

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-99

СКРИНИНГ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

DESIGN OF A PANEL OF BACTERIOLYTIC PROTEINS FOR DEVELOPING NOVEL ANTIBACTERIAL MEDICATIONS

А. М. Лендел, Н. П. Антонова, И. В. Григорьев, А. В. Дедова, Е. В. Усачев, Д. В. Васина

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

A. M. Lendel, N. P. Antonova, I. V. Grigoriev, A. V. Dedova, E. V. Usachev, D. V. Vasina

N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ kazejosei@gmail.com

Аннотация

Получена панель из рекомбинантных фаговых лизинов, активных в отношении полирезистентных бактерий родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и семейства Enterobacteriaceae. Показана их способность разрушать биопленки. Лизины характеризуются различными оптимумами pH и низкой токсичностью в отношении клеток эукариот. Таким образом, данная коллекция лизинов применима в разработке лекарственных средств.

Abstract

A panel of recombinant bacteriophages' lysins acting *versus* multidrug-resistant representatives of *Acinetobacter*, *Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae f. was designed. The investigated proteins are capable to disrupt biofilms of *A. baumannii*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, possess different pH optima and are low in toxicity towards eukaryotic cells. Thus, this collection of lysins is applicable in drug development.

В последние десятилетия распространение множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) у клинически значимых бактерий стало глобальным вызовом для медицины. Эта проблема, в совокупности с новыми данными о вкладе биопленок в инфекционный патогенез, привела к появлению решений, предлагающих альтернативные антибиотикам методы борьбы с бактериальными инфекциями. Так, одним из перспективных направлений в терапии заболеваний, вызванных бактериями с МЛУ, является использование литических белков бактериофагов — лизинов. Природное разнообразие лизинов позволяет создавать универсальные платформы для формуляции новых антибактериальных препаратов. Целью данной работы стала характеристика новой панели рекомбинантных литических белков, направленных на борьбу с грамотрицательными бактериями.

На основании данных геномов бактериофагов, демонстрирующих выраженное литическое действие в отношении высокопатогенных грамотрицательных бактерий, были получены 11 последовательностей, кодирующих различные типы лизинов. После трансформации сконструированных на их основе экспрессионных векторов в штамм-продуцент *Escherichia coli*, продукции и хроматографической очистки выделены 7 белков (см. таблицу). Для полученных ферментов изучали *in vitro* антибактериальную активность, их биохимические свойства и цитотоксическое действие.

Полученные рекомбинантные лизины

Источник, фаг бактерии рода	Код	Каталитический домен	Прочие домены
<i>Pseudomonas</i>	GRC-EL03	Мурамидаза/хитиназа семейства GH19	–
<i>Escherichia</i>	GRC-EL05	Мурамидаза/трансгликозилаза GH104	–
<i>Aeromonas</i>	GRC-EL06	Мурамидаза GH24	–
<i>Raoultella</i>	GRC-EL07	SleB-подобная гидролаза	–
	GRC-EL08	Мурамидаза/хитиназа GH19	–
<i>Proteus</i>	GRC-EL10	–	Трансмембранный домен Rz-подобный спанин
<i>Acinetobacter</i>	GRC-EL14	Мурамидаза GH24	CWBD_1

Все исследуемые белки оказывали выраженное антибактериальное действие в гипотонических условиях (20 мМ Трис HCl pH = 7,5). Обработка чувствительных штаммов лизинами в концентрации 1–10 мкг/мл в течение 30 мин приводила к снижению бактериального титра $\geq 0,5$ lg по сравнению с контролем роста. При повышении концентрации лизинов до 100 мкг/мл, как правило, антибактериальный эффект белков значительно усиливался, достигая снижения до 3,2 lg. Наиболее широкий спектр действия демонстрировал GRC-EL14, приводивший к отсутствию роста большинства штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* и *Salmonella enterica*. Широким спектром активности также обладали лизины GRC-EL05, GRC-EL06 и GRC-EL07, хотя их действие в отношении *S. enterica* было ограничено. Остальные белки действовали более специфично: GRC-EL08 практически не ингибировал рост *P. aeruginosa*, но показал высокую эффективность в отношении энтеробактерий (клебсиелл и эшерихий), в то время как для GRC-EL03 и GRC-EL10 прослеживалась межвидовая избирательность действия.

В концентрациях 10–100 мкг/мл исследуемые лизины приводили к дозозависимому снижению плотности зрелых биопленок *A. baumannii* и *K. pneumoniae* в 2–4 раза. С другой стороны, только GRC-EL10 и GRC-EL14 разрушали мукоидные биопленки, сформированные *P. aeruginosa*.

Антибактериальный эффект белков значительно подавлялся в фосфатно-солевом буфере pH = 7,4 (PBS). Однако для всех исследуемых лизинов, за исключением хитиназоподобных лизоцимов GRC-EL03 и GRC-EL08, можно отметить высокую стабильность как в бессолевом буферном растворе Трис HCl, так и в PBS. Мурамидазы GRC-EL06, GRC-EL08 и GRC-EL14 проявляли максимальное антибактериальное действие при pH = 5,0. Активность остальных белков была выше в нейтральной и щелочной среде. Инкубация лизинов в диапазоне температур 40–50 °C в течение часа приводила к ингибированию антибактериального действия, за исключением GRC-EL03, GRC-EL06 и GRC-EL14.

Значительное снижение жизнеспособности клеточной культуры почки эмбриона человека HEK293 или кератиноцитов HaCaT и нарушение целостности формируемого ими монослоя отмечено только при воздействии ≥ 500 мкг/мл GRC-EL03 или GRC-EL14.

Полученные результаты подтверждают применимость разработанной панели литических белков в качестве основы для новых биотехнологических средств, показанных для терапии различных бактериальных инфекций, трудно поддающихся лечению антибиотиками.