A NEW CLASS OF ANTISTAPHYLOCOCCAL ENZYBIOTICS**

*Abaev IV, Skryabin YuN, Pecherskikh EI, Shishkova NA, Svetoch EA*

**Key words:** *peptidoglycan hydrolases, endolysins, autolysins, bacterial lysis, staphylococci.*

*The aim of the study is to analyze known structural bacterial and bacteriophage peptidoglycan hydrolases as a basis for developing novel antimicrobials against staphylococci especially against MRSA. Functional properties of peptidoglycan hydrolases domains allow designing new recombinant specific proteins against one or several genera of gram-positive bacteria, e.g. against staphylococci and streptococci only.*