

Межфакультетский учебный курс
«Микроорганизмы, ферменты и медицина. Новые возможности»

ENZYBIOTICS

Еремеев Николай Леонидович
доктор химических наук, профессор

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
Химический факультет, кафедра химической энзимологии*

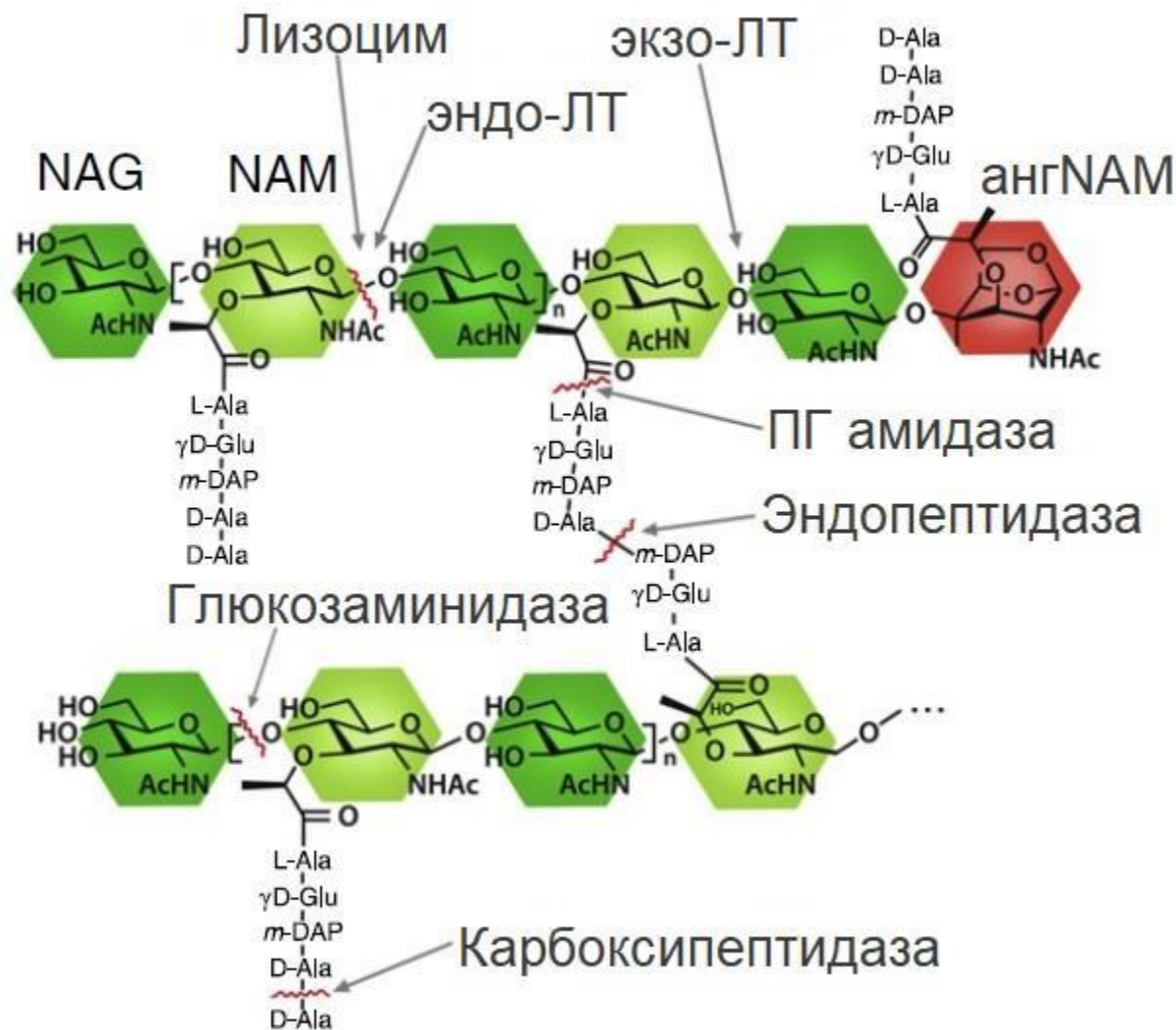
nleremeev@gmail.com

Бактериолитические ферменты – это ферменты, способные лизировать (разрушать) клеточную стенку (пептидогликан) бактерий.

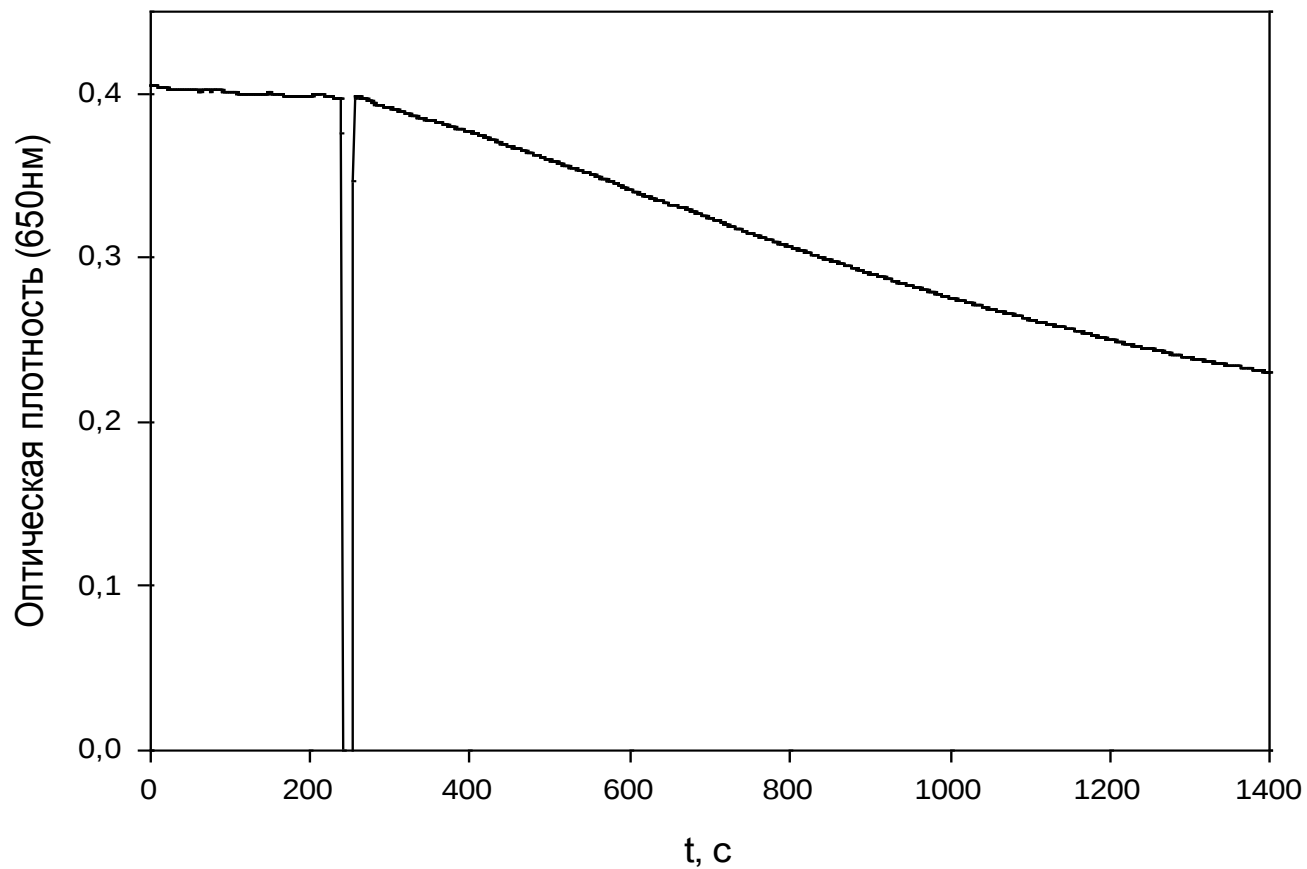
Автолизины – собственные ферменты, присутствующие в бактериях и участвующие в образовании и распаде клеточной стенки;

Эндо- и экзолизины – ферменты жизненного цикла бактериофагов;

Внеклеточные ферменты, выделяемые в окружающую среду для защиты от бактерий.



ПГ – пептидогликан, ЛТ – литические трансгликозилазы



Типичная кривая изменения оптической плотности клеточной суспензии в ходе ферментативного лизиса

Nelson, D.; Loomis, L.; Fischetti, V.A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, v.98, p.4107–4112



Schuch, R.; Nelson, D.; Fischetti, V.A. A bacteriolytic agent that detects and kills Bacillus anthracis. – Nature, 2002, v.418, p.884–889

В 2015 году две компании — ContraFect и Intron Biotechnology — находились на первой стадии клинических испытаний различных лизинов бактериофагов против *S. aureus*. На 2018 год только ContraFect выходит на вторую стадию клинических испытаний лизина CF-301, охарактеризованного в лаборатории Fischetti как PlySs2.

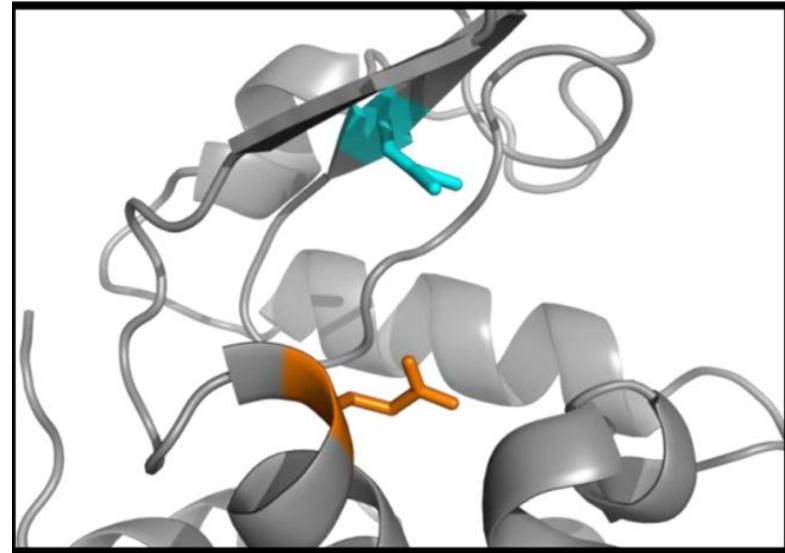
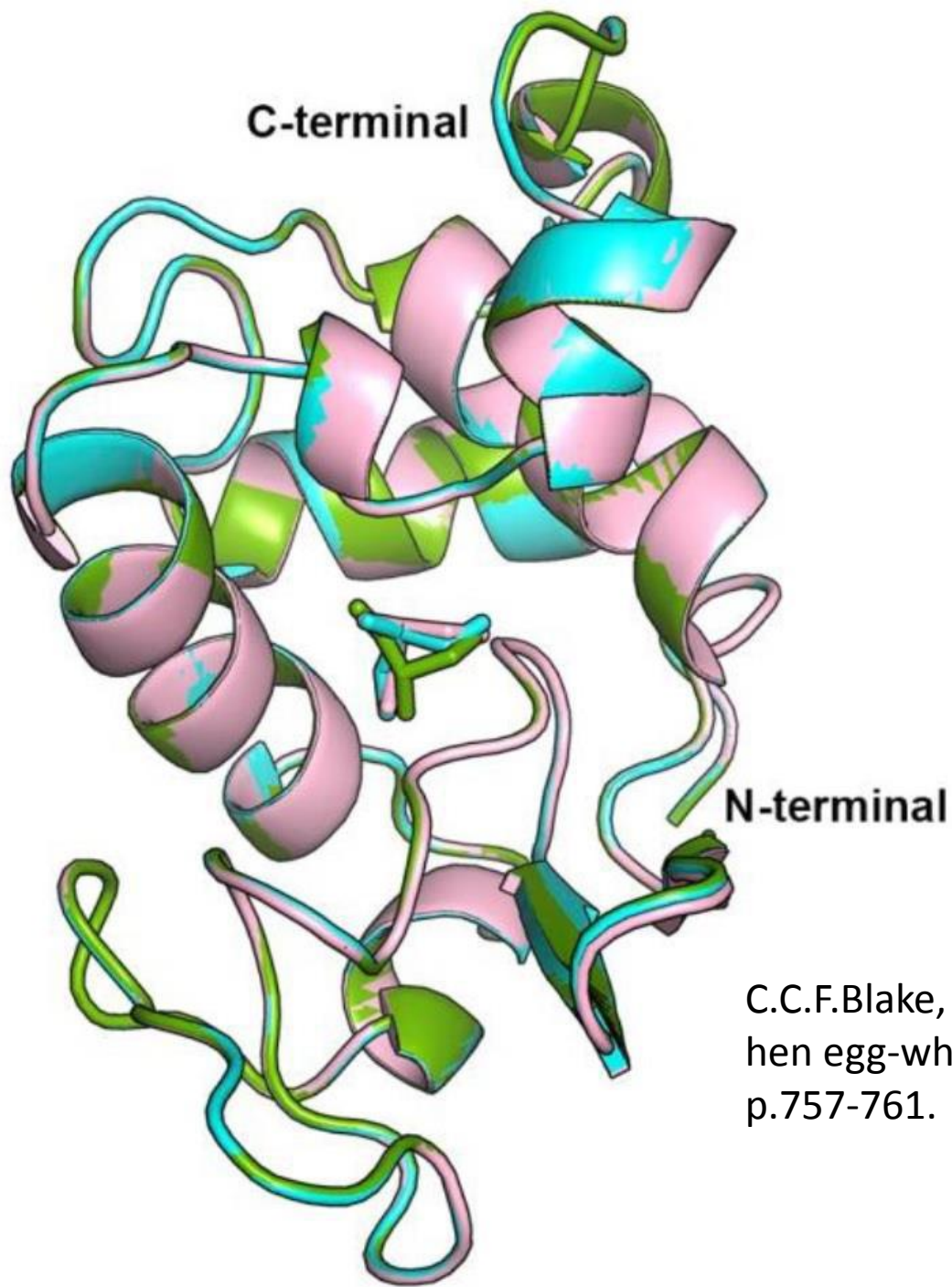
V.A.Fichetti. Development of Phage Lysins as Novel Therapeutics: A Historical Perspective. – Viruses, 2018, 10, 310; doi:10.3390/v10060310

Лизоцим - бактериолитический фермент класса гидролаз (КФ 3.2.1.17, систематическое название – мукопептид-N-ацилмурамоилгидролаза), катализирующий гидролиз 1,4- β -связей между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина



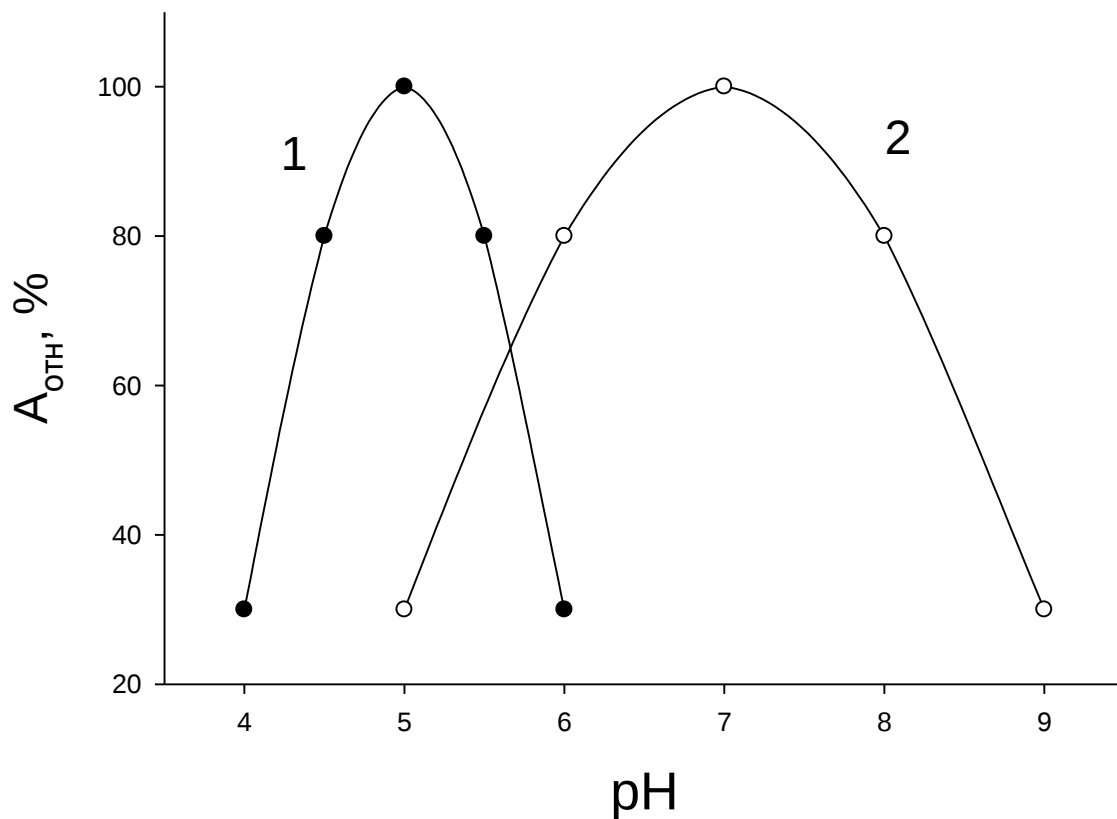
A. Fleming. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. – J. Biol. Chem., 1922, pp. 306–317

P. Laschtschenko “Über die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung Hühnereiweiß. - Z. Hyg. InfektKrankh. 1909, vol. 64, pp. 419–427



C.C.F.Blake, D.F.Koenig, G.A.Mair et al. Structure of hen egg-white lysozyme. – Nature, 1965, v.206, p.757-761.

В интервале рН от 4,5 до 10,5 стенка заряжена отрицательно.



рН-зависимости гидролиза лизоцимом незаряженного хитина (кривая 1) и лизиса клеток *Micrococcus lysodeicticus* под действием лизоцима (кривая 2).

Рассчитано по:

C.C.F.Blake, G.A.Mair, A.C.T.North, D.S.Phyllips, U.R.Sarma - Proc. Roy. Soc., B., 1967, v. 167, p. 365.

А.А.Клесов, М.Л.Рабинович, И.В.Березин. — Биоорган. Химия, 1976. т. 2, N 6, с.795.

рН-оптимум действия лизоцима при лизисе различных бактериальных клеток

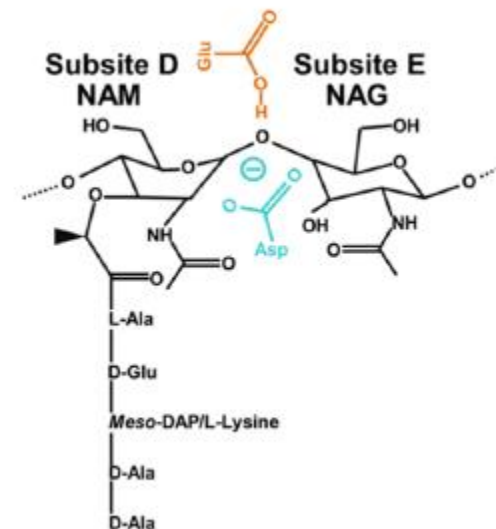
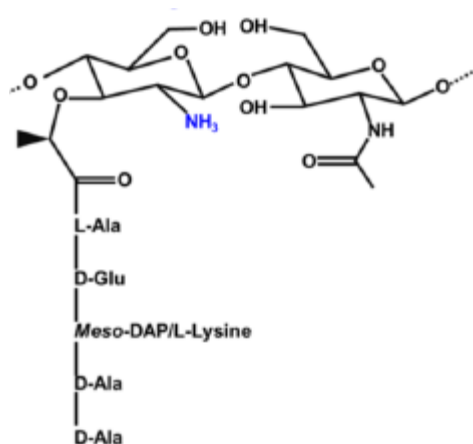
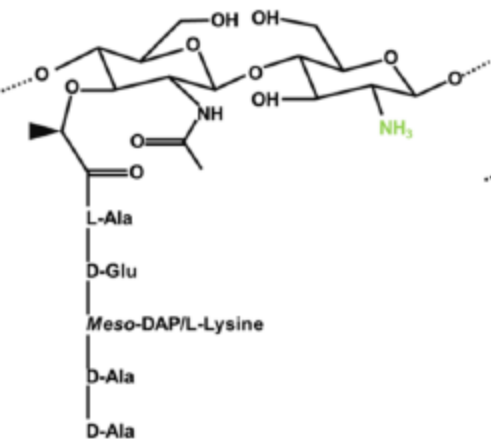
<i>Alcaligenis faecalis</i>	6,4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6,7
<i>Streptococcus agalactiae</i>	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	7,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,7
<i>Bacillus mycoides</i>	8,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	8,4
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	8,5
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Bacillus megaterium</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8,7
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Micrococcus luteus</i>	8,8

Субстратная специфичность лизоцима

<i>Escherichia coli</i>	100
<i>Micrococcus luteus</i>	75
<i>Bacillus subtilis</i>	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17,5
<i>Serratia marcescens</i>	15,4
<i>Bacillus mycoides</i>	9,4
<i>Bacillus cereus</i>	9,4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,8
<i>Bacillus megaterium</i>	5,4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,7
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3,3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3,0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2,9
<i>Proteus vulgaris</i>	1,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,3
<i>Alcaligenis faecalis</i>	1,3

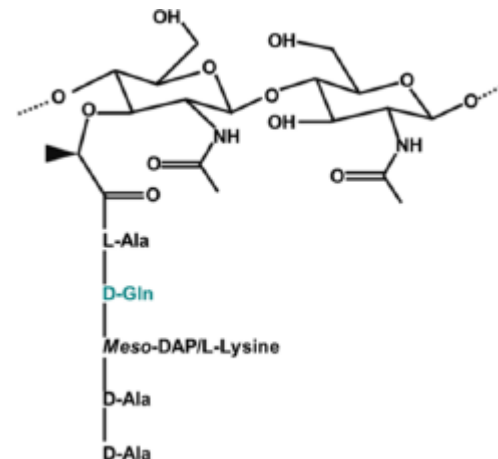
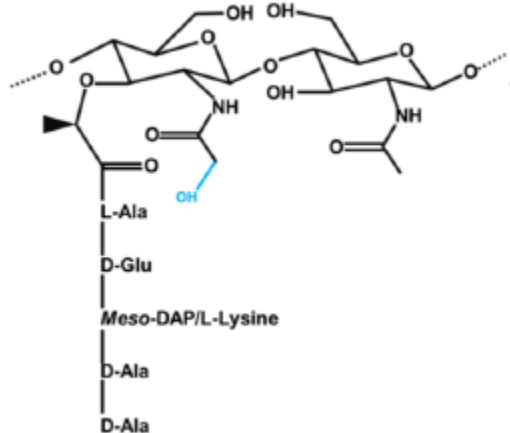
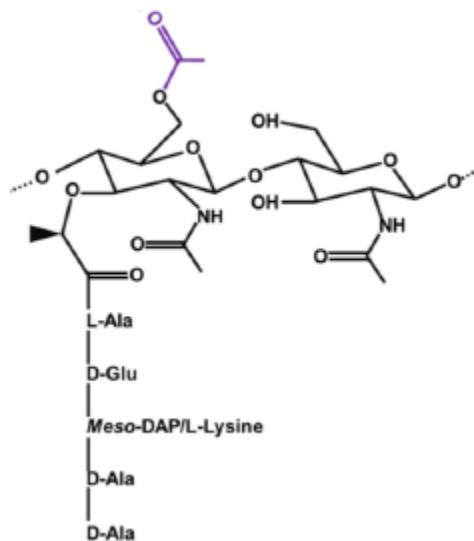
P.A.Levashov, E.D.Ovchinnikova, O.A.Morozova et al. Human interleukin-2 and hen egg white lysozyme: screening for bacteriolytic activity against various bacterial cells. – Acta Naturae, 2016, v.8, p.98-102

Защитные механизмы бактерий от лизиса лизоцимом



Деацетилирование NAG

Деацетилирование NAM



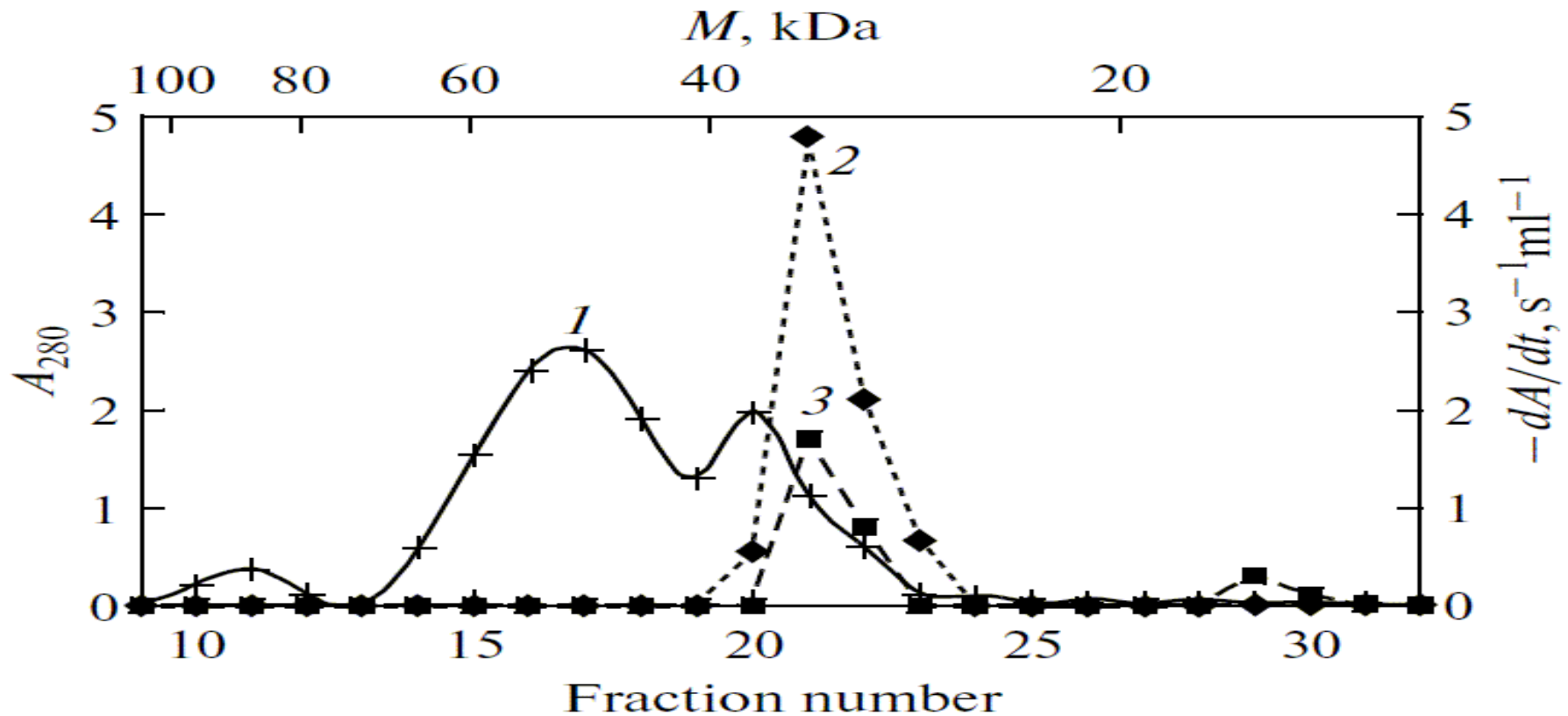
О-ацетилирование NAM

N-гликозирование NAM

Амидирование
глутаминовой кислоты

Эндогенные бактериолитические факторы

Хроматография белков плазмы крови барана на колонке Sephadex G75.
 На осях: (1) A_{280} , (2) активность в отношении *Micrococcus luteus*,
 (3) активность в отношении *Escherichia coli*.
 Один из бактериолитических агентов – интерлейкин-2.

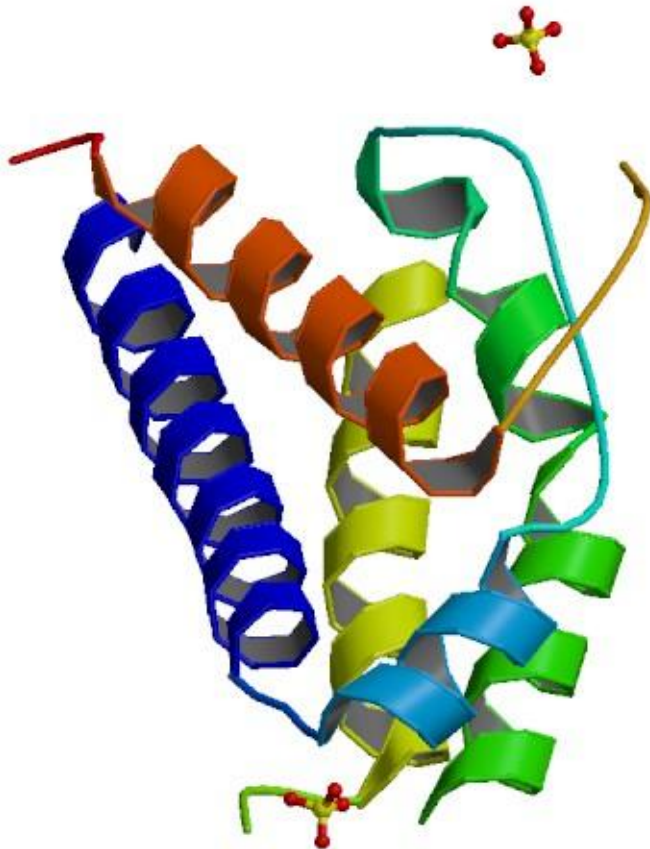


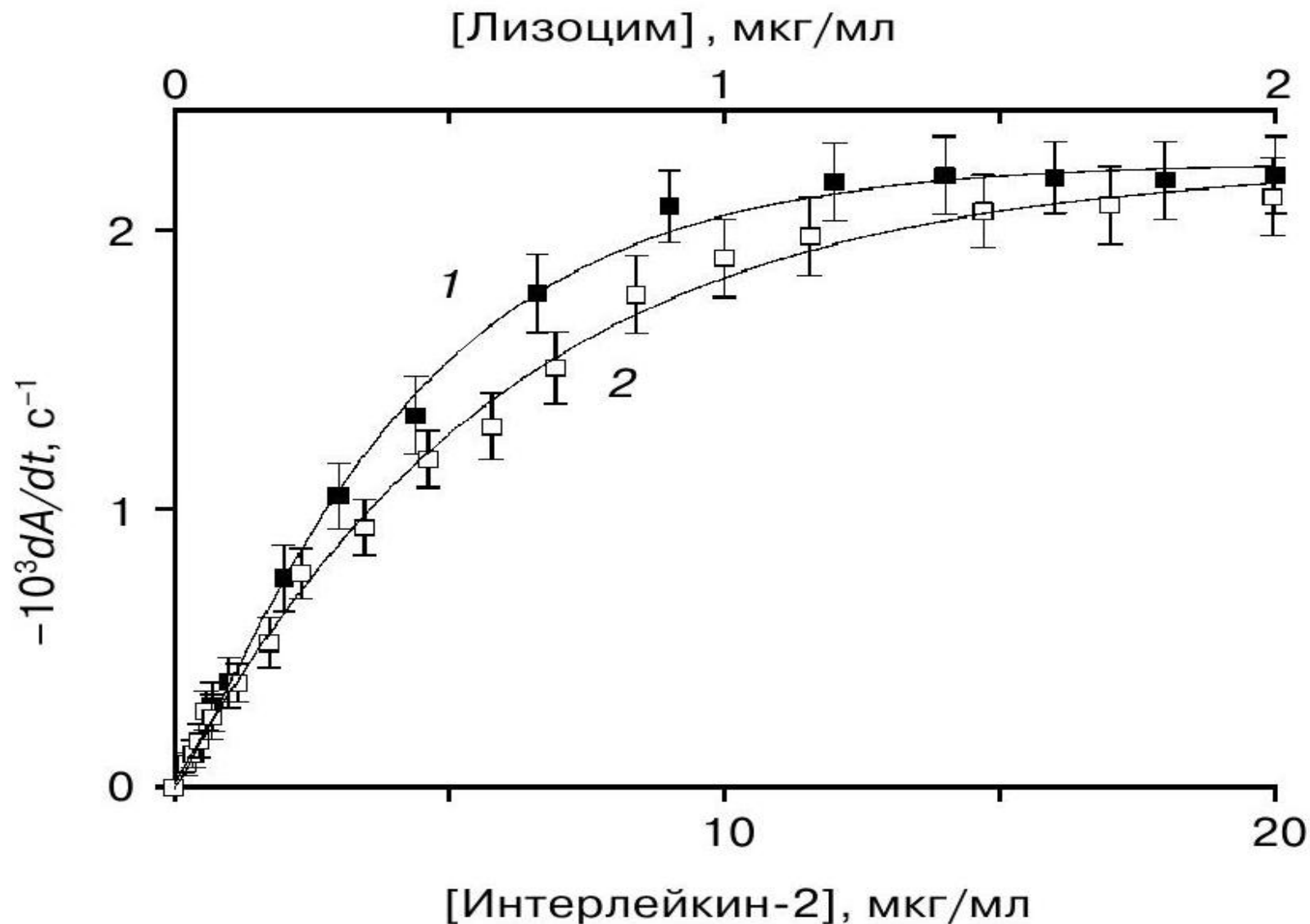
С.А.Седов, Н.Г.Белогурова, С.В.Шиповсков и др. Бактериолитические ферменты из плазмы крови барана. – Биорг. химия, 2012, т.38, с.315-323

Интерлейкин 2 – белок-цитокин, часть иммунной системы человека

Лекарственное средство для лечения онкологических заболеваний

Обладает бактериолитической активностью (!!!)





П.А.Левашов, Д.А.матолыгина, Е.Э.Осипова и др. Сравнение бактериолитической
 Активности интерлейкина-2 человека и яичного куриного лизоцима на клетках
Lactobacillus plantarum и *Escherichia coli*. – Вестник МГУ, Сер.2, Химия, 2015, т.56, с. 359-364

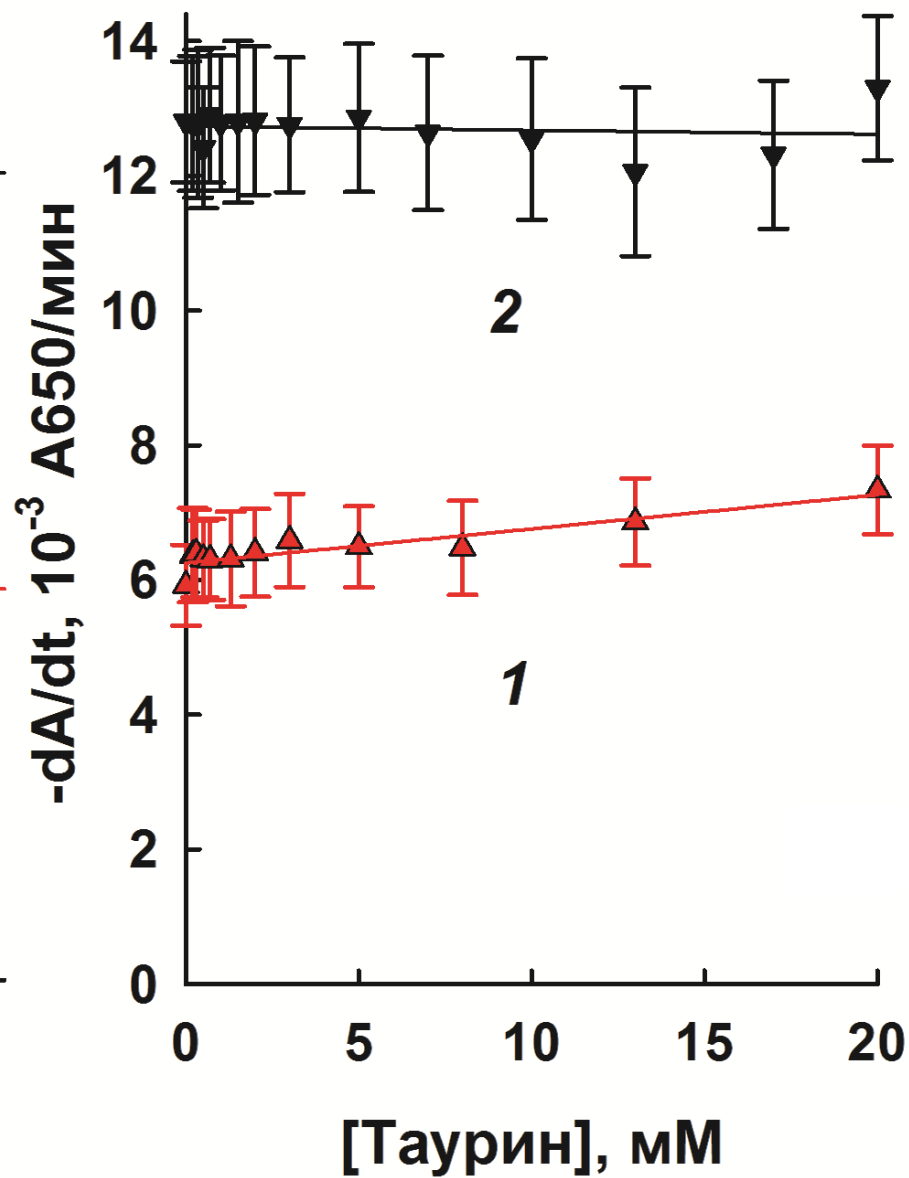
Субстратная специфичность интерлейкина-2 человека
(рН-оптимумы бактериолитической активности совпадают с рН-оптимумами лизоцима)

<i>Enterobacter aerogenes</i>	100
<i>Escherichia coli</i>	20,5
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	14,9
<i>Bacillus megaterium</i>	10,4
<i>Bacillus mycoides</i>	9,2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	8,1
<i>Serratia marcescens</i>	4,4
<i>Bacillus cereus</i>	1,1

P.A.Levashov, E.D.Ovchinnikova, O.A.Morozova et al. Human interleukin-2 and hen egg white lysozyme: screening for bacteriolytic activity against various bacterial cells. – Acta Naturae, 2016, v.8, p.98-102

Активация бактериолитических ферментов биологически активными веществами

P.A.Levashov, D.A.Matolygina, E.D.Ovchinnikova et al. Bacteriolytic activity of human interleukin-2, chicken egg lysozyme in the presence of potential effectors. - Acta Naturae, 2017, v.9, p.82-87



Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2)
от концентрации таурина

БАВ, не влияющие на скорость лизиса

Интерлейкин-2

Лизоцим

Фенилаланин

Тирозин

Триптофан

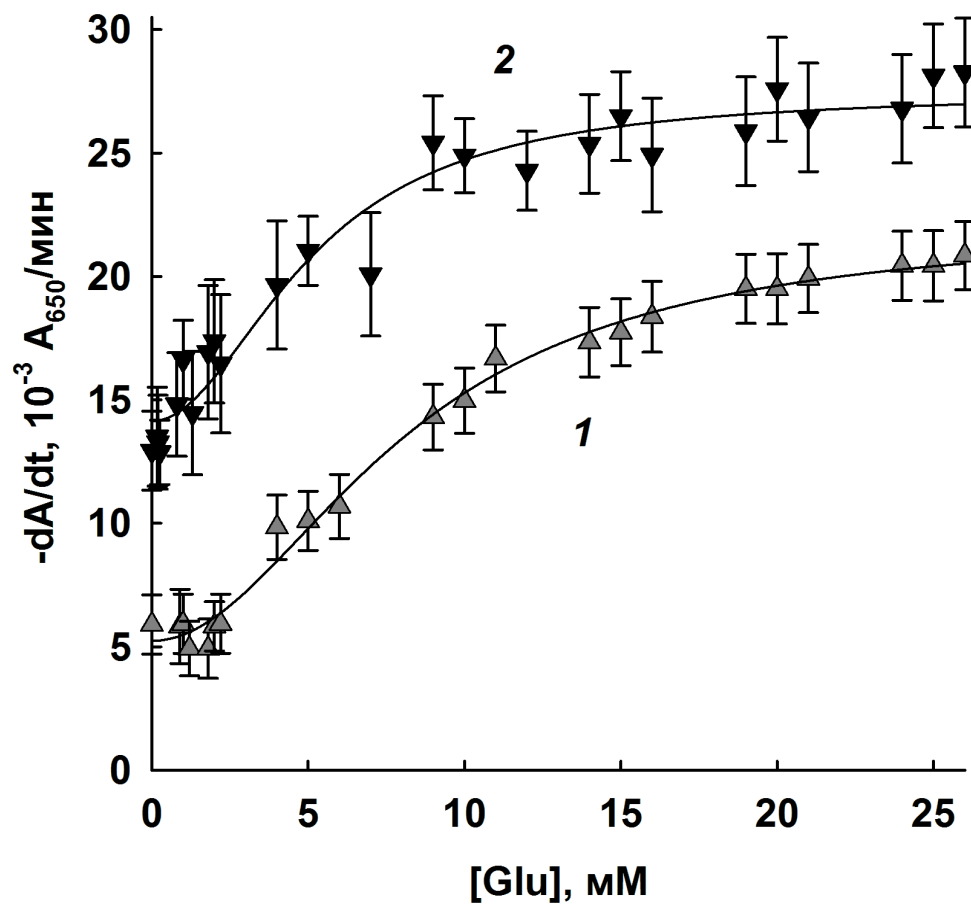
Таурин

Глицин

Лизин

Тирамин

Милдронат



Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации глутамата.

БАВ, вызывающие гиперболическое возрастание скорости лизиса

Интерлейкин-2

Лизоцим

Концентрация
БАВ, мМ

Максимальный
эффект, %

Концентрация
БАВ, мМ

Максимальный
эффект, %

Аргинин

10-15

200

5-10

200

Глутамат

15-20

350

10-15

200

Тирамин

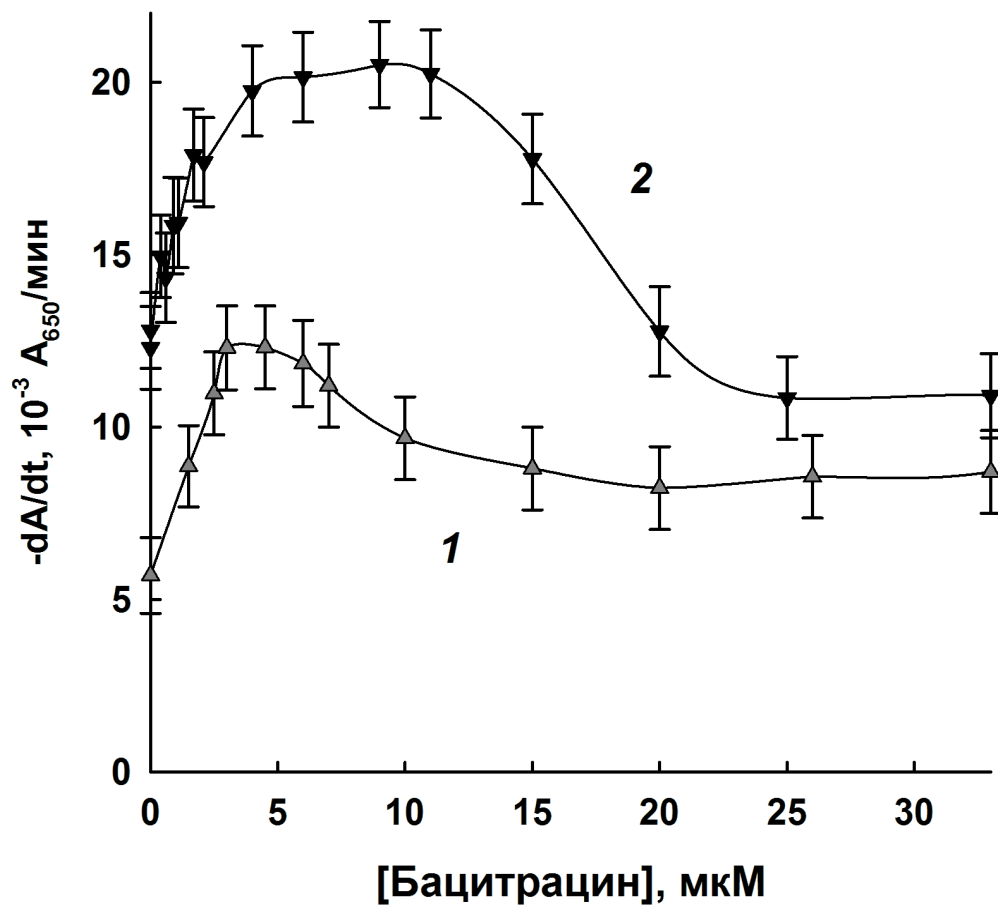
5-10

200

Триптамин

0,8-1,2

200



Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2)
от концентрации бацитрацина

БАВ, влияющие на скорость лизиса в виде кривой с максимумом

	Интерлейкин-2		Лизоцим	
	Концентрация БАВ, мМ	Максимальный эффект, %	Концентрация БАВ, мМ	Максимальный эффект, %
Полимиксин В	5	200	5	170
Бацитрацин	5	200	7-12	200
Милдронат	3	170		
Глицин			1	200
Лизин			17	350

Интерлейкин-2

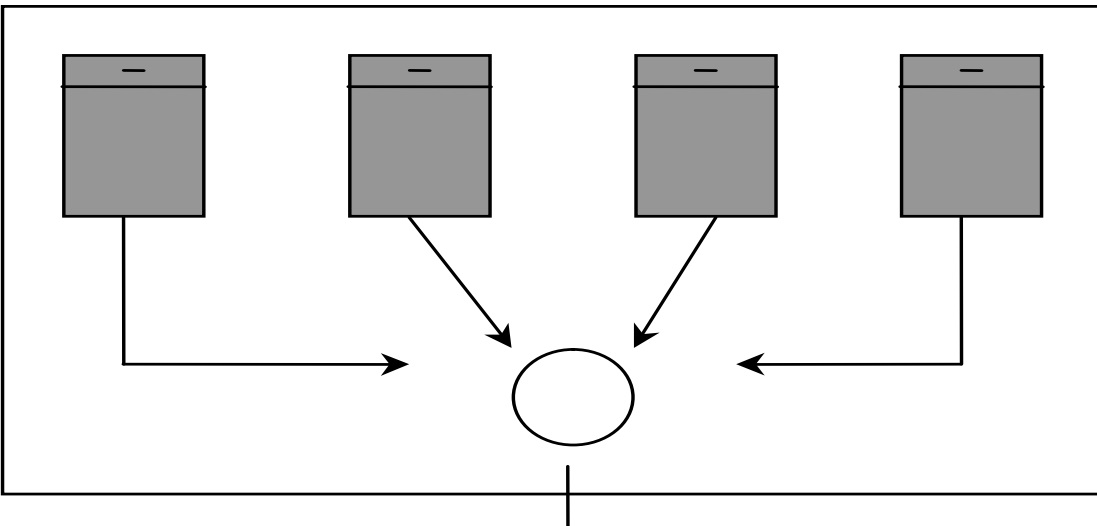
Лизоцим

Глицин	нет эффекта	кривая с максимумом
Лизин	нет эффекта	кривая с максимумом
Аргинин	гиперболическая зависимость	
Глутамат	гиперболическая зависимость	
Фенилаланин	нет эффекта	
Тирозин	нет эффекта	
Триптофан	нет эффекта	
Тирамин	кривая с максимумом	нет эффекта
Триптамин	кривая с максимумом	падение скорости на 40% при 1 мМ
Полимиксин	кривая с максимумом	
Бацитрацин	кривая с максимумом	
Милдронат	кривая с максимумом	нет эффекта
Таурин	нет эффекта	

Иммобилизация бактериолитических ферментов

экстракорпоральная очистка крови

Устройство адсорбции-десорбции



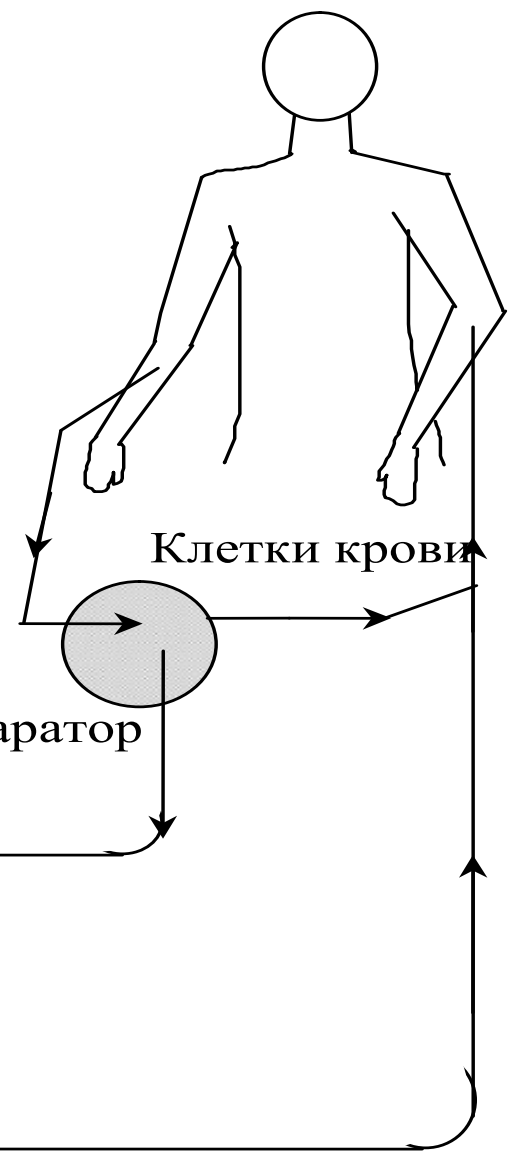
Регенерирующие растворы

Плазмасепаратор

Плазма

Сорбционные колонки

Слив



Количество циклов пропускания через колонку	Концентрация бактерий, 10^7 КОЕ/мл	Снижение обсеменённости по сравнению с исходной, %
0	2,5	0
1	1,5	40
2	1,1	55
3	0,8	69
4	0,6	75

Изменение концентрации клеток *M.luteus* при пропускании бактериальной суспензии через колонку с иммобилизованным лизоцимом

P.A.Levashov, D.A.Matolygina, E.D.Ovchinnikova et al. New sorbent on the basis of covalently immobilized lysozyme for removal of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) from biological fluids. – Biochemistry-Moscow, 2019, v.84, p.33-39