

Легоцкий Сергей Александрович



**ПОЛУЧЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ, СТАБИЛИЗАЦИЯ
РЕКОМБИНАНТНОГО ЭНДОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА S-394 И
РАЗРАБОТКА СПОСОБА ЭФФЕКТИВНОГО ЛИЗИСА
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ**

03.01.04 – биохимия

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор

Клячко Наталья Львовна,

доктор химических наук

Мирошников Константин Анатольевич

Официальные оппоненты:

Туницкая Вера Леонидовна

доктор химических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарта РАН, старший научный сотрудник

Варламов Валерий Петрович

доктор химических наук, профессор

Учреждение Российской академии наук Центр "Биоинженерия" РАН
заведующий лабораторией

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук

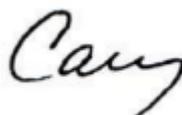
Защита диссертации состоится «___» _____ 2016 г. в 15 часов на заседании Совета Д 501.001.59 по защите докторских и кандидатских диссертаций по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.11, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайте www.chem.msu.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н.



Сакодынская И. К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время бактериальные инфекции являются проблемой здравоохранения мирового масштаба. Наиболее распространены случаи заболеваний, вызываемые грамотрицательными патогенными микроорганизмами, включая семейство *Enterobacteriaceae* (в основном родов *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* и *Proteus*) и виды *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*. В последние годы намечается тенденция возрастания доли таких инфекций по сравнению с инфекциями, вызываемыми грамположительными патогенами. Ситуацию осложняет стремительно развивающаяся устойчивость бактерий к антибиотикам.

Среди всех видов мультирезистентных бактерий выделяют группу из 6 возбудителей, которые вызывают большинство инфекционных заболеваний. Название этой группы – ESKAPE – аббревиатура, составленная из родов и видов соответствующих микроорганизмов: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.* 4 вида из 6 представленных относятся к грамотрицательным бактериям, среди которых 2 относятся к семейству *Enterobacteriaceae*. Смертность по причине заболеваний, вызванных энтеробактериями, находится на очень высоком уровне. Инфекционное поражение кровотока мультирезистентными энтеробактериями в среднем приводит к летальному исходу в 38 % случаев. Причем, неправильная терапия в первые 72 часа инфекции приводит к увеличению смертности до 60 %.

Существующий на данный момент спектр антибактериальных препаратов, представленных на рынке, позволяет лечить подавляющее большинство бактериальных инфекций. Вместе с тем в последние годы начинают появляться так называемые пан-резистентные штаммы микроорганизмов. Например, в 2010 году в Индии, Пакистане и Великобритании были обнаружены 107 изолятов энтеробактерий, устойчивых к большинству антибиотиков, в том числе штамм *Klebsiella pneumoniae*, устойчивый ко всем известным антимикробным препаратам.

Быстрое развитие устойчивости патогенных бактерий к существующим антибиотикам снижает привлекательность финансовых вложений крупных фармацевтических компаний в разработку новых противомикробных препаратов. Как следствие, многие фармацевтические компании в будущем связывают свои прибыли

со средствами терапии долгосрочных хронических заболеваний, а рост рынка антибиотиков замедляется. Так, за последние 10 лет агентством FDA (США) было одобрено к использованию 9 новых антибиотиков, из которых только 1 активен по отношению к грамотрицательным бактериям (цефтолозан). В качестве одной из мер, способных облегчить текущее положение дел, предлагается упростить процедуры регистрации новых антибиотиков, однако многие эксперты сходятся в том, что необходимо развивать новые стратегии защиты от патогенных бактерий.

В качестве одной из таких альтернатив рассматривается терапия бактериофагами и их цитолитическими ферментами, которые вырабатываются на завершающей стадии жизненного цикла бактериофагов для разрушения клеточной стенки бактерий. Цитолитические ферменты бактериофагов в литературе называются «лизинами», их субстратом является пептидогликан – компонент клеточной стенки бактерий. Подгруппа лизинов, разрушающих пептидогликан изнутри клетки, получила название «эндолизины». Эти ферменты перспективны для лечения инфекций различной этиологии, в том числе инфекций, вызванных мультирезистентными бактериями, а также в качестве антимикробной защиты продуктов питания, средств обработки различных поверхностей.

Основным ограничением использования эндолизинов, специфичных к грамотрицательным организмам, является низкая эффективность их действия при применении снаружи, так как пептидогликан грамотрицательных бактерий покрыт дополнительной мембраной, препятствующей проникновению лизина к своему субстрату. Кроме того, чистые препараты ферментов имеют весьма умеренную стабильность при хранении, что ограничивает их практическое использование.

Цели и задачи исследования

Цель настоящей работы – получить стабильный препарат эндолизина бактериофага S-394 и разработать способ его доставки через внешнюю мембрану *E. coli* к пептидогликану. Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

- создание штамма-продуцента рекомбинантного эндолизина бактериофага S-394;
- изучение физико-химических свойств Lys394;

- подбор агентов, разупорядочивающих внешнюю мембрану *E. coli*, и изучение лизиса жизнеспособных клеток *E. coli* под действием Lys394 совместно с такими агентами;
- исследование кинетических характеристик инактивации Lys394;
- выбор агентов из соединений разных классов, стабилизирующих Lys394.

Научная новизна

В работе впервые описан эндолизин бактериофага S-394, получивший название Lys394. Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего Lys394, и аминокислотная последовательность самого фермента аннотированы в базу данных GenBank под номером KC295451.1.

Разработан метод синтеза активного рекомбинантного фермента в клетках *E. coli*, изучено влияние физико-химических свойств среды на его каталитическую активность. Показана широкая специфичность Lys394 к пептидогликанам грамотрицательных бактерий.

Впервые показана литическая активность Lys394 по отношению к интактным клеткам *E. coli* в присутствии агентов, модулирующих проницаемость внешней мембраны.

Для Lys394 показан мономолекулярный механизм термоинактивации. Предложен способ стабилизации, позволяющий сохранить 90% ферментативной активности после инкубации препарата Lys394 при 20 °С в течение 4 месяцев.

Практическая значимость

Полученные в работе стабильные препараты Lys394 могут быть использованы совместно с агентами, увеличивающими проницаемость внешней мембраны, для разработки методов контроля патогенных грамотрицательных видов бактерий. В том числе с (мульти)резистентностью по отношению к традиционным антибиотикам.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих международных и российских конференциях: «Evergreen International Phage Meeting» (2013, Олимпия, США), «Biocatalysis: Fundamentals & Applications» (2013, Москва), «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology

and Ecology Issues» (2013 и 2015, Ираклион, Греция), «Перспективные направления современной физико-химической биологии и биотехнологии» (2013, Москва), «VIII Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития"» (Москва, 2015).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 работ: из них 3 статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых журналов ВАК РФ, 2 зарегистрированных патента РФ на изобретение и 6 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (три главы), описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения (четыре главы), выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 151 странице машинописного текста, содержит 43 рисунка, 9 таблиц и 222 ссылки.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ последовательности аминокислот пептидогликангидролазы бактериофага S-394

Вирулентный бактериофаг S-394 был выделен из промышленных сточных вод и описан группой сотрудников ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» под руководством В.Г. Пугачева. Бактериофаг S-394 обладает поливалентной литической активностью по отношению к бактериям родов *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*. С помощью частичного секвенирования генома фага S-394 был выявлен ген длиной 414 п.о., кодирующий фермент длиной 137 остатков аминокислот (Lys394), катализирующий гидролиз бактериального пептидогликана. Последовательность гена депонирована в базу данных GenBank под идентификатором KC295451.1.

Анализ первичной аминокислотной последовательности показал, что Lys394 содержит единственный каталитический домен Peptidase_M15_4, характерный для металлозависимых пептидаз семейства M15. Ферменты, содержащие этот домен, относятся как к *D-Ala-D-Ala*-карбоксипептидазам, так и к *L-Ala-D-Glu*-эндопептидазам. Ближайшие гомологи Lys394, выявленные с помощью PSI-BLAST, включают такие ферменты, как: *L*-аланил-*D*-глутамат пептидазу бактериофага T5 (E-value 4×10^{-93} , степень гомологии 97%), лизоцим бактериофага EPS7 (E-value 2×10^{-50} , степень гомологии 98%), лизоцим бактериофага bV_EcoS_AKFV33 (E-value 1×10^{-92} , степень гомологии 96%), лизоцим бактериофага phiR201 (E-value 6×10^{-84} , степень гомологии 86%), лизоцим бактериофага SPC35 (E-value 6×10^{-57} , степень гомологии 64%). Белки с меньшей степенью гомологии (< 45 %) относятся к бактериальным и фаговым пептидазам либо к ферментам, активность которых неохарактеризована. Присутствие ферментов бактериального происхождения среди гомологов Lys394 вероятно указывает на наличие профагов в геномах соответствующих микроорганизмов.

На рисунке 1 показаны множественно выравненные последовательности белков разной степени гомологии, обнаруженных с помощью PSI-BLAST. Среди остатков, консервативных для всех приведенных последовательностей, можно выделить четыре остатка (His66, Asp73, Asp130 и His133; на рисунке отмечены черным цветом),

которые отвечают за связывание иона металла в активном центре и типичны для всех металлопептидаз семейства M15.

S-394	---	MSFKFGK	NSEKQLATVK	PELQKVARRA	LELSPYDFTI	37
EPS7	-----					
T5	---	MSFKFGK	NSEKQLATVK	PELQKVARRA	LELSPYDFTI	37
SPC35	---	MSFKFSQ	RSLDRLKGVH	PDLVRVTHRA	LELSPYDFTI	37
RB43	----	MFKLAK	KSINNLLKGVK	PELVKVVQRA	LELSPEDFGV	36
ST64T		MQTNKFKFSQ	RSEKNLNGVN	PDLVKVIRRA	LEITPVDFIV	40
H. influenza	--	MSKFKLSA	ASEEKLVGVB	ADLVKVVHRA	IELSVVDFKV	38
S-394		VQGIRTVAQS	AQNIANGTSF	LKDPSKSKHV	TGDAIDFAPY	77
EPS7	-----			MKDPSKSKHV	TGDAIDFAPY	20
T5		VQGIRTVAQS	AQNIANGTSF	LKDPSKSKHI	TGDAIDFAPY	77
SPC35		TEGLRSLEQS	AKNIANGTSF	LKDPSKSKHV	QGRAVDFAPL	77
RB43		REGLRTVEQQ	REYVRTGA--	-SQTMNSKHI	TGDAVDLYPS	73
ST64T		IEGVRTQARQ	KDMVATGK--	-SQTMNSRHL	SGNAVDIIP-	76
H. influenza		IEGKRTLREQ	KELFAKKA--	-TKTMNSRHL	TGHAVDLVP-	74
S-394		INGKIDWK-D	LEAFWAVKKA	FEQAGKELGI	KLRFADWNS	116
EPS7		INGKIDWK-D	LEAFWAVKKA	FEQAGKELGV	KLRFADWNS	59
T5		INGKIDWN-D	LEAFWAVKKA	FEQAGKELGI	KLRFADWNA	116
SPC35		KDGKIDWN-D	LESFKLVADA	FFKAAEELGV	KIRWGGDWNQ	116
RB43		-KLPEGWQKN	PKVWLPVNA	MKKAGDELGV	KLRFGINWKN	112
ST64T		--VNTTWK--	IEEFKPLLKA	VKQAADEQGM	KLRFGINWKH	112
H. influenza		--LPVWNW-D	REPFKNVASA	MFQAAKQLGV	AIRWGGDWNM	111
S-394		SGDYHDEIDR	GTYDGGHVEL	V-----		137
EPS7		SGDYHDEIDR	GTYDGGHVEL	V-----		80
T5		SGDYHDEIKR	GTYDGGHVEL	V-----		137
SPC35		NGSYKDEIQR	GTFDGPHEIL	V-----		137
RB43		--DPNLPIET	KFIDAPHIEL	A-----		131
ST64T		--DPSLPIET	KFIDAPHVEI	PA-----		132
H. influenza		--NESS-NDE	RFYDGPHEIL	LRSVYP		134

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей эндолизинов бактериофагов S-394, EPS7, T5, SPC35, RB43, ST64T и пептидазы бактерии *Haemophilus influenza*. Выравнивание осуществлено с помощью программы CLUSTALW2. Аминокислоты, совпадающие во всех последовательностях, отмечены серым. Консервативные аминокислоты, участвующие в связывании иона металла, показаны черным.

Наиболее близкий из приведенных гомологов – лизоцим бактериофага EPS7 – выделяется среди остальных ферментов отсутствием 57 аминокислот с N-конца последовательности (по сравнению с последовательностью Lys394). Отсутствие N-концевого фрагмента обусловлено однонуклеотидной вставкой в соответствующей позиции гена лизоцима фага EPS7, а высокая степень гомологии эндолизина фага EPS7 и Lys394 рассчитана на основе фрагмента 58 – 114 а.о. (нумерация по Lys394).

Роль *N*-концевого фрагмента остается неясной, так как эндолизин бактериофага EPS7 не был выделен и охарактеризован экспериментально.

Проведенный анализ позволяет утверждать, что Lys394 относится к классу пептидаз и катализирует гидролиз одной из связей в пептидной части пептидогликана.

2. Клонирование гена пептидогликангидролазы бактериофага S-394

Для изучения свойств Lys394 необходимо было получить плазмиду с геном фермента и высокоэффективный штамм-продуцент рекомбинантного фермента. Ген, кодирующий Lys394, был клонирован в двух вариантах: полноразмерный – по типу эндолизина бактериофага T5 и укороченный – по типу эндолизина бактериофага EPS7.

Клонирование проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием очищенного препарата бактериофага S-394 в качестве матрицы и следующих праймеров:

Lys394-full-forw: 5'-ataggatccagttttaaatggtaaaaata-3'

Lys394-trunc-forw: 5'-ataggatccagtaaagaccctagcaaaaagt-3'

Lys394-rev: 5'-ataaagcttagactaattctacgtgaccac-3'.

В названиях праймеров "forw" означает прямой праймер, "rev" – обратный праймер, "full" – праймер для клонирования полноразмерного варианта гена, "trunc" – праймер для клонирования укороченного варианта гена. Подчеркиванием выделены сайты рестрикции, использованные для клонирования: *Bam*HI и *Hind*III.

Оптимизацию условий ПЦР проводили, варьируя температуру отжига праймеров и количество ДНК-матрицы. Максимальный выход целевых ампликонов при отсутствии побочных продуктов реакции наблюдался при температурах отжига 49 °С в случае пары праймеров Lys394-full-forw и Lys394-rev и 53 °С в случае пары праймеров Lys394-trunc-forw и Lys394-rev, оптимальная концентрация фаговых частиц в реакционной смеси составила 1000 БОЕ/мл. Электрофорез в агарозном геле показал, что в результате ПЦР были получены фрагменты ДНК длиной около 400 и 240 п.о., что соответствует размерам полноразмерного и укороченного вариантов генов белка-предшественника.

Для клонирования обоих ампликонов использовали вектор на основе плазмиды РЕЕЗ, созданной и любезно предоставленной М.М. Шнейдером – сотрудником

лаборатории Белковой Инженерии ИБХ РАН. Плазмида рЕЕЗ была синтезирована на основе рЕТ23. Отличие двух векторов заключается в наличии у рЕЕЗ участка, добавленного к 5'-концу полилинкера, кодирующего последовательность из шести остатков гистидина, а также сайт гидролиза высокоспецифичной TEV протеазой. Использование этого вектора для клонирования позволяет синтезировать целевой рекомбинантный белок с гистидиновой меткой, которую в случае необходимости можно отщепить с помощью TEV протеазы.

После трансформации клеток *E. coli* NovaBlue продуктами лигирования было отобрано по 5 клонов, из которых впоследствии выделены плазмиды. Все они были отсекуены для определения наличия нужных вставок и отсутствия в них ошибок.

3. Получение рекомбинантного Lys394 в клетках *E. coli*

Получив два варианта плазмид, несущих укороченный и полноразмерный гены фермента Lys394, мы перешли к оптимизации процедуры выделения и очистки белков. На первом этапе мы выбирали наилучший продуцент среди лизогенных штаммов *E. coli*: B834(De3), C41(De3) и C42(De3). Предварительно экспрессию укороченной и полноразмерной версий Lys394 мы проводили в следующих условиях: температура 37 °С, богатая среда 2xTY, индукцию экспрессии осуществляли добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ при значении OD₆₀₀ культуры клеток продуцентов 0,6, время инкубации культуры клеток после добавления индуктора составляло 3 часа. В этих условиях синтез укороченного и полноразмерного вариантов Lys394 не наблюдался в штамме B834(De3); полноразмерный Lys394 синтезировался в штамме C41(De3) в количестве не более 40 мг растворимого фермента с литра культуральной среды, укороченный – не более 20 мг с литра культуры. В штамме C43(De3) удалось получить не более 5 мг фермента в обоих вариантах (Рис. 2).

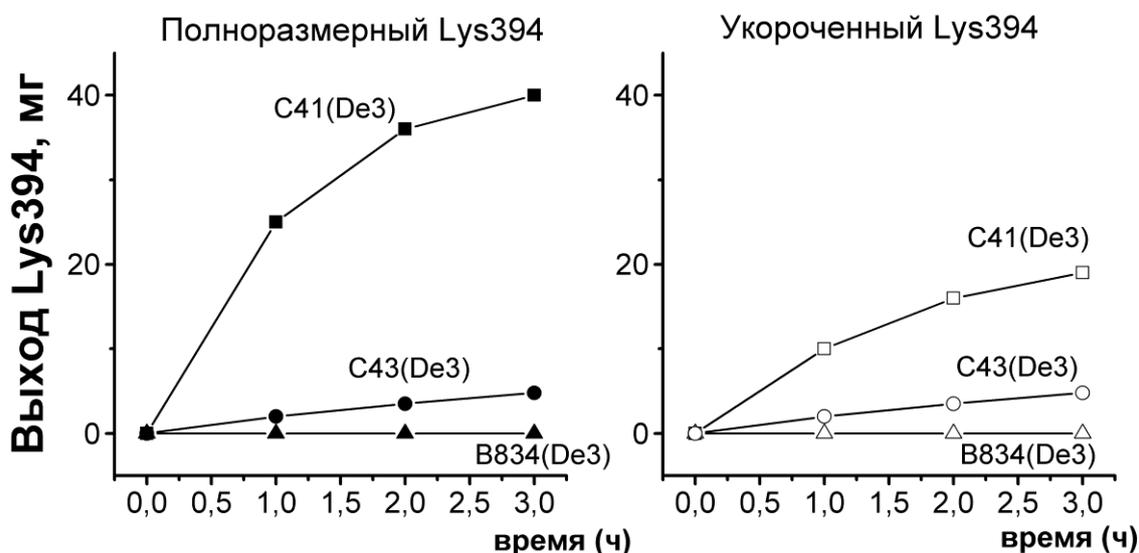


Рис. 2. Выход полноразмерного (слева) и укороченного (справа) Lys394 в растворимом виде при их синтезе в *E. coli* штаммов C41(De3) (■), C43(De3) (●) и B834(De3) (▲). Синтез индуцировали добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ при достижении OD₆₀₀ бактериальной культуры значения 0,6. Синтез проводили при 37 °С в среде 2хТУ.

Из полученных данных можно заключить, что наиболее оптимальным из протестированных штаммов является штамм *E. coli* C41(De3). Также можно заметить, что по истечении трех часов после добавления ИПТГ скорость синтеза полноразмерного и укороченного вариантов Lys394 заметно падает. Поэтому дальнейшие эксперименты по оптимизации условий получения Lys394 проводили в штамме *E. coli* C41(De3) в течение 3х часов после добавления индуктора.

На следующем этапе мы исследовали влияние концентрации индуктора и температуру экспрессии на выход растворимого Lys394 в укороченном и полноразмерном вариантах. Результаты эксперимента представлены на диаграмме ниже (Рис. 3).

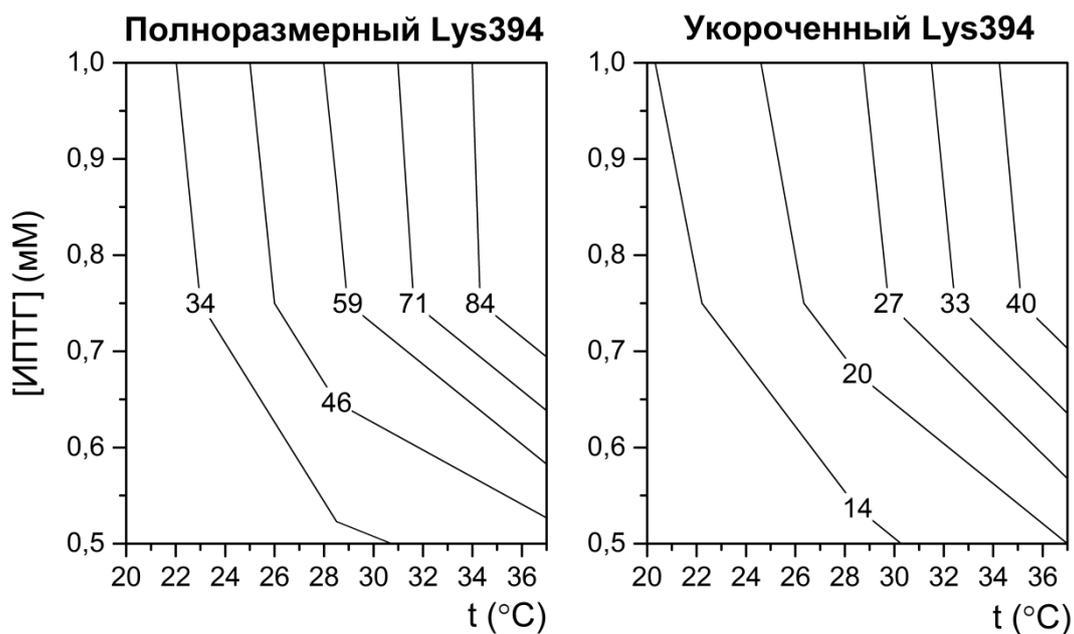


Рис. 3. Выход полноразмерного и укороченного вариантов Lys394 в зависимости от температуры культивирования и концентрации ИПТГ. Условия синтеза: штамм *E. coli* C41(De3), питательная среда 2xTY, индукция экспрессии при плотности клеток $OD_{600} = 0,6$, продолжительность культивирования после добавления индуктора – 3 ч.

4. Очистка рекомбинантного Lys394

Очистку полноразмерного и укороченного вариантов Lys394 проводили по стандартной методике очистки рекомбинантных белков, имеющих гексагистидиновую последовательность. Суть метода заключается в фракционировании растворимой части клеточного экстракта с помощью Ni^{2+} -аффинной хроматографии. Элюцию осуществляли ступенчатым градиентом имидазола.

Экспериментально подобранная концентрация имидазола, обеспечивающая наилучшее разделение целевого белка от белков, связывающихся с носителем неспецифично, составляет 70 мМ. При такой концентрации имидазола неспецифично удерживающиеся белки удалялись из колонки, а Lys394 удерживался на носителе и элюировался впоследствии при промывке колонки буферным раствором, содержащим 200 мМ имидазола.

Используя описанный протокол очистки, удавалось получать гомогенные препараты полноразмерного и укороченного Lys394 по данным белкового электрофореза при окрашивании гелей с помощью кумасси (Рис. 4).

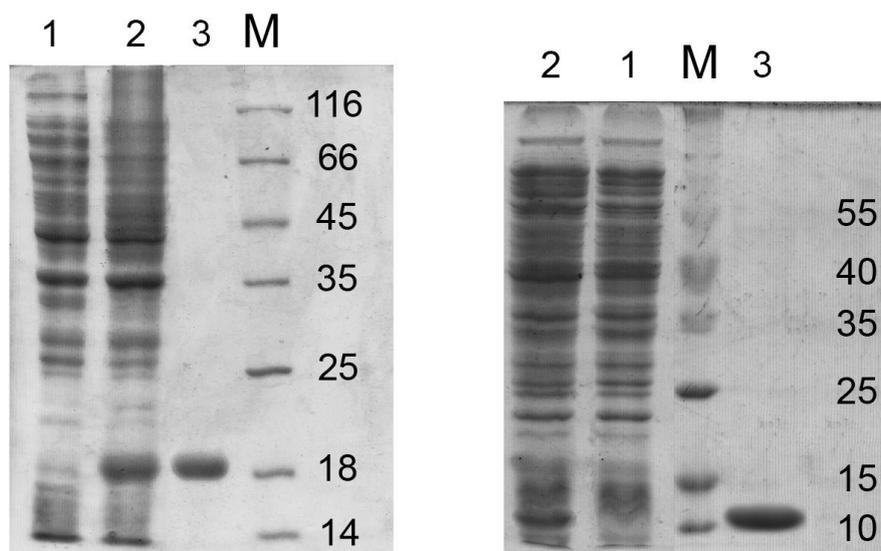


Рис. 4. Электрофореграммы препаратов полноразмерного (слева) и укороченного (справа) Lys394. Дорожки: 1 – белковый профиль *E. coli* до добавления индуктора, 2 – то же спустя 3 часа после добавления индуктора, 3 – очищенная фракция Lys394, М – маркеры молекулярной массы, молекулярная масса полос маркеров указана в кДа.

5. Физико-химические свойства рекомбинантного Lys394

Ферментативная активность полноразмерного и укороченного Lys394.

Деградация пептидогликана под действием эндолизинов бактериофагов вызывает лизис бактериальной клетки. Количественно скорость лизиса оценивают фотометрически по просветлению суспензии бактериальных клеток. В данной работе расчет ферментативной активности производили по тангенсу угла наклона линейного участка зависимости оптической плотности от времени. Начало и конец линейного участка зависимости оптической плотности от времени определяли программно таким образом, чтобы максимизировать параметр R^2 .

Зависимость ферментативной активности от концентрации фермента для полноразмерного Lys394 имеет вид кривой с насыщением (Рис. 5 слева). Из графика видно, что скорость гидролиза пептидогликана является лимитирующим процессом лизиса клеток в суспензии при концентрациях фермента от 0 до 0,5 мг/мл в реакционной смеси, так как зависимость активности от концентрации линейна. При более высоких значениях концентрации фермента линейность нарушается, что,

вероятно, указывает на смену лимитирующей стадии в пользу физического распада компонентов клетки.

В идентичных условиях укороченный вариант Lys394 не проявляет активности вовсе (Рис. 5 справа), что указывает на необходимость первых 56 аминокислот для полноценного функционирования эндолизина фага S-394. Причина отсутствия этого участка у эндолизина бактериофага EPS7 остается невыясненной, так как этот фермент не был выделен и охарактеризован.

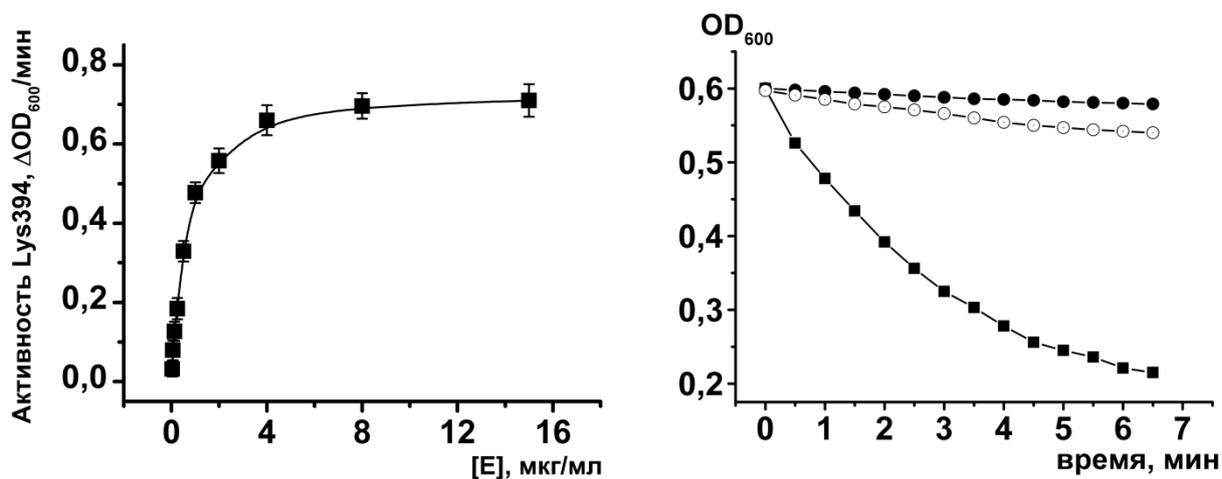


Рис. 5. Слева: зависимость активности полноразмерного Lys394 от концентрации фермента в реакционной смеси. Начальное значение OD₆₀₀ суспензии бактериальных клеток составляла 0,6 единиц. Каждое значение активности на графике соответствует среднему значению по итогам трех измерений ± стандартное отклонение. Справа: лизис суспензии *E. coli* CR63, обработанных хлороформом, под действием 0,15 мкг/мл полноразмерного Lys394 (■), 2 мкг/мл лизоцима куриных яиц (○) и 0,15 мкг/мл укороченного Lys394 (●). Реакцию проводили в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис/HCl (pH 8,5) при 25 °С.

Отщепление гексагистидиновой последовательности под действием TEV-протеазы не приводит к изменению активности полноразмерного варианта Lys394, поэтому здесь и далее все экспериментальные данные приведены для полноразмерного фермента с неотщепленным 6×His фрагментом.

Lys394 проявляет активность в щелочной области pH с максимумом при pH 8,5 (Рис. 6 слева). Это значение превышает pH оптимум для большинства охарактеризованных пептидогликангидролаз бактериофагов и соответствует таковому для близкого гомолога Lys 394 – *L*-аланил-*D*-глутамат пептидазы

бактериофага T5, а также для эндолизина бактериофага SPZ7, специфичного по отношению к энтеробактериям.

На лизис клеток под действием исследуемого фермента заметное влияние оказывает значение ионной силы в реакционной смеси. С увеличением концентрации NaCl в растворе активность Lys394 падает – подобная тенденция характерна для многих эндолизинов бактериофагов (Рис. 6 справа). Этот эффект может быть объяснен как влиянием соли непосредственно на глобулу фермента, так и ухудшением последующей деградации бактериальных клеток под действием понижения осмотического давления, по скорости которой определяется активность фермента.

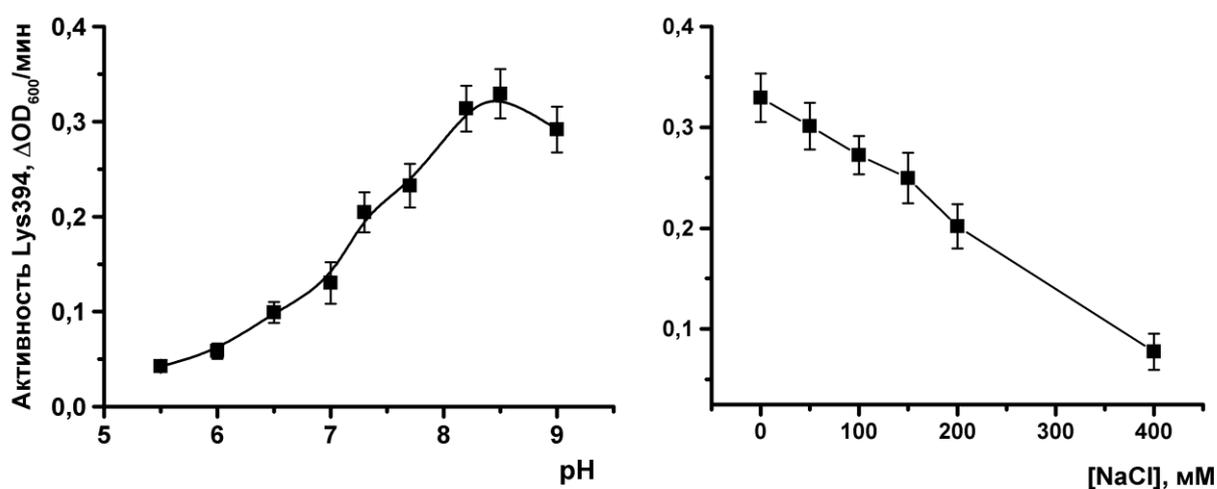


Рис. 6. Слева: Влияние pH на активность Lys394. Реакция проводилась в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис/HCl, 20 мМ Na₂HPO₄ и 20 мМ цитрата натрия, при 25 °С. Концентрация Lys394 составляла 0,5 мкг/мл в реакционной смеси. Субстрат – *E. coli* CR63, предобработанные хлороформом. Справа: зависимость ферментативной активности Lys394 от концентрации NaCl. Активность измеряли в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис/HCl (pH 8,5) при 25 °С. Концентрация Lys394 составляла 0,5 мкг/мл в реакционной смеси. Все величины являются средними трех измерений ± стандартное отклонение.

Исходя из анализа последовательности аминокислот, Lys394 является металл-зависимой пептидазой. Наличие катиона металла было показано экспериментально. Ферментативный лизис клеток *E. coli*, предобработанных хлороформом, полностью ингибируется введением в реакционную смесь ЭДТА до концентрации 0,1 мМ. Этот

эффект обратим: последующее введение хлоридов кальция или марганца восстанавливает активность фермента до первоначального уровня. Ингибирующее действие ЭДТА наряду с наличием консервативных остатков гистидина и аспарагиновой кислоты в аминокислотной последовательности Lys394, координирующих катион металла (His66, Asp73, Asp130 и His133), позволяет отнести исследуемый фермент к классу металлоэндопептидаз (EC 3.4.24.-). Окончательно об этом можно будет утверждать после экспериментального определения связи, гидролизуемой в пептидогликане под действием Lys394.

Субъединичная организация Lys394. С помощью гель-проникающей хроматографии было показано, что Lys394 в растворе находится в виде мономера и не образует мультимерных комплексов. Это характерно для всех описанных эндолизинов, специфичных к грамотрицательным микроорганизмам.

Спектр гидролизуемых микроорганизмов. Эффективность действия Lys394 была протестирована на 9 грамотрицательных и 3 грамположительных видах бактерий. Для эксперимента клетки грамотрицательных бактерий были предобработаны хлороформом. Все бактерии грамотрицательных видов приблизительно в равной степени подвергаются лизису под действием Lys394. Такая широкая специфичность характерна для эндолизинов, специфичных к грамотрицательным бактериям, по причине того, что пептидогликан всех грамотрицательных бактерий относится к хемотипу A1 γ и менее вариативен от вида к виду, чем в случае грамположительных бактерий. В случае грамположительных бактерий уменьшение мутности суспензии клеток было сравнимо с фоновым лизисом клеток под действием компонентов буферного раствора даже в условиях повышенной концентрации фермента.

6. Применение рекомбинантного Lys394 снаружи клеток

Увеличение проницаемости внешней мембраны *E. coli*. Использование эндолизинов для контроля грамотрицательной микрофлоры существенно затруднено, так как внешняя мембрана грамотрицательных бактерий препятствует доступу фермента извне к своему субстрату – пептидогликану. Поэтому одной из задач текущей работы стало увеличение проницаемости внешней мембраны *E. coli* достаточное для применения Lys394 снаружи клеток.

Основным фактором устойчивости внешней мембраны грамотрицательных клеток являются комплексы липополисахаридов с бивалентными катионами. Удаление или замещение катионов из таких комплексов, согласно многочисленным литературным данным, приводит к дестабилизации внешней мембраны и увеличению восприимчивости клеток бактерий к действию гидрофобных антибиотиков и небольших ферментов. В качестве вспомогательных веществ, способных сделать внешнюю мембрану проницаемой для фермента, были выбраны полилизины и полиаргинины различной длины, сополимеры ПЭГ-полилизин, протамин из молок лосося и антибактериальные пептиды PGLa и магаинин, входящие в состав слизистых оболочек гладкой шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*). Выбор агентов осуществляли по имеющейся в литературных источниках информации, прямо или косвенно указывающей на их способность сделать внешнюю мембрану проницаемой для фермента относительно небольшого размера, а также их коммерческая доступность. Выбор катионных пептидов дополнительно обусловлен тем, что ранее нами было показано увеличение литической активности эндолизина бактериофага SPZ7 в присутствии колистина на клетки *E. coli*. Изменение проницаемости внешней мембраны *E. coli* под действием выбранных агентов регистрировали спекрофотометрически по высвобождению во внешнюю среду бактериальных β -лактамаз, в норме находящихся в периплазматическом пространстве.

Максимальное высвобождение β -лактамазы из периплазмы *E. coli* наблюдалось при использовании поли-L-аргинина с распределением молекулярной массы полимера от 5 до 15 кДа и катионного пептида PGLa. Как видно из приведенных данных, в обоих случаях доля β -лактамазы в межклеточном пространстве возрастает с увеличением концентрации агента в реакционной смеси в области концентраций от 2 до 25 мкг/мл в случае полиаргинина и до 20 мкг/мл в случае PGLa. При максимальных концентрациях эффекторов из указанных диапазонов доля β -лактамазы, перешедшей во внешнюю среду, составляет 70 % и остается неизменной с увеличением концентрации эффекторов в реакционной среде (Рис. 7).

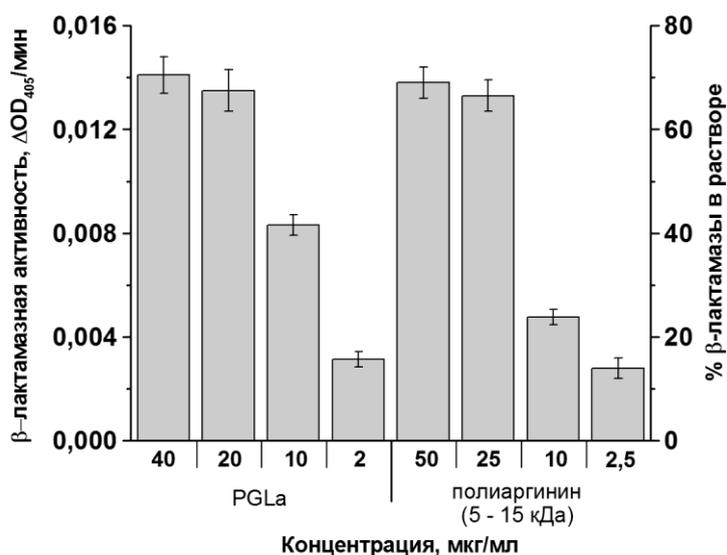


Рис. 7. Переход β-лактамазы из периплазмы интактных клеток *E. coli* CR63 наружу под действием поли-L-аргинина (5–15 кДа) и пептида PGLa. β-лактамазную активность в растворе регистрировали спектрофотометрически с помощью хромогенного субстрата широкой специфичности CENTA. На левой оси отложены значения β-лактамазной активности. Каждое из измеренных значений отнесено к доле β-лактамазы в растворе. Значению 100% соответствует β-лактамазная активность в растворе после полного разрушения клеток *E. coli* ультразвуком. Указанные значения соответствуют среднему ± стандартное отклонение.

Лизис интактных клеток *E. coli* под действием Lys394 в присутствии агентов, разупорядочивающих внешнюю мембрану. На следующем этапе работы мы исследовали влияние наилучших по итогам предыдущего эксперимента вспомогательных веществ (поли-L-аргинин фракции 5–15 кДа и пептид PGLa) на лизис интактных клеток *E. coli* под действием эндолизина Lys394. Эксперимент проводили в двух режимах: лизис планктонных клеток и лизис газонных клеток *E. coli*.

Для лизиса планктонных клеток вспомогательные вещества применялись в концентрациях, при которых наблюдался дозозависимый эффект высвобождения β-лактамазы в предыдущем эксперименте. Концентрация фермента в реакционной смеси составляла 0,25 мкг/мл, что соответствует началу линейного участка зависимости активности Lys394 от концентрации (Рис. 5). Полученные данные показывают, что наличие в реакционной смеси PGLa и поли-L-аргинина (5–15 кДа) в

присутствии Lys394 вызывает быстрый лизис интактных клеток *E. coli*. Также, из рисунков 7 и 8 видно, что увеличение скорости лизиса клеток происходит в том же диапазоне концентраций PGLa и полиаргинина, что и рост доли β -лактамазы во внешней среде. Достигнутая максимальная скорость лизиса интактных клеток *E. coli* в этом эксперименте составляет примерно 50% от скорости лизиса клеток, обработанных хлороформом, в аналогичных условиях, но без вспомогательных агентов, увеличивающих проницаемость внешней мембраны.

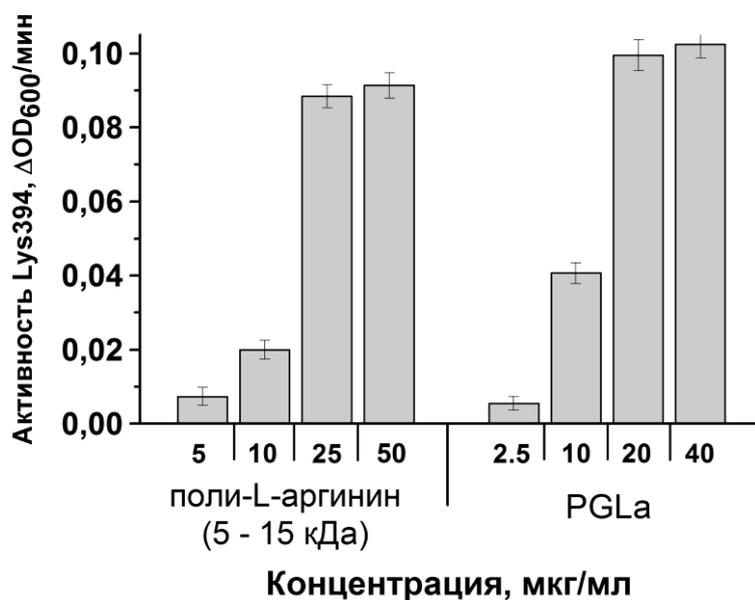


Рис. 8. Лизис интактных клеток *E. coli* CR63 под действием Lys394 в присутствии поли-L-аргинина (5–15 кДа) и PGLa. Реакция проводилась в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис-НСl (рН 8,5). Концентрация фермента составляла 0,25 мкг/мл. Указанные значения соответствуют среднему \pm стандартное отклонение.

Основным недостатком использования поликатионов в качестве аддитивов к пептидогликангидролазам является их токсичность по отношению к эукариотическим клеткам. Однако в случае олигопептидов показано, что токсичность пептидов не коррелирует с их антибактериальной активностью. Вследствие этого применение эндוליзинов в смеси с антибактериальными пептидами или в виде ковалентной сшивки фермент–пептид обладает высоким потенциалом в сфере контроля патогенной микрофлоры.

Во многих случаях патогенная микрофлора развивается на различных поверхностях, например, при инфекциях кожи, слизистых, а также при заражении

помещений, рабочих поверхностей, инструментов. Поэтому наряду с тестированием совместного действия Lys394 с PGLa и полиаргинином по отношению к планктонным клеткам, мы исследовали эффективность лизиса разреженного газона клеток *E. coli*.

Полиаргинин (5–15 кДа) в роли вспомогательного вещества при лизисе газонных клеток оказался непригоден, так как при пониженных концентрациях его наличие не вызывало падений титра клеток при совместном действии с Lys394, а при концентрациях выше 100 мкг/мл происходило соосаждение полиаргинина и фермента. Использование PGLa в той же концентрации и той же дозы фермента, при которых наблюдался лизис бактериальной суспензии, снижения титра газонных клеток практически не происходило (Таблица 1). Глубокий лизис культуры газонных клеток удалось достичь введением в систему ЭДТА. Присутствие 1 мМ ЭДТА в смеси с 0,05 мкг/мл PGLa и Lys394 приводит к гибели более 99,99% газонных клеток *E. coli* в течение 30 минут. Такой эффект не согласуется с тем, что активность Lys394 ингибируется под действием ЭДТА. С другой стороны, полученные данные свидетельствуют о положительном эффекте ЭДТА с высокой степенью статистической достоверности. Мы полагаем, что ферментативный лизис газонных клеток *E. coli* протекает в такой системе с высокой эффективностью по причине того, что, во-первых, действие ЭДТА обратимо, и, во-вторых, в зоне реакции остаются нехелатированными достаточное количество ионов Ca^{2+} , необходимых для функционирования Lys394. Для проверки этого заключения мы провели ту же реакцию при более высоких концентрациях ЭДТА (5 и 10 мМ), не изменяя концентрации остальных действующих компонентов. Из таблицы 1 видно, что при концентрации ЭДТА 5 мМ происходит резкое уменьшение глубины лизиса клеток. Вместе с тем падение титра клеток в присутствии Lys394 приходит в соответствие со значениями в контроле. То есть, фермент полностью теряет активность, а литическое действие осуществляют вспомогательные компоненты реакции – ЭДТА и PGLa.

Таким образом, применение Lys394 совместно с антимикробным пептидом PGLa и ЭДТА может стать эффективным методом контроля широкого спектра грамотрицательных бактерий. Вместе с тем, полученные данные свидетельствуют о том, что характер лизиса планктонных и газонных клеток значительным образом отличаются, поэтому при тестировании препаратов для поверхностного применения необходимо использовать релевантную модель.

Таблица 1. Литическая активность смесей, содержащих Lys394, PGLa и ЭДТА в различных соотношениях, в отношении газона *E. coli*. Антибактериальная активность выражена в $\log_{10}(N_0/N_i)$, N_0 – количество жизнеспособных клеток в контроле, N_i – количество жизнеспособных клеток после обработки одной из комбинаций Lys394/PGLa/ЭДТА. Представленные значения являются средним арифметическим трех измерений \pm стандартное отклонение.

Доза Lys394 (мкг)	Концентрация PGLa, мг/мл		
	0	0,02	0,05
0 мМ ЭДТА			
0	0	0,09 \pm 0,04	0,12 \pm 0,05
10	0,07 \pm 0,04	0,11 \pm 0,06	0,16 \pm 0,05
25	0,10 \pm 0,05	0,12 \pm 0,05	0,16 \pm 0,05
1 мМ ЭДТА			
0	0,07 \pm 0,03	0,19 \pm 0,04	0,75 \pm 0,08
10	0,38 \pm 0,11	0,56 \pm 0,09	2,79 \pm 0,21
25	0,49 \pm 0,11	1,84 \pm 0,25	4,08 \pm 0,25
5 мМ ЭДТА			
0	0,51 \pm 0,14	0,56 \pm 0,12	0,75 \pm 0,08
10	0,55 \pm 0,14	0,58 \pm 0,16	0,69 \pm 0,21
25	0,57 \pm 0,14	0,59 \pm 0,21	0,77 \pm 0,18

7. Термостабильность и стабилизация Lys394

Кинетика термоинактивации Lys394. Термостабильность Lys394 была исследована в диапазоне температур 20–50 °С. В данных условиях термоинактивация протекала необратимо и подчинялась кинетике реакции первого порядка (Рис. 9). Параметры инактивации не зависели от концентрации фермента. Из этих данных следует, что термоинактивация Lys394 – это мономолекулярный процесс, основной причиной которого является денатурация белковой глобулы.

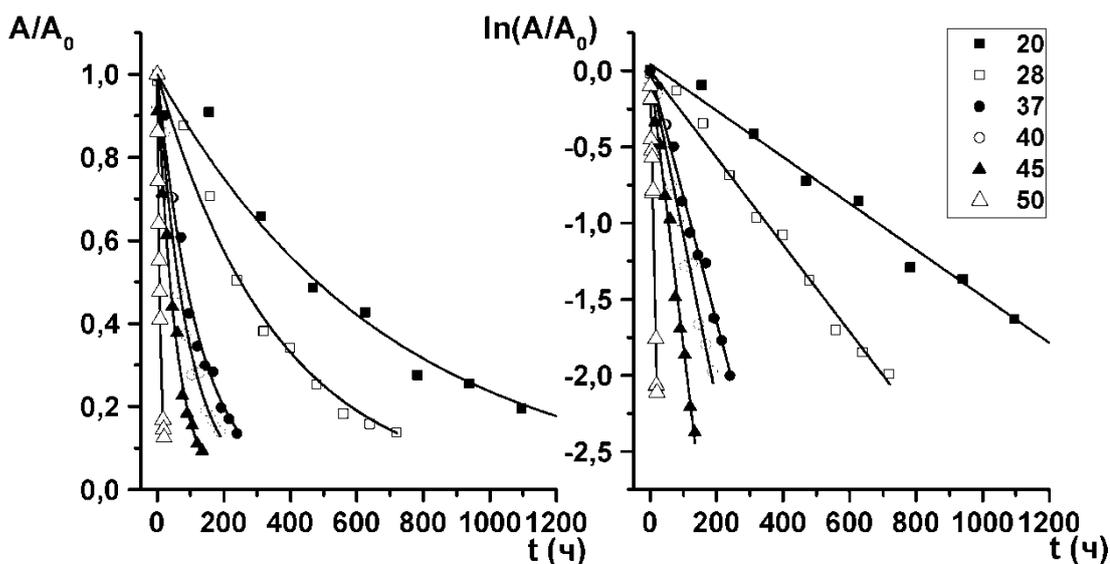


Рис.9. Зависимости остаточной активности Lys394 от времени при разных температурах. 20 мМ трис-НСl, 200 мМ NaCl, рН 8,0.

Разработка стратегии стабилизации Lys394. Срок хранения коммерческих белковых препаратов, достаточный для извлечения прибыли, должен составлять минимум 18 месяцев. Период полуинактивации препарата Lys394 в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис-НСl и 200 мМ NaCl, составляет 20 суток при 20 °С. Поэтому при разработке стратегии стабилизации Lys394 нашей конечной целью было подобрать такие условия, при которых время полуинактивации Lys394 при 20 °С увеличилось бы минимум до 18 месяцев. В исследуемом диапазоне температур закономерности термоинактивации неизменны (необратимость, первый порядок реакции, независимость от концентрации фермента). Поэтому для удобства мы тестировали действие стабилизирующих факторов при 37 °С, а затем проверяли при 20 °С.

Исходя из того, что основной причиной термоинактивации Lys394 является денатурация белковой глобулы, мы выбирали такие подходы к стабилизации фермента, которые в первую очередь предотвращают потерю нативной конформации белковой глобулы. Основной вклад в поддержание нативной структуры белков вносят гидрофобные взаимодействия и в меньшей степени – остальные. Поэтому для стабилизации Lys394 мы использовали подходы, способные усилить внутримолекулярные гидрофобные взаимодействия, а именно: установление оптимального для стабильности значения ионной силы, а также использование

полиолов в качестве стабилизирующих добавок. Также широко известным методом подавления денатурации является использование полиэлектролитов, которые за счет многоточечного притяжения к заряженным группам на поверхности фермента могут предотвращать разворачивание белка и потерю ферментативной активности. С учетом того, что изоэлектрическая точка Lys394 близка к 7, то при pH 8,5 для этой цели уместно использовать поликатионы. Наблюдаемая денатурация также может быть вызвана диссоциацией иона металла из центра связывания. Поэтому для увеличения стабильности Lys394 решались следующие задачи: подбор оптимального для стабильности солевого состава, исследование влияния полиолов и поликатионов на стабильность Lys394 и подбор оптимального сочетания эффекторов.

Влияние ионной силы и солевого состава буферного раствора на стабильность фермента Lys394. Ионная сила и солевой состав буфера – важные параметры, влияющие на стабильность ферментов. При низких значениях ионной силы происходит ослабление гидрофобных взаимодействий, при высоких значениях – ослабление электростатических взаимодействий. В подтверждение этому полученная зависимость константы инактивации первого порядка от концентрации NaCl имеет вид кривой с минимумом (Рис. 10). Минимум константы инактивации приходится на диапазон концентраций NaCl от 150 до 300 мМ. Для последующих экспериментов мы использовали препарат Lys394, содержащий 150 мМ NaCl. Выбор минимальной концентрации NaCl из диапазона оптимальных значений обусловлен тем, что в последующих экспериментах мы планировали использовать поликатионы в качестве стабилизирующих добавок. Электростатическое связывание поликатиона и молекулы фермента тем сильнее, чем ниже ионная сила буферного раствора.

Одной из причин термоинактивации может быть диссоциация катиона, необходимого для катализа, из своего центра связывания. Наличие соответствующей соли в буферном растворе может подавить диссоциацию, предотвращая таким образом потерю активности. Наличие 0,5 – 5 мМ Ca^{2+} в буферном растворе с Lys394 при 37 °С приводит к увеличению периода полуинактивации в 4 раза по сравнению с контрольным препаратом. Использование хлорида марганца также приводило к увеличению периода полуинактивации, но эффект оказался менее значительным. Период полуинактивации увеличился с 3,5 до 6,5 суток.

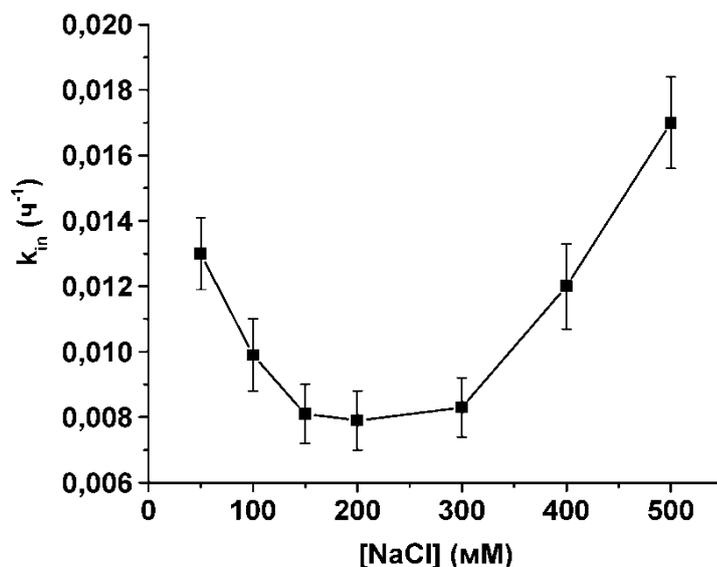


Рис. 10. Зависимость константы инактивации первого порядка Lys394 при 37 °С от концентрации NaCl. 20 мМ трис-НСl рН 8,0.

Стабилизация Lys394 с помощью полиолов. Низкомолекулярные полиолы всегда оказывают стабилизирующее действие на ферменты. Одно из объяснений этого эффекта заключается в усилении внутримолекулярных гидрофобных взаимодействий. Поэтому в ходе работы мы исследовали влияние ряда полиолов на активность и стабильность Lys394. Для эксперимента были взяты низкомолекулярные полиолы: глицерин, сахароза, глюкоза, трегалоза и фруктоза.

Все протестированные полиолы в разной степени понижают ферментативную активность Lys394. Эффект варьируется в зависимости от природы полиола и от его концентрации (Рис. 11 слева). Минимальная потеря активности наблюдается в присутствии глицерина и трегалозы, тогда как наибольшая потеря активности (до 40%) наблюдалась в случае сахарозы. Наблюдаемая потеря активности может быть связана с воздействием добавок как на фермент, так и на клетки *E. coli*, используемые в качестве субстрата.

Из рисунка 11 видно, что при концентрациях выше 50% во всех случаях резко возрастает погрешность измерений ферментативной активности, поэтому влияние полиолов на стабильность Lys394 оценивалось при концентрациях добавок равных 50% (по массе).

Все протестированные низкомолекулярные полиолы стабилизируют Lys394 при 37 °С (рис. 11 справа). Максимальный стабилизирующий эффект наблюдался в

присутствии глицерина – период полуинактивации Lys394 при 37 °С в присутствии 50% глицерина увеличился в 13 раз: с 3,5 суток до 45 суток. При +20 °С такой препарат сохраняет 90% активности спустя 2 месяца хранения, что соответствует периоду полуинактивации около 7,5 месяцев с учетом того, что процесс инактивации подчиняется кинетике первого порядка.

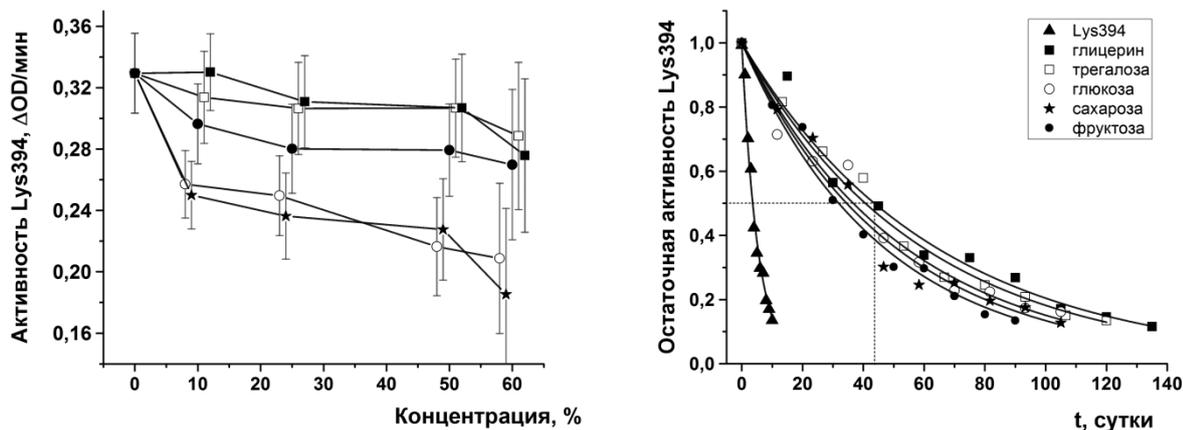


Рис. 11. Влияние сахаров и глицерина на активность (справа) и стабильность (слева) Lys394. 20 мМ трис-НСl (рН 8,0) 150 мМ NaCl. Ошибка измерения соответствует 95% доверительному интервалу.

Стабилизация Lys394 с помощью поликатионов. Наряду с усилением внутримолекулярных гидрофобных взаимодействий разворачивание глобулы белка можно предотвратить за счет нековалентного взаимодействия с полиэлектролитами. При рН 8,0 молекула Lys394 заряжена отрицательно (рI 7,0), поэтому для стабилизации Lys394 были использованы поликатионы: поли-L-лизин (1–4 кДа) и поли-L-аргинин (5–15 кДа). Более длинные полилизины и полиаргинины неприменимы в нашем случае, так как ранее в этой работе было показано, что они вызывают агглютинацию клеток *E. coli*.

Каждый из поликатионов проявляет стабилизационный эффект вплоть до концентрации 80 мкг/мл, выше которой значение периода полуинактивации Lys394 остается неизменным. Наиболее стабильным при 37 °С оказался препарат, содержащий 0,08 мг/мл поли-L-аргинина (5–15 кДа). Период полуинактивации Lys394 в составе такого препарата составил 22 суток, что приблизительно в 6 раз превышает период полуинактивации Lys394 без добавок. При 20 °С в присутствии

0,08 мг/мл поли-*L*-аргинина исследуемый фермент сохраняет 75 % активности после инкубации в течение 50 суток.

Наряду с гомополимерами аминокислот были протестированы блоксополимеры $\text{Lys}_{10}\text{ЭГ}_{114}$ и $\text{Lys}_{30}\text{ЭГ}_{114}$. Их присутствие в составе буферного раствора с ферментом также приводило к замедлению процесса инактивации, однако эффект блоксополимеров оказался менее значительным (максимальное увеличение периода полуинактивации не более чем в 1,5–2 раза).

Выбор оптимального сочетания эффекторов для стабилизации Lys394. По итогам экспериментов по стабилизации из каждого типа эффекторов мы отобрали вещества, показавшие максимальное увеличение времени полуинактивации Lys394. Для этого мы составили 4 композиции на основе выбранных стабилизаторов (три композиции с попарными сочетаниями CaCl_2 , поли-*L*-аргинина и глицерина и четвертая композиция, включающая все эффекторы) и проверили их влияние на стабильность Lys394.

Наименьшая скорость инактивации фермента наблюдались в двух случаях: композиция, содержащая глицерин/полиаргинин/ Ca^{2+} и композиция глицерин/полиаргинин. В результате теста была выявлена следующая закономерность: дополнительное внесение хлорида кальция в композицию, содержащую полиаргинин, не приводит к снижению скорости инактивации Lys394. Это видно по одинаковому периоду полуинактивации Lys394 в присутствии полиаргинина по сравнению с композицией полиаргинин/ Ca^{2+} , а также при сравнении композиций полиаргинин/глицерин/ Ca^{2+} и полиаргинин/глицерин. Однако эффекты каждого компонента по отдельности достоверно отличаются друг от друга (Рис. 12). В присутствии наиболее оптимального сочетания стабилизаторов – полиаргинин/глицерин или полиаргинин/глицерин/ Ca^{2+} – Lys394 сохраняет около 90% активности спустя 4 месяца инкубации при 20 °С, что соответствует периоду полуинактивации свыше 18 месяцев с учетом протекания процесса согласно кинетике первого порядка.

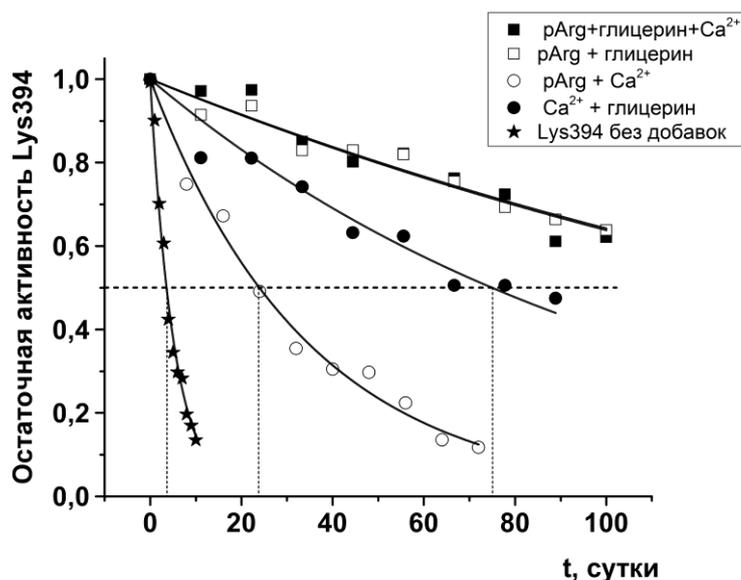


Рис. 12. Термоинактивация Lys394 при 37 °С в составе композиций эффлекторов.

ВЫВОДЫ

1. Клонирован ген эндолизина бактериофага S-394 и создан штамм-продуцент рекомбинантного фермента Lys394. Оптимизированы условия культивирования, выделения и очистки фермента до гомогенного состояния.
2. Изучены физико-химические свойства фермента Lys394. Показано, что активной формой является мономер массой 18 кДа со значением pI близким к 7. Обнаружено, что оптимальными условиями функционирования фермента являются pH 8,5 и низкая концентрация соли (0 – 150 мМ). Обнаружено, что ключевую роль для катализа играет катион Ca²⁺ или Mn²⁺. Выявлена широкая субстратная специфичность Lys394 по отношению к пептидогликанам грамотрицательных микроорганизмов.
3. Подобраны агенты, обеспечивающие функционирование Lys394 на живых клетках *E. coli* лабораторного штамма CR63 в виде суспензии и газона. Обнаружено, что лизис суспензии клеток под действием Lys394 наиболее быстро протекает в присутствии 20 мкг/мл пептида PGLa или 25 мкг/мл полиаргинина фракции 5–15 кДа. Показано, что гибель > 99,99 % газонных клеток *E. coli* происходит под действием Lys394 в течение 10 минут в присутствии 0,05 мг/мл PGLa и 1 мМ ЭДТА.
4. На основе выявленных закономерностей термоинактивации Lys394 разработан способ стабилизации фермента. Показано, что в присутствии 50 % глицерина и 80 мкг/мл поли-L-аргинина фракции 5–15 кДа время полуинактивации Lys394

увеличивается с 3,5 до 150 суток при 37 °С. При 20 °С такой набор добавок позволяет сохранить 90 % активности в течение 4 месяцев инкубации.

Список работ по теме диссертации

1. **Legotsky S.**, Vlasova K., Priyma A., Shneider M., Pugachev V., Totmenina O., Kabanov A., Miroshnikov K., Klyachko N. Peptidoglycan degrading activity of the broad-range Salmonella bacteriophage S-394 recombinant endolysin // *Biochimie*. 2014. Vol. 107, В. Р. 293—299.
2. Патент 2547584 РФ, МПК С12 N9/00, 15/63, 1/21. Гидролаза пептидогликана, экспрессионная плаزمида, содержащая фрагмент ДНК, кодирующий гидролазу пептидогликана, бактерия-продуцент и способ микробиологического синтеза гидролазы пептидогликана / **Легоцкий С.А.**, Мирошников К.А., Кабанов А.В., Клячко Н.Л. - № 2012152156/10; заявл. 05.12.2012; опубл. 10.04.2015, Бюл. № 10.
3. Клячко Н.Л., **Легоцкий С.А.**, Левашов П.А., Попова В.М., Белогурова Н.Г., Тимашева А.В., Дятлов И.А., Левашов А.В. Эндолизин бактериофага SPZ7: влияние эффекторов на каталитическую активность фермента в лизисе грамотрицательных микроорганизмов // *Вестник московского университета. Серия 2 химия*. 2010. Т. 51, № 3. С. 222–226.
4. Патент 2460537 РФ, МПК С12 N9/00, 15/63, 1/21. Способ получения ферментов фага SPZ7 / Левашов П.А., Попов Д.В., Попова В.М., Дятлов И.А., Жиленков Е.Л., Морозова О.А., Белогурова Н.Г., Пугачев В.Г., Репин В.Е., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Седов С.А., **Легоцкий С.А.** - № 2009111537/10; заявл. 31.03.2009; опубл. 10.09.2012, Бюл. № 25.
5. Клячко Н.Л., Зайцева Е.А., Ефременко Е.Н., Кост О.А., Маникам Д., Нуколова Н.В., Мажуга А.Г., Головин Ю.И., **Легоцкий С.А.**, Филатова Л.Ю., Мирошников К.А., Абакумов М.А., Лягин И.В., Чеснокова Н.Б., Никольская И.И., Биневский П.В., Морозова А.Ю., Ефремова М.В., Кузнецов А.А., Рудаковская П.Г., Власова К.Ю., Лебедев Д.Н., Веселов М.М., Алексахин А.Д., Мустафина Т.Б., Абакумова Т.О., Балабушевич Н.Г., Киржанова Е.А., Прийма А.Д., Кузнецов И.И., Самодуров А.А., Грибановский С.Л., Плотникова Е.Д., Белова А.Б., Еремеев Н.Л., Гачок И.В., Варфоломеев С.Д., Бронич Т.К., Батракова Е.В., Чехонин В.П., Сокольский-Папков М., Кабанов А.В. Новые бионаносистемы для медицинских применений. Развитие технологии nanopzyme в Московском

государственном университете имени М.В.Ломоносова // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2014. Т. 55, № 3. С. 139–147.

6. **Legotsky S.A.** et al. Recombinant endolysin of S-394 bacteriophage: characterisation and application against *E. coli* // Biocatal. Fundam. Appl. Moscow, 2013. P. 34–34.
7. **Legotsky S.A.** et al. Characterisation of bacteriophage S-394 endolysin and its application against gram-negative bacteria // Biomater. Nanobiomaterials Recent Adv. Safety-Toxicology Ecol. Issues. Heraklion, 2013. P. 17–17.
8. **Legotsky S.A.**, et al. Characterization of Endolysin from *Samonella* Bacteriophage S-394 and its use for *E. coli* Lysis // Evergr. Int. Phage Meet. Olympia, 2013. P. 82–82.
9. Klyachko N.L., et al. The Antibacterial Enzymes and Methods of Delivery – An Alternative to Antibiotics // Biomater. Nanobiomaterials Recent Probl. Ecol. Issues”. Heraclion, 2015. P. 26–26.
10. Клячко Н.Л. и др. Антибактериальные ферменты и способы их доставки - альтернатива антибиотикам // VIII Московский международный конгресс “Биотехнология состояние и перспективы развития.” 2015. С. 348–349.
11. Klyachko N., et al. Enzyme engineering for the development of bionanomaterials for medical applications // Biocatal. Fundam. Appl. 2013. P. 55–55.