



УДК 578.813'152.321\*17.01

## СВОЙСТВА ПЕПТИДОГЛИКАНЛИЗИРУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА БАКТЕРИОФАГА фPMG1 *Pseudomonas aeruginosa*

© 2011 г. О. В. Чертков\*, Р. Н. Чупров-Неточин\*, С. В. Легоцкий\*\*,  
Н. Н. Сыкилинда\*, М. М. Шнейдер\*, М. А. Иванова\*, Е. А. Плетенева\*\*\*,  
О. В. Шабурова\*\*\*, М. Б. Буркальцева\*\*\*, Е. С. Кострюкова\*\*\*\*, В. Н. Лазарев\*\*\*\*,  
Н. Л. Клячко\*\*, К. А. Мирошников\*\*

\*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,  
119997 Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10

\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва

\*\*\*Федеральный научный центр "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов", Москва

\*\*\*\*Научно-исследовательский институт физико-химической медицины, Москва

Поступила в редакцию 20.04.2011 г. Принята к печати: 23.06.2011 г.

Выделенный бактериофаг *Pseudomonas aeruginosa* фPMG1 имеет отличительные особенности в литическом инфекционном цикле и образует ореол (зону просветления) вокруг негативных колоний. Фаг был изучен с точки зрения потенциального использования в терапевтических фаговых препаратах и как источник пептидогликан- и липополисахариддеградирующих ферментов. Частичное секвенирование генома фPMG1 показало высокую степень его гомологии с известным умеренным бактериофагом D3. В геноме фPMG1 была идентифицирована открытая рамка считывания, кодирующая литическую трансгликозилазу. Этот фермент был получен в рекомбинантном виде, изучены его активность и субстратная специфичность.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*; бактериофаг; пептидогликанлизирующий фермент; трансгликозилаза.

### ВВЕДЕНИЕ

В связи с появлением и распространением бактерий, множественно устойчивых к антибиотикам, возникла концепция возрождения фаготерапии — использования бактериальных вирусов (бактериофагов) при лечении инфекционных заболеваний [1, 2]. В более широком смысле этот термин означает применение не только смесей живых фагов, но также и их белковых продуктов. Такие белки или белковые комплексы могут сами убивать микроорганизмы (бактериоцины) или делать бактерию более доступной для других антибактериальных препаратов и восприимчивой для иммунного ответа организма [3, 4]. К таким белкам относятся прежде всего ферменты бактериофагов, разрушающие пептидогликаны клеточных стенок, полисахаридные капсулы бактерий и/или внеклеточные полисахариды.

Сокращения: SDS-PAGE — электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия; HEWL — лизоцим из куриного яйца, ПЛФ — пептидогликанлизирующий фермент; PMG MUR — мурамилгидролазный фермент фага.

# Автор для связи (тел.: +7 (495) 335-55-88; эл. почта: kmi@ibch.ru).

В большинстве случаев инкапсулированные формы патогенных бактерий обладают повышенной вирулентностью [5]. Разрушение капсулы способствует успешной борьбе с инфекцией и лечению болезней [6, 7]. Удаление внешнего полисахаридного слоя также способствует успешной терапии — например известно, что обработка биопленок мукоидных клеток *Pseudomonas aeruginosa* альгинатлиазой делает бактерии восприимчивыми к антибиотикам [8].

Специфические фаги, синтезирующие ферменты, которые разрушают внешние капсулы бактерий, описаны для бактерий нескольких видов [9–11]. В частности, выделены несколько бактериофагов, которые успешно разрушают *in vitro* полисахариды биопленок *Pseudomonas* [12–15]. Опубликованные эксперименты не описывают подробный поиск конкретных ферментов, разрушающих альгинат, и не касаются механизма этого процесса. Бактериофаги, инфекционный цикл которых включает расщепление характерной для псевдомонад альгиновой кислоты, считаются достаточно редкими.

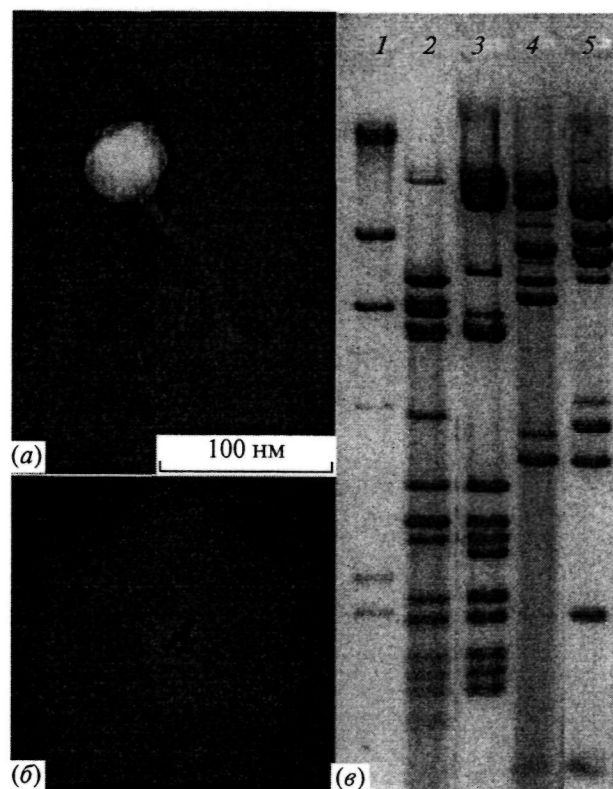


Рис. 1. Бактериофаг фРМГ1: (а) морфология вирусной частицы (ЭМ негативного контрастирования); (б) вид ореолов, образуемых фагом на газоне бактерий *P. aeruginosa* N44 (посев уколком); (в) профили рестрикции геномов фагов D3 (2, 4) и фРМГ1 (3, 5) эндонуклеазами EcoRV (2, 3) и HindIII (4, 5). Линия 1 -  $\lambda$  HindIII-маркер.

Другой тип ферментов, кодируемых геномами бактериофагов и используемых ими для разрушения клеточной стенки бактерий, это пептидогликангидролазы (пептидогликанлизирующие ферменты, ПЛФ, лизины) [3]. Геномы наиболее распространенного и изученного отряда бактериофагов *Caudovirales* (хвостатые фаги) кодируют как минимум один фермент, участвующий в процессе инфицирования бактерии и задействованный при выходе дочерних фагов из клетки в конце инфекционного цикла. В случае грамположительных бактерий рекомбинантные ПЛФ успешно используются для контроля бактериального заражения. Для грамотрицательных бактерий, имеющих дополнительную внешнюю мембрану, затрудняющую контакт бактериофага с полисахаридным слоем (в частности, *P. aeruginosa*), успех применения ПЛФ не столь очевиден. Поэтому обнаружение новых ферментов, обладающих высокой активностью и избирательностью действия в отношении патогенной грамотрицательной микрофлоры — актуальная задача биотехнологии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Общая характеристика фага фРМГ1.** Бактериофаг *P. aeruginosa* фРМГ1 (vB\_PaeS\_PMG1 по номенклатуре Международного комитета по таксономии вирусов ICTV [16]) относится к морфогруппе В1 семейства *Siphoviridae*, с развитым базальным комплексом на конце хвоста (рис. 1а) и содержит двухцепочечную ДНК размером около 57 тыс. п.о. Анализ морфологии бактериофага фРМГ1, размера генома, профиля основных структурных белков (рис. 1в), а также частичное секвенирование последовательности его ДНК, проведенное нами, показывают его значительное родство с фагом *P. aeruginosa* D3 [17], который охарактеризован как умеренный серотипконвергирующий бактериофаг семейства *Siphoviridae*, имеет размер генома 56.426 п.о. и кодирует 90 открытых рамок считывания [18]. Обнаруженное родство позволяет отнести изучаемый нами фаг фРМГ1 к виду D3-подобных.

Характерная особенность бактериофага фРМГ1 — строго литический характер действия по отношению к бактериям всех проверенных штаммов *P. aeruginosa* и образование ореола вокруг негативных колоний (рис. 1б). Мы показали, что бактерии в ореоле сохраняют жизнеспособность также, как в случае действия ореолообразующих фагов родственной бактерии *P. putida* [19]. Фаги, образующие ореолы, эволюционно приобрели способность разрушать полисахариды как ответную реакцию на способность бактерий образовывать биопленки. Возможно, что наблюдаемое при контакте с фагом образование ореола вызвано действием легко диффундирующего из фага активного агента с небольшой молекулярной массой, вероятно, белковой природы. Им, например, может быть фермент, деполимеризующий липополисахариды. Такие ферменты, разрушающие полисахариды биопленок, были обнаружены у ряда бактериофагов [13].

Однако возможен и иной механизм образования ореолов. Они могут возникать как следствие синтеза инфицированными бактериями специфических сигнальных продуктов, которые при миграции к соседним клеткам активируют в них синтез собственных деполимераз полисахаридов [18]. В этом случае инициировать такой сигнал может один из небольших регуляторных белков бактериофага, идентифицировать который при анализе последовательности генома фага невозможно.

Большинство белков фагов, которые регулируют клеточные процессы бактерий, мало изучены, и закономерности их последовательности и структуры неизвестны. Получение таких данных для каждого известного фага очень важно. В данной работе мы ограничились поиском возможных кодируемых фагом фРМГ1 ферментов, деградирующих липополисахарид и гидролизующих клеточную стенку бактерии *P. aeruginosa*.

MAVVSEKTAG GRNVLAFLDM LAFVSEGTSTI RGS DNGYNVV VGGGLFNGYA  
 DHPRLKVYLP RYKVYSTAAG RYQLLSRYWD AYRESLAIKKG GETPANODLV  
 ALQOIKERRA LADIQAGRLA DAVOKCSNIW ASLPGAGYGO REHSLDDIAA  
 NYLAAGGVLS

Рис. 2. Структурные и функциональные элементы аминокислотной последовательности PMG MUR. Жирным шрифтом выделен каталитический аминокислотный остаток трансгликозилазы, серым цветом показаны аминокислотные остатки, находящиеся в конформации  $\alpha$ -спирали, по результатам предсказательного алгоритма 3D-PSST и сравнения с моделью  $\lambda$ -лизозима [26, 27].

**Поиск генов пептидогликанлитических (ПЛФ) и полисахаридгидролазных ферментов в геноме фРМГ1.** Для поиска указанных ферментов мы воспользовались сравнительно несложным методом скрининга экспрессионных библиотек, который позволяет быстро определять наличие закодированных ферментов в небольших геномах без проведения полного их секвенирования [20, 21]. Для приложения этого подхода из геномной ДНК фага РМГ1 была создана библиотека под контролем Т7-промотора. Размер вставки фрагмента генома в клон был выбран исходя из среднего размера известных полисахаридгидролаз и пептидогликангидролаз, представленных в базе данных SwissProt.

Было проверено около 1000 клонов. Деполимеризацию контролировали с использованием в качестве субстрата полисахарида устойчиво мукоидного штамма N44 *P. aeruginosa*. Деполимеризацию активности, сравнимой с положительным контролем – альгинатлиазой *Flavobacterium spp.* (Sigma), в проанализированных колониях обнаружено не было. Таким образом, можно предположить, что образование ореола не есть следствие ферментативного механизма фага; ореол, вероятно, образуется при помощи сигнальной секреции бактериальных клеток.

В четырех исследованных клонках была обнаружена пептидогликангидролазная активность. Эти клоны были отобраны для дальнейших исследований. Секвенирование последовательности ДНК в выбранных клонках выявило структуру, вплоть до единичного нуклеотида совпадающую с геном *g31*, кодирующим мурамидазу бактериофага D3 [22].

**Частичное определение последовательности генома фага фРМГ1.** Секвенирование методом Сэнгера 90 случайно выбранных клонов библиотеки привело к построению 5 непрерывных последовательностей длиной от 1600 до 3700 п.о с достоверным более чем трехкратным перекрытием. Определенные последовательности были более чем на 90% гомологичны участкам генома бактериофага D3. В областях, кодирующих белки фага D3 с известными функциями – р05 (С1рР-подобная протеаза), р06 (основной белок капсида), р51 (регулятор транскрипции), р78 (Zn-finger-белок) – гомология достигает 98%. Другой бактериофаг, PAJU2, последовательность генома которого известна [23] и эволю-

ционная близость с D3 для которого постулирована, обладает меньшим сходством последовательности генома и, по-видимому, эволюционно более далек от D3, чем фаг фРМГ1. Более исчерпывающую информацию об эволюционной природе фага фРМГ1 и механизме образования ореола мы надеемся получить из проводимого полного секвенирования генома фага.

Поскольку свойства мурамидазы бактериофага D3 не были подробно описаны [22], в настоящей работе далее мы исследовали мурамилгидролазный фермент PMG MUR фага фРМГ1, продукт гена *pmgmur*, идентичного гену 31, кодирующему мурамидазу фага D3.

**Анализ последовательности PMG MUR.** Аминокислотная последовательность PMG MUR (рис. 2), рассчитанная на основе последовательности гена, продукт которого обладал пептидогликанлизирующей активностью, оказалась идентичной последовательности мурамидазы gp31 фага D3, также предсказанной в аннотации генома. Поиск гомологий в системах BLAST [24] и CDD [25] показал высокое сходство последовательности PMG MUR с мурамилгидролазами различных бактерий и бактериофагов, в том числе 55% идентичных аминокислотных остатков с лизоцимом бактериофага  $\lambda$ , структура которого известна [26, 27].

Было экспериментально показано [28], что лизоцим фага  $\lambda$  по механизму ферментативного действия относится к литическим трансгликозилазам (КФ 3.2.1.17). Эти ферменты расщепляют пептидогликаны клеточной стенки бактерии по  $\beta$ -1,4-гликозидной связи между *N*-ацетилмурамовой кислотой (MurNAc) и *N*-ацетилглюкозамином (GlcNAc) с образованием интермедиата 1,6-ангидро-MurNAc. Резонно предположить, что PMG MUR также относится к трансгликозилазам и что консервативный для известных трансгликозилаз остаток Glu25 формирует активный центр, а Tyr82 служит для координации субстрата.

**Экспрессия, выделение и свойства белка PMG MUR.** Для экспрессии гена *pmgmur* был создан плазмидный вектор на основе pQE30, содержащий сильный, хорошо регулируемый промотор фага T5 и фрагмент, кодирующий гексагистидиновую последовательность на *N*-конце синтезируемого белкового продукта. Рекомбинантный белок синтези-

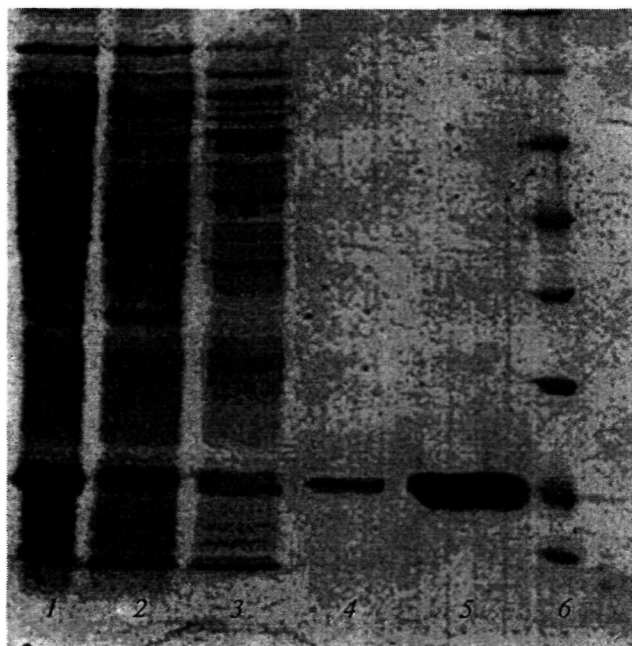


Рис. 3. Очистка рекомбинантного PMG MUR; контроль электрофоретический в 15% SDS-PAGE: клетки AD494(DE3) после индукции (1); материал, не связавшийся с Ni-аффинной колонкой (2); материал, неспецифично связавшийся с Ni-аффинной колонкой (3); очищенный PMG MUR (4); концентрированный очищенный PMG MUR (5); 6 - маркеры молекулярных масс (снизу вверх) 14.4, 18.4, 25, 35, 45, 66.2, 116 кДа (Fermentas).

руется в клетках *E. coli*, трансформированных плазмидой pQE30-*pmgmur*, в растворимом виде. Внесение N-концевой гексагистидиновой метки в процессе клонирования гена позволило провести очистку рекомбинантного PMG MUR удобным одностадийным методом аффинной хроматографии на Ni-сефарозе. Стандартный протокол очистки позволяет получить из 1 л. клеточной культуры *E. coli* около 15 мг белка чистоты >90% (по результатам SDS-PAGE) (рис. 3). Рекомбинантный белок

Зависимость активности PMG Lys от pH и ионной силы (%)

Ионная сила NaCl, mM	pH					
	5	5.6	6.2	6.8	7.4	8
40	2	4	15	19	26	10
60	3	7	21	25	32	28
80	5	10	20	24	25	24
100	14	17	67	54	92	32
120	37	66	88	100	88	54
140	37	78	85	80	73	39
160	49	69	81	77	66	34
180	21	12	78	70	36	23

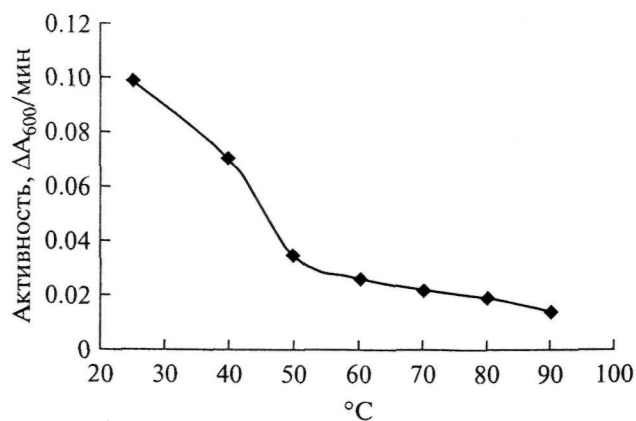


Рис. 4. Термостабильность PMG MUR. Образцы белковых препаратов нагревали в течении 10 мин и затем охлаждали во льду. Активность фермента измеряли при 25°C.

PMG MUR ( $M_w$  18.4 кДа) растворим в буфере A (20 mM Tris-HCl, pH 8) с 200 mM NaCl и стабилен в данном растворе до концентраций > 12 мг/мл. Гель-фильтрация на калиброванной колонке Toyopearl HW-55 показала, что белок в растворе представляет собой мономер (элюция пика с расчетной массой 21.2 кДа (данные не приведены), что хорошо соотносится с расчетной мол. массой 18.4 кДа, определенной по аминокислотной последовательности. Анализ последовательности PMG MUR с помощью алгоритма 3D-PSSM [29] показывает преимущественно содержание  $\alpha$ -спиральной конформации белка. Эти результаты хорошо согласуются с пространственной моделью лизоцима бактериофага  $\lambda$  [26, 27] и данными спектра КД, анализ которого показал, что 47% остатков PMG MUR находятся в  $\alpha$ -спиральной конформации.

**Ферментативная активность и специфичность.** PMG MUR эффективно разрушает препарат бактерий *P. aeruginosa*, обработанных хлороформом. Показано, что оптимум воздействия PMG MUR на клеточные стенки *P. aeruginosa* находится в пределах значений pH 6-8 и ионной силы, соответствующей 120 mM NaCl. (табл. 1). Белок не термостабилен и быстро теряет активность при нагревании выше 40°C (рис. 4).

Активность рекомбинантного PMG MUR по отношению к клеточным стенкам *P. aeruginosa* была определена из линейного участка зависимости скорости реакции гидролиза  $\beta$ -1,4-гликозидной связи между N-ацетилмурамовой кислотой (MurNAc) и N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) от количества фермента (см. экспер. часть) и составляет  $2310000 \pm \pm 30000$  U/г, что в 277 раз превышает активность лизоцима белка куриного яйца и в 11 раз – активность другой известной *Pseudomonas*-специфической трансгликозилазы, gp144 бактериофага phiKZ [30, 31]. Высокая цитолитическая активность белка мо-



жет служить отражением универсальной роли единственного ПЛФ в составе генома фага фРМГ1 (по аналогии с D3). С другой стороны, PMG MUR оказывает лишь бактериостатическое действие на растущие клетки *P. aeruginosa*, то есть более оптимизирована в качестве эндофермента, задействованного на заключительной стадии инфекции – “лизиса изнутри”.

Роль и механизм действия фермента при локальном разрушении клеточной стенки в начале инфекционного цикла остается невыясненной. Действие PMG MUR на клетки *P. aeruginosa* высокоспецифично, что характерно также для гомологичного лизоцима фага  $\lambda$  [27], где высокая специфичность вызвана точной стерической ориентацией субстрата в активном центре фермента [28].

При синтезе рекомбинантного белка в *E. coli* и накоплении его в цитоплазме лизиса клеток не происходило. Косвенно этот факт подтверждает отсутствие в системе гена вспомогательного порообразующего белка (холина), который обычно перекрывает ген литического фермента или находится внутри него. При этом, цитотоксический эффект на клетки, в которых происходит индукция, ярко выражен [32]. Таким образом, вопрос о наличии и местонахождении гена холина в геномах D3-подобных фагов остается открытым [22].

Многие клинические штаммы бактерии *P. aeruginosa* содержат генетический материал в виде плазмид, который ограничивает развитие фагов. Нами была выделена группа бактериофагов, способная преодолевать супрессирующий эффект различных плазмид, в том числе и плазмиды рМГ1 из группы несовместимости IncP2 [18]. С учетом этого факта, а также очевидности того, что рано или поздно в ходе широкого использования фаготерапии возможность выделять новые истинно вирулентные фаги будет исчерпана, возрастание интереса к использованию в фаготерапии также и неревертирующих вирулентных мутантов умеренных фагов, в том числе и таких как фРМГ1 вполне объяснимо.

Выделенный бактериофаг *P. aeruginosa* фРМГ1 принадлежит к виду умеренных D3-подобных фагов, но при этом обладает признаками, которые предполагают возможность его использования в составе фаготерапевтических смесей. Он утратил способность к лизогенизации бактерий и, кроме того, представляет интерес с точки зрения выделения и изучения ферментов, разрушающих пептидогликаны клеточных стенок.

Идентификация и исследование новых цитолитических ферментов, способных разрушать патогенные бактерии – достаточно актуальная задача для биотехнологии, медицины и пищевой промышленности. В частности, важным источником таких белков служат бактериофаги, которые используют ПЛФ в осуществлении своего жизненного цикла. Описанная в этой работе рекомбинантная

трансгликозилаза PMG MUR литического бактериофага фРМГ1 проявляет высокую активность в достаточно широком диапазоне условий и обладает высокой специфичностью к псевдомонадам. Эти свойства позволяют рассматривать ее как потенциально перспективный объект (в комбинации с другими агентами, обеспечивающими доступ фермента к клеточной стенке) для медицинских и технологических приложений.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Бактериофаг, клеточные культуры и реактивы.

Бактериофаг *P. aeruginosa* фРМГ1 был выделен из пробы воды, взятой из пруда в г. Егорьевске Московской области. В работе использовали следующие штаммы бактерий: *P. aeruginosa* PAO1 (получен от проф. В. Holloway, Австралия) и клинический изолят N44, стабильно продуцирующий алгинат (M. Vaneechoutte, Бельгия), штаммы *Escherichia coli* NovaBlue, AD494(DE3) (Novagen, США), и WK6 из коллекции лаборатории. Для клонирования использовали плазмидные векторы рЕТBlue1 (Novagen, США) и рQE-30 (Qiagen, Германия). В работе использовали ферменты производства Fermentas, Литва, реактивы Sigma (США), Fluka (Швейцария) и Хеликон (Россия). Для хроматографических экспериментов использовали смолы HiTrap Chelating (GE Healthcare, США) и Toyopearl HW-55 (Tosoh Bioscience, Япония).

**Получение препарата бактериофага.** Размножение фага в титре проводили на штамме *P. aeruginosa* PAO1 [33] в жидкой среде LB. Исследование ореола, образованного бактериофагом, проводили согласно работе [18]. Для концентрирования и очистки препарата фага использовали метод ультрацентрифугирования в градиенте CsCl. Выделение ДНК фага, обработку эндонуклеазами, электрофорез в агарозном геле проводили стандартными методами [33]. Разделение структурных белков бактериофага осуществляли в полиакриламидном геле с окрашиванием Coomassie Blue [34].

**Электронная микроскопия.** Изображения бактериофагов получали с помощью микроскопа JEOL-100 после негативного контрастирования образцов фага 2% уранилацетатом [35].

**Создание экспрессионной библиотеки генома фРМГ1.** Очищенную фаговую ДНК фрагментировали обработкой ультразвуком в (Techpan MD20, Польша) и разделяли электрофорезом на 0.7% агарозном геле. Фрагменты, размером 1500–2500 п.о. вырезали из геля и проводили концевую надстройку, используя смесь из фрагмента Кленова и T4-полимеразы. Обработанные фрагменты лигировали в сайт EcoRV вектора рЕТBlue1 с последующей трансформацией клеток *E. coli* NovaBlue. Более 70% клонов созданной библиотеки содержали вставки под контролем индуцируемого T7-промотора. Ин-

дивидуальные клоны инокулировали в 200 мкл среды LB/amp, по достижению оптического поглощения среды, равного  $\sim 0.6$  ( $\lambda$  600) синтез закодированных во вставках библиотеке белков индуцировали добавлением изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид (IPTG) до концентрации 1 мМ, и инкубировали при интенсивной аэрации 3 ч при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием, осадок ресуспендировали в 100 мкл 10 мМ Tris-HCl, pH 7.2, разрушали многократным замораживанием-оттаиванием, и отделяли лизат центрифугированием 10 мин при 7000 g. Лизат использовали для определения полисахарид- и пептидогликандеградующей активности.

#### Частичное секвенирование ДНК фага PMG1.

Плазмиды из индивидуальных клонов библиотеки выделяли стандартными методами [33] и секвенировали, используя фланкирующие праймеры для вектора pETBlue, в капиллярном секвенаторе ABI 3730xl (Applied Biosystems, США). После предварительного объединения секвенированных последовательностей в контиги (программа Sequencher 4.1, Genecodes), был проведен поиск сходства с использованием стандартных анализов с помощью BLASTn и BLASTx, соответственно, для выявления сходства последовательностей нуклеотидов и белков с последовательностями, представленными в избыточной (nt/nr) базе данных NCBI [24].

**Клонирование гена, выделение и очистка рекомбинантного белка.** ПЦР-амплификацию гена *pmgmur* и молекулярное клонирование проводили с помощью стандартных методов [33]. Для ПЦР использовали очищенную ДНК фага фPMG1 и праймеры PMGL/Fwd (5' CCGCCGGGATCCGTTGTTC-CGAGAA) и PMGL/Rev (5' AGCGCAAGCTTATGATCACGACAGCA), которые фланкируют последовательность гена ПЛФ бактериофага фPMG1 и содержат участки эндонуклеаз рестрикции BamHI и HindIII соответственно (подчеркнуты). Продукт амплификации (501 п.о.) обрабатывали эндонуклеазами и клонировали в вектор экспрессии pQE-30 по тем же участкам рестрикции. Наличие, ориентацию и последовательность вставки в плазмиде проверяли рестрикционным анализом и секвенированием.

Синтез белка PMG MUR, содержащего N-концевую полигистидиновую метку (His-tag), в клетках *E. coli* AD494(DE3) индуцировали добавлением 1 мМ IPTG с последующей инкубацией в течение 4 ч при 37°C. Клетки осаждали, ресуспендировали в 30 мл 20 мМ Tris pH 8.0 (буфер А) с 200 мМ NaCl, разрушали ультразвуком и удаляли фрагменты клеточных мембран центрифугированием. Растворимый белок выделяли из лизата с помощью Ni-аффинной хроматографии (HiTrap Chelating, колонка 5мл). Элюцию белка проводили в ступенчатом градиенте концентрации имидазола (0–60–200 мМ) в буфере А с 200 мМ NaCl. Далее белок диализовали против буфера А с 50 мМ NaCl, концентрировали с

помощью Centricon 10 (Millipore, США) и хранили при  $-70^\circ\text{C}$ . Содержание белка во фракциях и степень очистки проверяли с помощью SDS-PAGE-электрофореза [34]. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта и набор реактивов BioRad (США).

**Определение молекулярной массы белка.** Олигомерное состояние белка PMG MUR определяли с помощью аналитической геле-фильтрации. Препарат очищенного белка в концентрации 5 мг/мл наносили на колонку Toyopearl HW-55 1  $\times$  30 см, уравновешенную буфером А с 50 мМ NaCl, и элюировали со скоростью 0.2 мл/мин. Предварительно колонку калибровали стандартами белков ( $M$ , кДа): альдолаза (158), бычий сывороточный альбумин (66), яичный альбумин (45), цитохром С (12). По графику зависимости логарифма молекулярной массы белка от объема элюции определяли наблюдаемую молекулярную массу белка, равную  $21.2 \pm \pm 0.3$  кДа.

**Спектроскопия кругового дихроизма.** КД-спектры белка PMG MUR снимали с помощью спектрополяриметра JASCO J-500 (Япония) в 10 мМ Na-фосфатном буфере pH 7.5 при комнатной температуре. Расчет содержания вторичной структуры проводили по методу Провенчера [36] с использованием программы Selcon [37].

**Определение полисахариддеградующей активности.** В качестве субстрата для измерения активности использовали свободный полисахарид, продуцируемый штаммом N44, выделенный по методу, описанному в работе [38], и натриевую соль альгиновой кислоты (Sigma, США). Для определения альгиновой активности в лизатах библиотеки клонов использовали модифицированный метод [39] с окрашиванием цетилпиридинийхлоридом. Для определения активности в целых вирусных частицах использовали колориметрический тиобарбитуратный метод Вайсбаха-Гурвица [40] и мониторинг изменения поглощения на 235 нм [41]. В качестве положительного контроля использовали альгинат-лиазу *Flavobacterium spp.* (Sigma).

**Определение пептидогликанлизирующей активности.** В качестве субстратов для измерения активности использовали лиофилизированные клетки *Micrococcus lysodeikticus* (Fluka, Швейцария), а также клетки *P. aeruginosa* (PAO1) и *E. coli* (WK6), обработанные хлороформом для удаления внешней клеточной мембраны [42]. Клетки на стадии экспоненциального роста ( $\sim A_{600} 0.6$ ) в среде LB осаждали центрифугированием (4000 g, 15 мин, 4°C). Осадок клеток ресуспендировали в 50 мМ Tris-буфере pH 7.8, насыщенном хлороформом. После инкубации в течение 45 мин при комнатной температуре протопласты выделяли центрифугированием (4000 g, 15 мин, 4°C), промывали и ресуспендировали в 10 мМ фосфатном буфере (pH 6–8) или ацетат-

ном буфере (рН 4–5) до поглощения  $A_{600}$  0.6–1.0. К 270 мкл пробам суспензии клеток, помещенным в 96-луночный планшет, добавляли 0.30 мкл пробы белка или лизата клеток индуцированного клона библиотеки и измеряли уменьшение оптического поглощения  $A_{600}$  на планшетном спектрофотометре Wallac 1420 Viktor (Perkin Elmer-Labsystems, Финляндия) при комнатной температуре. Обработку результатов проводили с помощью программы Activity Calculator (<http://www.biw.kuleuven.be/Logt/ActivityCalculator.htm>) [43], используя отрицательные и положительные (HEWL 70000 U/мг (Sigma) контроли. Единица (1U) активности соответствует линейному падению оптического поглощения  $A_{600}$  на 0.001 /мин. Количественно ферментативную активность белка определяли последовательным разбавлением фермента и определением области линейной корреляции между активностью и концентрацией [44].

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 07-04-12066-офи и РФФИ 07-04-12224-офи; авторы благодарят сотрудников ИБХ В.А. Кадыкова – за помощь в электронной микроскопии, и М.В. Фильщикова – за участие в секвенировании ДНК.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gorski A., Miedzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Lobočka M., Fortuna W., Letkiewicz S., Zimecki M. // *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 2009. V. 10. P. 766–774.
- Крылов В.Н. // *Генетика*. 2001. Т. 37. С. 869–887.
- O'Flaherty S., Ross R.P., Coffey A. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2009. V. 33. P. 801–819.
- Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C.Q. // *J. Appl. Microbiol.* V. 104. P. 1–13.
- Otto M. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006. V. 306. P. 251–258.
- Malnoy M., Faize M., Venisse J.S., Geider K., Chevreau E. // *Plant Cell Rep.* 2005. V. 23. P. 632–638.
- Mushtaq N., Redpath M.B., Luzio J.P., Taylor P.W. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2005. V. 56. P. 160–165.
- Alkawash M.A., Sothill J.S., Schiller N.L. // *APMIS*. 2006. V. 114. P. 131–138.
- Baker J.R., Dong S., Pritchard D.G. // *Biochem. J.* 2002. V. 365. P. 317–322.
- Linnerborg M., Weintraub A., Albert M.J., Widmalm G. // *Carbohydr. Res.* 2001. V. 333. P. 263–269.
- Scholl D., Rogers S., Adhya S., Merrill C.R. // *J. Virol.* 2001. V. 75. P. 2509–2515.
- Castillo F.J., Bartell P.F. // *J. Virol.* 1976. V. 18. P. 701–708.
- Glonti T., Chanishvili N., Taylor P.W. // *J. Appl. Microbiol.* 2009. V. 108. P. 695–702.
- Sillankorva S., Oliveira R., Vieira M.J., Sutherland I.W., Azeredo J. // *Biofouling*. 2004. V. 20. P. 133–138.
- Sillankorva S., Neubauer P., Azeredo J. // *BMC Biotechnol.* 2008. V. 8. P. 79–86.
- Kropinski A.M., Prangishvili D., Lavigne R. // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 2775–2777.
- Gilakjan Z.A., Kropinski A.M. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 7221–7227.
- Шабурова О.В., Крылов С.В., Вейко В.П., Плетнева Е.А., Буркальцева М.В., Мирошников К.А., Корнелиссен А., Лавогн Р., Сыкилинда Н.Н., Кадыков В.А., Месянжинов В.В., Волкарт Г., Крылов В.Н. // *Генетика*. 2009. Т. 45. С. 185–195.
- Williams P. // *Microbiol.-Sgm.* 2007. V. 153. P. 3923–3938.
- Fu X., Liu P., Lin L., Hong Y., Huang X., Meng X., Liu Z. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009. V. 160. P. 1627–1636.
- Ueda M., Ohata K., Konishi T., Sutrisno A., Okada H., Nakazawa M., Miyatake K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 81. P. 1077–1085.
- Kropinski A.M. // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. P. 6066–6074.
- Uchiyama J., Rashel M., Matsumoto T., Sumiyama Y., Wakiguchi H., Matsuzaki S. // *Virus Res.* 2009. V. 139. P. 131–134.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3389–3402.
- Marchler-Bauer A., Anderson J.B., Cherukuri P.F., DeWeese-Scott C., Geer L.Y., Gwadz M., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Ke Z., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Lu F., Marchler G.H., Mullokandov M., Shoemaker B.A., Simonyan V., Song J.S., Thiessen P.A., Yamashita R.A., Yin J.J., Zhang D., Bryant S.H. // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. P. 192–196.
- Evrard C., Fastrez J., Declercq J.P. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 276. P. 151–164.
- Leung A.K.W., Duwel H.S., Honek J.F., Berghuis A.M. // *Biochemistry*. 2005. V. 40. P. 5665–5673.
- Jespers L., Sonveaux E., Fastrez J. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 228. P. 529–538.
- Kelley L.A., Maccallum R.M., Sternberg M.J. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 299. P. 499–540.
- Briers Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagaert S., Michiels C.W., Hertveldt K., Lavigne R. // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 65. P. 1334–1344.
- Мирошников К.А., Файзулина Н.М., Сыкилинда Н.Н., Месянжинов В.В. // *Биохимия*. 2006. Т. 71. С. 300–305.
- Loessner M.J., Gaeng S., Scherer S. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 4450–4460.
- Sambrook R., Russel D.W. // *Cold Spring harbor. N.Y.* 2001.
- Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V.227. P. 680–685.
- Bozzola J.J., Russell L.D. // *Sandbury, Massach.* 1998.
- Provencher S.W., Glockner J. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. P. 33–37.
- Sreerama N., Woody R.W. // *Anal. Biochem.* 1993. V. 209. P. 32–44.

38. Bartell P.F., Orr T.E., Chudio B. // Infect. Immun. 1970. V. 2. P. 543–548.
39. Gacesa P., Wusteman F.S. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 2265–2267.
40. Cheng X., Zhang X., Pflugrath J.W., Studier F.W. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 4034–4038.
41. Weissbach A., Hurwitz J. // J. Biol. Chem. 1959. V. 234. P. 705–709.
42. Suzuki H., Suzuki K., Inoue A., Ojima T. // Carbohydrate Res. 2006. V. 341. P. 1809–1819.
43. Jensen H.B., Kleppe K. // Eur. J. Biochem. 1972. V. 26. P. 305–312.
44. Briers Y., Lavigne R., Volckaert G., Hertveldt K. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2007. V. 70. P. 531–533.

### The Properties of the *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage $\phi$ PMG1

O. V. Chertkov\*, R. N. Chuprov-Netochin\*, S. V. Legotsky\*\*, N. N. Sykilinda\*, M. M. Shneider\*, M. A. Ivanova\*, E. A. Pleteneva\*\*\*, O. V. Shaburova\*\*\*, M. B. Bourkaltseva\*\*\*, E. S. Kostrjukova\*\*\*\*, V. N. Lazarev\*\*\*\*, N. L. Klyachko\*\*, and K. A. Miroshnikov\*\*

\*Phone +7 (495) 335-5588, fax +7 (495) 336-6022, e-mail: kmi@ibch.ru

\* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Ul. Miklukho-Maklaya, 16/10 117997 Moscow, Russia

\*\*M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, 119992 Moscow.

\*\*\* State Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 117545 Moscow.

\*\*\*\* Institute of Physico-Chemical Medicine, 119992, Moscow.

The properties of the isolated *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage  $\phi$ PMG1 include the lytic infection cycle, and the formation of a broad halo (semi-transparent zone) around the plaques. We consider  $\phi$ PMG1 as a potential member of therapeutic cocktails of live phages, and as a source of peptidoglycan and lipopolysaccharide degrading enzymes. Partial sequencing of  $\phi$ PMG1 genome has revealed high similarity with known temperate *P. aeruginosa* phage D3. An open reading frame encoding lytic transglycosylase was identified in the genome. This enzyme PMG MUR was obtained in recombinant form, and its activity and substrate specificity has been studied.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; bacteriophage; peptidoglycan-lysing enzyme (lysin); transglycosylase.