

УДК 577.152.3:579.234

ВЛИЯНИЕ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА ВТОРИЧНУЮ СТРУКТУРУ И СТАБИЛЬНОСТЬ СТАФИЛОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА LysK

Л.Ю. Филатова^{1*}, Д.М. Donovan², И.А. Новожилов¹, Т.А. Чубарь¹,
Н.Г. Балабушевич¹, В.Г. Пугачев³, Н.Л. Клячко¹

(¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; ²Институт природных ресурсов, Сельскохозяйственный центр Бельствилля, США; ³Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирск; *e-mail: luboff.filatova@gmail.com)

Разветвленный блок-сополимер полиэтиленimina и полиэтиленгликоля (ПЭИ-ПЭГ) и линейный блок-сополимер полилизина и полиэтиленгликоля (ПЛЛ-ПЭГ) образуют комплексы со стафилолитическим ферментом LysK, включение в которые происходит с увеличением эффективности лизиса (в 1,5–2 раза) и времени полуинактивации фермента (в 2–20 раз). Стабилизирующие эффекты блок-сополимеров зависят от температуры, концентрации NaCl и соотношения полимер/фермент. Линейный ПЛЛ-ПЭГ, будучи более эффективным стабилизатором, обеспечивает увеличение стабильности LysK, отвечающее требованиям к материалам биомедицинского назначения (сохранение 100%-й активности фермента через 4 месяца при 4 °С).

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, литические ферменты бактериофагов, полимеры, стабильность, структура.

Грамположительная бактерия *Staphylococcus aureus* проявляет себя по отношению к организму человека как опасный патоген, быстро вырабатывающий устойчивость к антибиотикам. Очевидно, что помимо совершенствования существующих методов лечения стафилококковых инфекций необходим поиск альтернативных способов противобактериального лечения. К одним из таких способов можно отнести использование цитолитических ферментов бактериофагов, которые называют лизинами или лизоцимами [1, 2]. Эти ферменты разрушают клеточную стенку патогенов за счет гидролиза химических связей в пептидогликане на начальной (лизис снаружи) и конечной (лизис изнутри) стадиях литического цикла бактериофагов. Лизин фага K (LysK), лизирующий клетки антибиотикорезистентных штаммов *S. aureus* [3], представляет интерес как потенциальная основа для разработки лекарственных препаратов, однако недостаточная стабильность (при хранении) снижает возможность практического использования LysK [4].

Ранее был обнаружен эффект существенной стабилизации LysK положительно заряженными линейными полимерами за счет формирования комплексов [5, 6]. Однако из-за токсичности поликатионов предпочтительнее использовать блок-сополимеры, содержащие заряженный и неионный полимерные блоки.

В настоящей работе для изучения влияния природы заряженного фрагмента блок-сополимера на антимикробную активность, стабильность и структуру LysK использовали блок-сополимеры, содержащие положительно заряженный блок и полиэтиленгликоль (ПЭГ). Это блок-сополимер полиэтиленimina и ПЭГ ПЭИ-ПЭГ (молекула содержит разветвленный положительно заряженный блок из полиэтиленimina и ПЭГ), блок-сополимер полилизина и ПЭГ ПЛЛ-ПЭГ (молекула содержит линейный положительно заряженный блок из полилизина и ПЭГ).

Экспериментальная часть

Реагенты. Рекомбинантный LysK получали в соответствии с методикой [3], очищенный препарат фермента хранили в буферном растворе (50 мМ фосфата натрия, 300 мМ хлорида натрия, 250 мМ имидазола, 30% глицерина, рН 8,0) в концентрации 11,0 мг/мл при –20 °С.

Культуру бактерий *Staphylococcus aureus* выращивали на L-бульоне до экспоненциальной фазы ($4,0 \times 10^8$ кл./мл), автоклавировали в течение 30 мин при 0,6–0,7 атм, остывшую суспензию осаждали центрифугированием при 9000 rpm в течение 20 мин, осадок клеток промывали дважды физиологическим раствором. Полученную суспензию проверяли на наличие живых бактерий путем посева образцов на агаризованные питательные

среды. Автоклавирование клеток *S. aureus* проводили для обеспечения безопасности работы с данным микроорганизмом. Сохранение целостности клеточных стенок *S. aureus* было подтверждено методом электронной микроскопии. Идентичность кинетических параметров фермента при использовании для измерения его активности живых и автоклавированных клеток подтверждена экспериментально [7, 8].

Для проведения экспериментов использовали полимер ПЛЛ-ПЭГ (9,9 кДа, 30 первичных аминогрупп) фирмы «Alamanda Polymers» и блок-сополимер ПЭИ-ПЭГ (12,6 кДа), любезно предоставленный сотрудниками медицинского центра Небраски, его молекула содержит 17 первичных, 16 вторичных и 13 третичных аминогрупп.

Получение комплексов LysK с блок-сополимерами. Раствор фермента LysK (11,0 мг/мл, 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ хлорида натрия, 250 мМ имидазола, 30% глицерина, рН 8,0) разбавляли раствором положительно заряженного блок-сополимера ПЛЛ-ПЭГ или ПЭИ-ПЭГ (20 мМ глицин, рН 9,0) с заданной концентрацией NaCl (0–500 мМ) до установления концентрации фермента 0,4 мг/мл. Для образования комплексов полученные образцы инкубировали 30 мин при 22 °С.

Получены образцы комплексов с концентрацией фермента 0,4 мг/мл, молярным соотношением зарядов полимер/фермент (*Z*), равным 1:1 и 10:1, концентрацией хлорида натрия 10–500 мМ, значением рН среды, равным 9,0.

Изучение влияния полимеров на активность LysK. Измерение активности проводили на спектрофотометре «Jen-way 6405 UV/Vis», используя стандартную спектрофотометрическую кювету объемом 0,5 мл (длина оптического пути 1 см).

В 20 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,5) готовили суспензию клеток *S. aureus* ($A_{600} = 0,6$ ед. оптической плотности). Суспензию клеток (0,5 мл) нагревали до 37 °С с последующей

регистрацией фонового лизиса. Затем к суспензии *S. aureus* добавляли 5–10 мкл раствора фермента или смеси фермента и полимера (LysK 0,4 мг/мл) с последующей регистрацией изменения оптической плотности в течение 10–15 мин. Скорость реакции определяли как изменение оптической плотности в единицу времени, нормировали на единицу массы фермента LysK и выражали в ед. погл./с·мг.

Изучение влияния полимеров на стабильность LysK. Растворы LysK в смеси с полимерами инкубировали при значениях температуры 4 и 22 °С в течение выбранных промежутков времени с последующим отбором аликвот растворов для измерения активности в стандартных условиях. Концентрация фермента в инкубируемых растворах составляла 0,4 мг/мл.

Исследование вторичной структуры LysK в комплексах с полимерами методом ИК-спектроскопии. ИК-спектры водных растворов LysK в комплексах с полимерами регистрировали согласно описанной ранее методике [6].

Определение размеров частиц комплексов LysK с полимерами. Размер и заряд частиц LysK после добавления полимеров (рН 9,0, концентрация фермента 0,4 мг/мл, температура 22 °С, *Z* = 1:1 и *Z* = 10:1) определяли с помощью оборудования «Zetasizer Nano ZS» (He–Ne-лазер, 5 мВ, 633 нм). Для интерпретации результатов использовали *number particle size distribution*.

Результаты и их обсуждение

В качестве надежного способа контроля процессов взаимодействия фермента с полимерами можно использовать слежение за размерами образующихся частиц с помощью динамического рассеяния света. Значение эффективного гидродинамического радиуса (R_h) частиц активного фермента LysK при рН 9,0 из-за его склонности к агрегации (ввиду близости значения выбранного рН к значению изоэлектрической точки pI) доста-

Т а б л и ц а 1

Влияние положительно заряженных блок-сополимеров на величины эффективного гидродинамического радиуса (нм) частиц фермента LysK

Полимер	<i>Z</i>	ζ , мВ	C_{NaCl} , мМ			Активность, %
			10	300	500	
–	–	–21±10	600±25	650±50	670±60	100*
ПЛЛ-ПЭГ	10:1	6±2	60±5	160±20	100±20	180
ПЭИ-ПЭГ	10:1	5±2	200±20	170±20	230±20	200

*100%-я активность – активность LysK без добавления блок-сополимеров.

Т а б л и ц а 2

Влияние блок-сополимеров на стабильность LysK при 22 °С

Полимер	С (NaCl), mM	Z	Порядок инактивации	Константа инактивации
–	10	–	2,0	$0,5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$
	300	–	2,0	$1,5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$
	500	–	2,0	$1,5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$
ПЭИ-ПЭГ	10	1:1	1,0	$1,0 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$
		10:1	1,0	$5,5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$
	300	1:1	1,3	$4,0 \times 10^{-5} \text{ M}^{-0,3} \text{ c}^{-1}$
		10:1	1,2	$1,5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-0,2} \text{ c}^{-1}$
	500	1:1	1,3	$5,4 \times 10^{-7} \text{ M}^{-0,3} \text{ c}^{-1}$
		10:1	0,5	$5,4 \times 10^{-7} \text{ M}^{0,5} \text{ c}^{-1}$
ПЛЛ-ПЭГ	10	1:1	0,8	$6,6 \times 10^{-8} \text{ M}^{0,2} \text{ c}^{-1}$
		10:1	1,3	$4,1 \times 10^{-11} \text{ M}^{-0,3} \text{ c}^{-1}$
	300	1:1	1,3	$6,8 \times 10^{-11} \text{ M}^{-0,3} \text{ c}^{-1}$
		10:1	1,2	$1,5 \times 10^{-11} \text{ M}^{-0,2} \text{ c}^{-1}$
	500	1:1	1,2	$2,0 \times 10^{-11} \text{ M}^{-0,2} \text{ c}^{-1}$
		10:1	1,2	$2,0 \times 10^{-11} \text{ M}^{-0,2} \text{ c}^{-1}$

точно велико и составляет величину порядка 600 нм (табл. 1) независимо от концентрации соли в растворе. Величины эффективных гидродинамических радиусов частиц блок-сополимеров при этих же условиях равны приблизительно 1–4 нм. Добавление 1- и 10-кратных избытков (по зарядам) ПЛЛ-ПЭГ или ПЭИ-ПЭГ к LysK приводит к значительному уменьшению размеров частиц фермента до 100–200 нм (в табл. 1 приведены значения радиусов частиц при $Z = 10:1$). Это может быть вызвано тем, что молекулы положительно заряженных блок-сополимеров адсорбируются на отрицательно заряженных агрегатах фермента LysK за счет сил электростатического взаимодей-

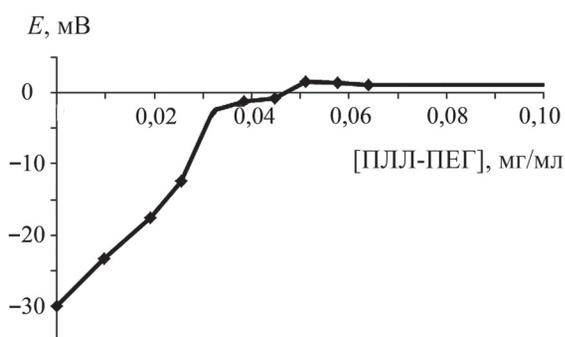


Рис. 1. Взаимодействие ПЛЛ-ПЭГ с клетками *S. aureus* при 37 °С (рН 7,5)

ствия. Электростатическое отталкивание между одноименно заряженными молекулами полимеров, адсорбированных на поверхности белковых агрегатов, обуславливает их «растаскивание» и, как следствие, формирование более мелких частиц (комплексов LysK-полимер). Эти частицы менее склонны к агрегации из-за сил электростатического отталкивания и пространственных затруднений, создаваемых адсорбированными на их поверхности молекулами блок-сополимеров.

Положительно заряженные фрагменты молекул блок-сополимеров ПЛЛ-ПЭГ или ПЭИ-ПЭГ находятся в непосредственном контакте с отрицательно заряженными молекулами LysK, в то время как цепи ПЭГ обращены в сторону водной фазы. По этой причине частицы комплексов имеют близкое к нулю значение ζ -потенциала, в то время как агрегаты молекул фермента отрицательно заряжены ($\text{pH} > \text{pI}$). Радиусы комплексов LysK с блок-сополимерами практически не изменяются с увеличением концентрации соли, что свидетельствует о прочности электростатических взаимодействий (табл. 1).

Как показано в табл. 1, взаимодействие лизина с положительно заряженными блок-сополимерами приводит к небольшому увеличению активности LysK (в 1,5–2 раза). Этому можно дать два объ-

яснения. Во-первых, клетки *Staphylococcus aureus* имеют отрицательный заряд, который формируют карбоксильные группы *d*-изоглутаминовой кислоты, терминальные остатки *d*-аланина пептидных субъединиц пептидогликана и тейхоевые кислоты. Клетки *Staphylococcus aureus* имеют ζ -потенциал с отрицательным значением; при добавлении к клеткам блок-сополимера ПЛЛ-ПЭГ наблюдается увеличение заряда клеток с последующей сменой знака заряда их поверхности (рис. 1), что может быть вызвано адсорбцией полимера на поверхности клеток. Во-вторых, положительный заряд комплексов фермент–полимер обеспечивает увеличение связывания LysK с отрицательно заряженными клетками *S. aureus*, что может быть причиной увеличения скорости лизиса.

Положительно заряженные блок-сополимеры оказывают влияние не только на активность, но и на стабильность фермента (при температуре хранения 4 и 22 °С). На активность фермента ПЭИ-ПЭГ и ПЛЛ-ПЭГ влияют практически одинаково, а стабилизирующие эффекты у них различаются. В табл. 2 приведены значения порядков и констант инактивации LysK при 22 °С в комплексах с ПЭИ-ПЭГ и ПЛЛ-ПЭГ в зависимости от концентрации хлорида натрия и зарядового соотношения полимер/фермент. Из табл. 2 видно, что при 22 °С происходит уменьшение значений порядка реакции инактивации фермента со второго до первого. Образование комплексов между молекулами положительно заряженного блок-сополимера и отрицательно заряженного фермента ведет к подавлению межмолекулярных взаимодействий типа фермент-фермент, LysK инактивируется внутри полимер-

ной капсулы в соответствии с мономолекулярным механизмом.

Для оценки стабилизирующего эффекта полимера обычно проводят сравнение констант инактивации нативного фермента и биокатализатора в комплексе с полиионом, но для LysK сопоставление величин констант инактивации невозможно, так как они соответствуют разным порядкам. Для количественной оценки стабилизирующего эффекта блок-сополимеров использовали значения времени полуинактивации фермента ($\tau_{1/2}$) в комплексах с ними и индивидуального (рис. 2, а, б).

Как видно из рис. 2, а, время полуинактивации LysK в присутствии блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ увеличивается и стабилизирующий эффект начинает отчетливо проявляться уже при $Z = 1:1$ (значение $\tau_{1/2}$ возрастает с 1–3 до 9–13 сут.) При $Z = 10:1$ время полуинактивации LysK на 2–3 сут. больше такового для соотношения 1:1, т.е. максимальный стабилизирующий эффект достигается уже при $Z = 1:1$. С увеличением содержания хлорида натрия от 10 до 300–500 мМ стабилизирующее влияние блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ усиливается. По данным рис. 2, а можно оценить величину стабилизирующего эффекта разветвленного блок-сополимера: при концентрации NaCl, равной 10 мМ, время полуинактивации LysK возрастает в 3–4 раза, при концентрации NaCl, равной 300 и 500 мМ, время полуинактивации LysK возрастает в 10–12 и 13–16 раз соответственно. При низкой концентрации NaCl проявляется слабый эффект экранирования зарядов разветвленного полимера. Заряды находятся на максимальном расстоянии друг от друга, и жесткость полимерной цепи до-

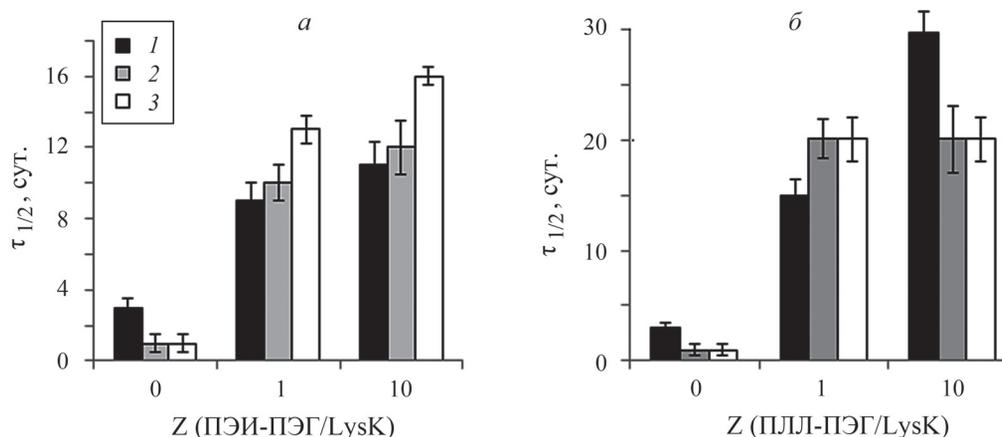


Рис. 2. Влияние блок-сополимеров ПЭИ-ПЭГ (а) и ПЛЛ-ПЭГ (б) на стабильность LysK при концентрации NaCl, мМ: 1 – 10, 2 – 300, 3 – 500, (22 °С, концентрации фермента 0,4 мг/мл, рН 9,0)

Т а б л и ц а 3

Влияние блок-сополимеров на стабильность LysK при 4 °С

Полимер	C_{NaCl} , мМ	Z	Порядок инактивации	Константа инактивации
ПЭИ-ПЭГ	10	–	2,0	$0,5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$
		1:1	1,8	$1,1 \times 10^{-2} \text{ М}^{0,8} \text{ с}^{-1}$
		10:1	1,6	$5,1 \times 10^{-4} \text{ М}^{0,6} \text{ с}^{-1}$
	300	–	2,0	$0,03 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$
		1:1	1,9	$1,6 \times 10^{-2} \text{ М}^{0,9} \text{ с}^{-1}$
		10:1	1,8	$4,5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1} \text{ М}^{0,8}$
	500	–	2,0	$0,06 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$
		1:1	1,0	$1,0 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$
		10:1	1,0	$1,0 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$
ПЛЛ-ПЭГ	10–500	1:1–10:1	–	4 мес. 70–100% активности

статочна висока, что приводит к более слабому связыванию полимера и LysK.

При взаимодействии фермента с линейным блок-сополимером ПЛЛ-ПЭГ, также как и с разветвленным, происходит резкое увеличение стабильности при зарядовом соотношении полимера и фермента 1:1, время полуинактивации LysK возрастает с 1–3 до 15 сут. (рис. 2, б). Стабилизирующее влияние линейного блок-сополимера, как и разветвленного, усиливается с увеличением концентрации соли ($Z = 1:1$). Это можно объяснить возрастанием гибкости цепи (что облегчает связывание с ферментом) за счет экранирования положительных зарядов полимера при возрастании ионной силы. Увеличение с ростом концентрации NaCl стабилизационного эффекта можно также объяснить наличием между блок-сополимерами и LysK гидрофобных взаимодействий.

Процесс инактивации LysK в комплексах с ПЭИ-ПЭГ при 4 °С сопровождается понижением порядка реакции до величин, близких или равных единице (табл. 3). Наблюдаемые при 4 и 22 °С закономерности стабилизации LysK блок-сополимером ПЭИ-ПЭГ в целом схожи, за исключением того, что при 4 °С стабилизационный эффект отсутствует в случае низкой концентрации NaCl. Из рис. 3 видно, что при 4 °С и 500 мМ NaCl добавление к LysK ПЭИ-ПЭГ приводит к росту значения времени полуинактивации фермента при зарядовом соотношении блок-сополимера и LysK, равном 1:1, далее оно остается постоянным (как и при 22 °С). В присутствии 10 мМ NaCl время полуинактивации LysK уменьшается по сравнению с

нативным ферментом, т.е. имеется незначительная дестабилизация LysK.

Линейный блок-сополимер ПЛЛ-ПЭГ проявляет мощное стабилизирующее влияние на LysK при 4 °С – фермент сохраняет 70–100% активности после 4 месяцев хранения при выбранных концентрациях хлорида натрия и зарядовых соотношениях полимер/фермент (табл. 3). Таким образом, можно заключить, что при использовании в качестве стабилизатора блок-сополимера ПЛЛ-ПЭГ можно добиться показателей инактивации фермента, оптимальных для его хранения.

Для понимания причин, вызывающих изменение кинетических свойств ферментов при взаимодействии с полимерами, был использован метод ИК-спектроскопии. ИК-Фурье-спектроскопия – хорошо известный метод для определения вторич-

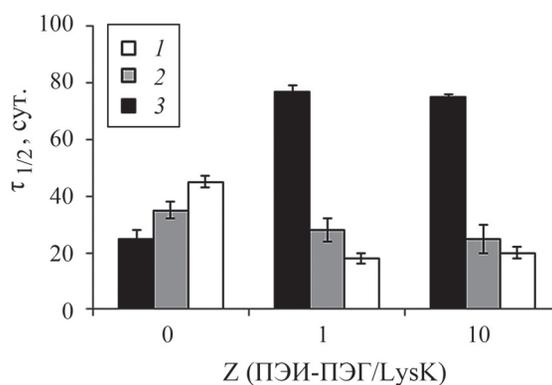


Рис. 3. Влияние блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ на стабильность LysK при концентрации NaCl, мМ: 1 – 10, 2 – 300, 3 – 500, (4 °С, концентрации фермента 0,4 мг/мл, pH 9,0)

Т а б л и ц а 4

Влияние полимеров и концентрации NaCl на вторичную структуру LysK (22 °С, Z = 10:1)

Образец	NaCl, mM	Альфа-спирали, %	Бета-структуры, %	Неупорядоченные структуры, %
LysK	10	15,6	34,2	50,2
	500	19,3	35,5	45,2
ПЛЛ-ПЭГ/LysK	10	16,8	37,7	45,5
	500	18,0	35,8	39,2
ПЭИ-ПЭГ/LysK	10	23,2	29,3	47,5
	500	16,6	32,6	50,8

ной структуры белка. Элементы вторичной структуры белка и их содержание в общей вторичной структуре могут быть определены на основании анализа поглощения белка в области валентных колебаний карбонильной группы пептидной связи (полоса Амид I), если использовать способы улучшения разрешения и разложения спектров.

ИК-спектры фермента LysK показаны на рис. 4. Хорошо видны полосы Амид I (1700–1600 см^{-1}), Амид II (1480–1580 см^{-1}), Амид III (1229–1301 см^{-1}), характерные для белков. В области 1700–1600 см^{-1} спектра фермента LysK полоса поглощения Амид I имеет максимум в районе 1640 см^{-1} .

Количественное содержание элементов вторичной структуры фермента при разных кон-

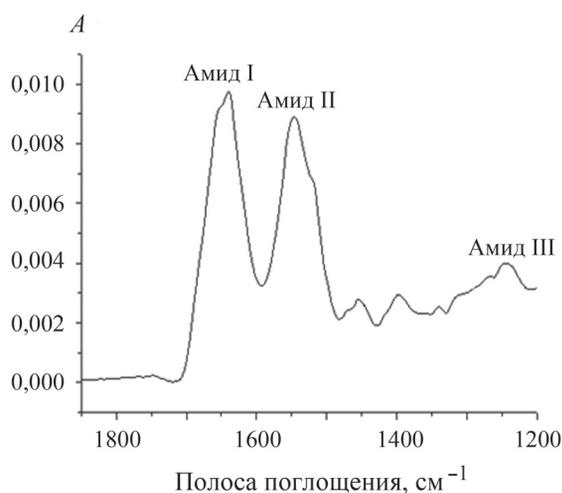


Рис. 4. ИК-спектр фермента LysK при 22 °С, 10 mM NaCl, pH 9,0

центрациях NaCl было определено по процедуре разложения пика Амид I. Количественный анализ полосы Амид I показал (табл. 4), что блок-сополимеры ПЛЛ-ПЭГ и ПЭИ-ПЭГ при Z = 10:1 и концентрациях хлорида натрия 10 и 500 mM практически не оказывают влияния на вторичную структуру LysK. Изменения в содержании различных элементов вторичной структуры не превышают величины порядка 5%, из чего можно заключить, что фермент находится в комплексах в каталитически активной конформации, а это наряду с подавлением агрегации также может обеспечить стабилизационный эффект.

Заключение

1. Разветвленный ПЭИ-ПЭГ и линейный ПЛЛ-ПЭГ (положительно заряженные блок-сополимеры) образуют комплексы с LysK, включение в которые сопровождается увеличением в 1,5–2 раза эффективности лизиса и в 2–20 раз стабильности фермента (Z = 1:1, Z = 10:1).

2. Стабилизирующие эффекты блок-сополимеров зависят от температуры, концентрации NaCl, зарядового соотношения полимера и фермента. Линейный блок-сополимер ПЛЛ-ПЭГ более эффективен по сравнению с разветвленным блок-сополимером ПЭИ-ПЭГ и является высокоэффективным стабилизатором для LysK при 4 °С.

3. Стабилизационный эффект блок-сополимеров ПЭИ-ПЭГ и ПЛЛ-ПЭГ по отношению к ферменту LysK можно объяснить закреплением его каталитически активной конформации при включении в полимерную оболочку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rodriguez-Rubio L., Martinez B., Donovan D.M., Rodriguez A., Garcia P. // *Critical Reviews in Microbiology*. 2013. Vol. 39. P. 427.
2. Schmelcher M., Donovan D.M., Loessner M. // *Future Microbiology*. 2012. Vol. 7. P. 1147.

3. Becker S.C., Foster-Frey J., Donovan D.M. // FEMS Microbiol. Lett. 2008. Vol. 287. P. 185.
4. Filatova L.Yu., Becker S.C., Donovan D.M., Gladilin A.K., Klyachko N.L. // Biochimie. 2010. Vol. 92. P. 507.
5. Filatova L.Yu., Bekker C.C., Donovan D.M., Gladilin A.K., Klyachko N.L. // Moscow University Chemistry Bulletin. 2009. Vol. 64. P. 382.
6. Filatova L.Y., Donovan D.M., Becker S.C., Lebedev D.N., Priyama A.D., Koudriachova H.V., Kabanov A.V., Klyachko N.L. // Biochimie. 2013. Vol. 95. P. 1689.
7. Filatova L.Y., Donovan D.M., Foster-Frey J., Pugachev V.G., Dmitrieva N.F., Chubar T.A., Klyachko N.L., Kabanov A.V. // Enzyme and Microbial Technology. 2015. Vol. 73–74C. P. 51.
8. Filatova L.Y., Donovan D.M., Ishnazarova N.T., Foster-Frey J.A., Becker S.C., Pugachev V.G., Balabushevich N.G., Dmitrieva N.F., Klyachko N.L. // Applied Biochemistry and Biotechnology. Part A. Enzyme Engineering and Biotechnology. 2016. Vol. 180. P. 544.

Поступила в редакцию 09.01.18

INFLUENCE OF BLOCK-COPOLYMERS OF DIFFERENT NATURE ON STAPHYLOLYTIC LYSK ENZYME SECONDARY STRUCTURE AND STABILITY

Filatova L.Y.^{1*}, Donovan D.M.², Novozhilov I.A.¹, Chubar T.A.¹, Balabushevich N.G.¹, Pugachev V.G.³, Klyachko N.L.¹

(¹Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; ²Animal Biosciences and Biotechnology Laboratory, Beltsville Agricultural Research Center, NEA, ARS, USDA, Beltsville, MD, USA; ³Federal Scientific Center of Virology & Bioengineering "Vector", Novosibirsk, Russia; *e-mail: luboff.filatova@gmail.com)

The branched block-copolymer of polyethyleneimine and polyethylene glycol PEI-PEG and the linear block copolymer of polylysine and polyethylene glycol PLL-PEG forms complexes with the staphylolytic LysK enzyme. Complexing between LysK and cationic block-copolymers causes 1.5–2 times increase of the enzyme lytic activity. Block-copolymers stabilize LysK at the temperatures of storage (4 and 22 °C), and the half-inactivation time increases by 2–20 times. Stabilizing effects of block copolymers depend on temperature, NaCl concentration, polymer/enzyme ratio. Linear PLL-PEG provides an increase in LysK stability suitable for biomedical materials (LysK retains 100% activity after 4 months at 4 °C).

Key words: *Staphylococcus aureus*, lytic enzymes of bacteriophages, polymer, structure, stability.

Сведения об авторах: *Филатова Любовь Юрьевна* – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. хим. (luboff.filatova@gmail.com); *Донован Давид* – сотр. Института природных ресурсов (Сельскохозяйственный центр Бельсвилля, США); *Новожилов Игорь Александрович* – студент химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; *Чубарь Татьяна Анатольевна* – ассистент кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (tchubar@gmail.com); *Балабушевич Надежда Георгиевна* – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (nbalab2008@gmail.com); *Пугачев Владимир Георгиевич* – зав. сектором отдела биофизики и экологических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (pugachev@vector.nsc.ru); *Наталья Львовна Клячко* – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (nklyacko@gmail.com).