

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 лизина 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*. Широкий спектр 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  $\geq 500$  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.