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

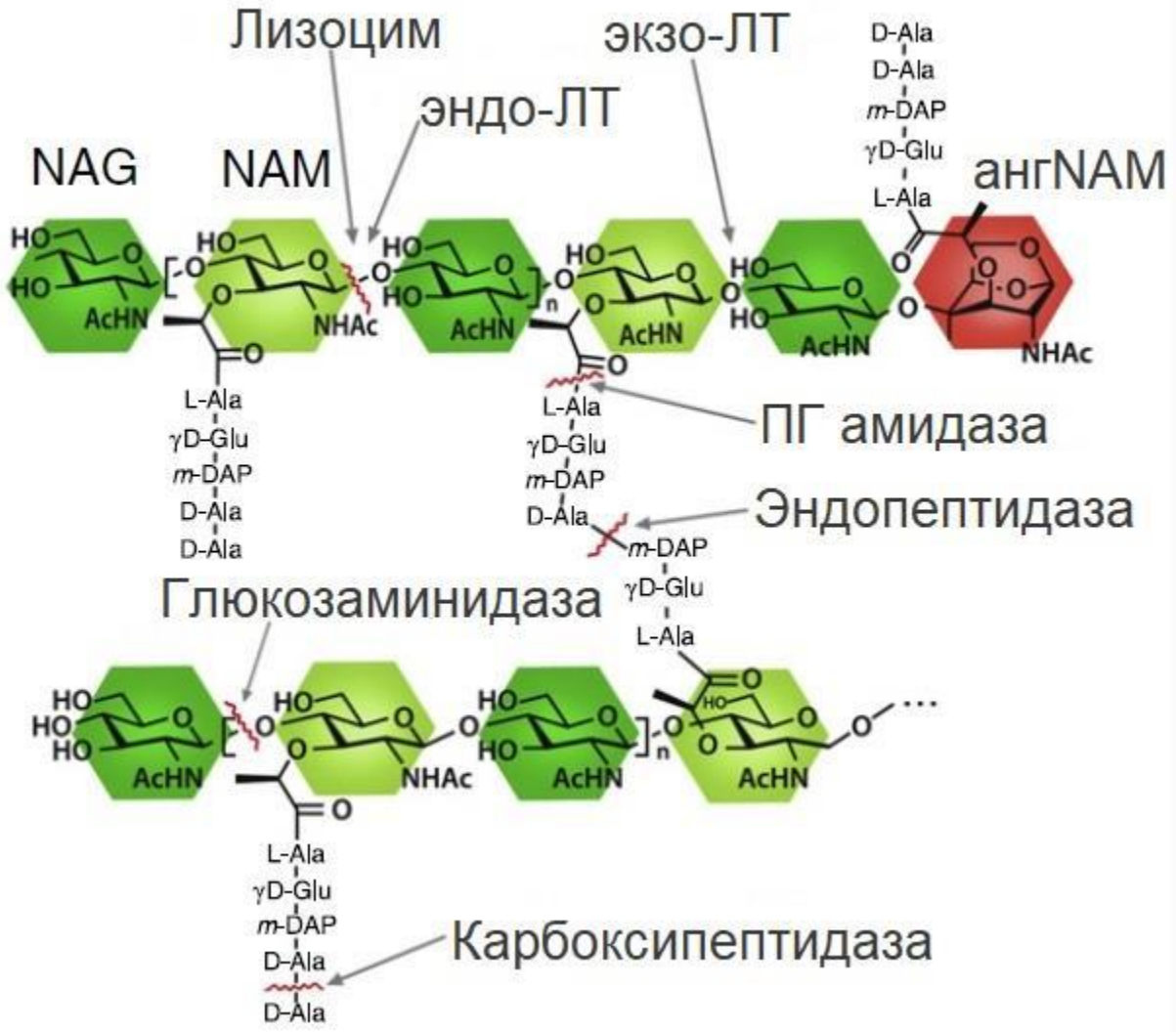
nleremeev@gmail.com

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;

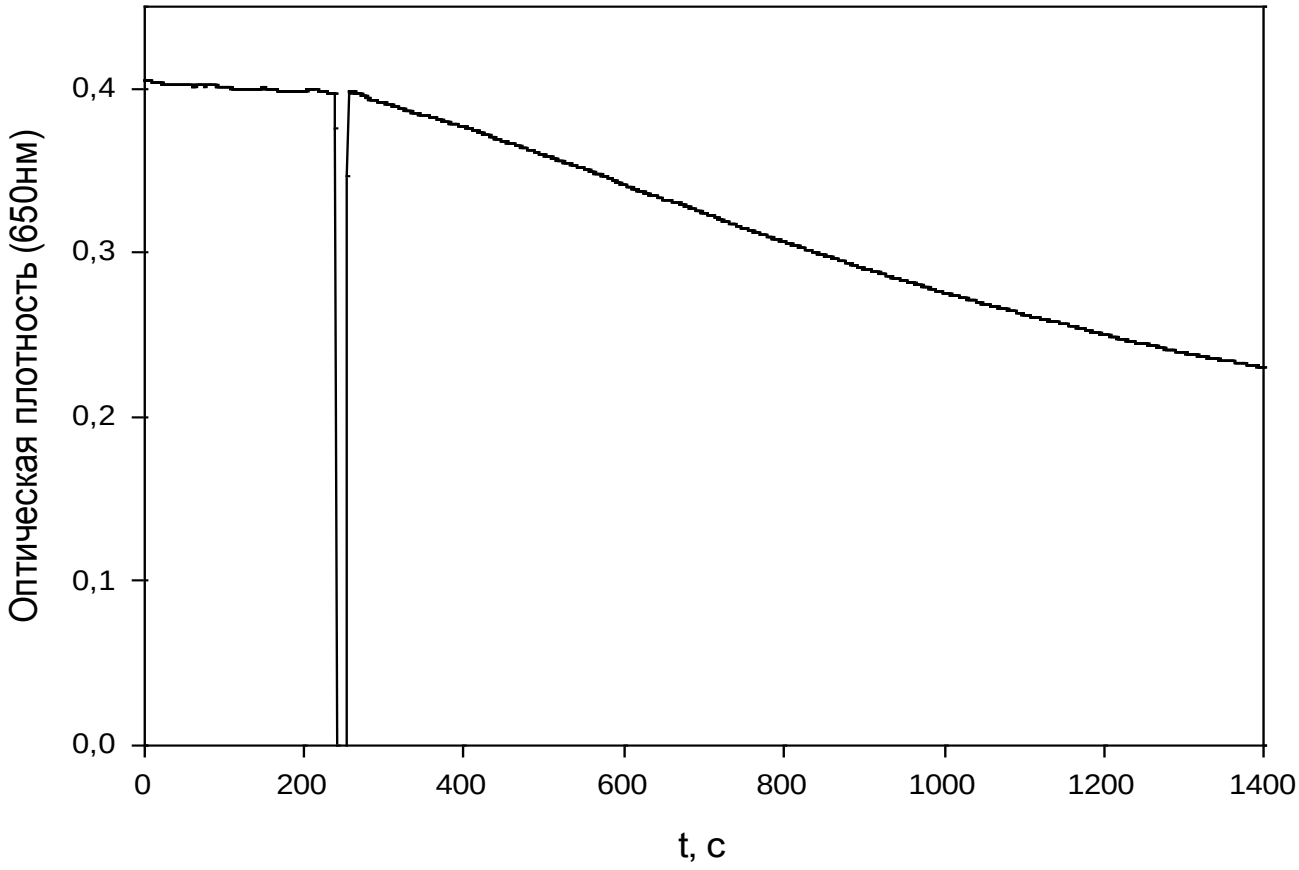
Эндо- и экзолизины – ферменты жизненного цикла бактериофагов;

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



ПГ – пептидогликан, ЛТ – литические трансгликозилазы

Alcorlo M., Martínez-Caballero S., Molina R. et al. Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases. – Curr. Opin. Struct. Biol., 2017, v.44., p. 87–100



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

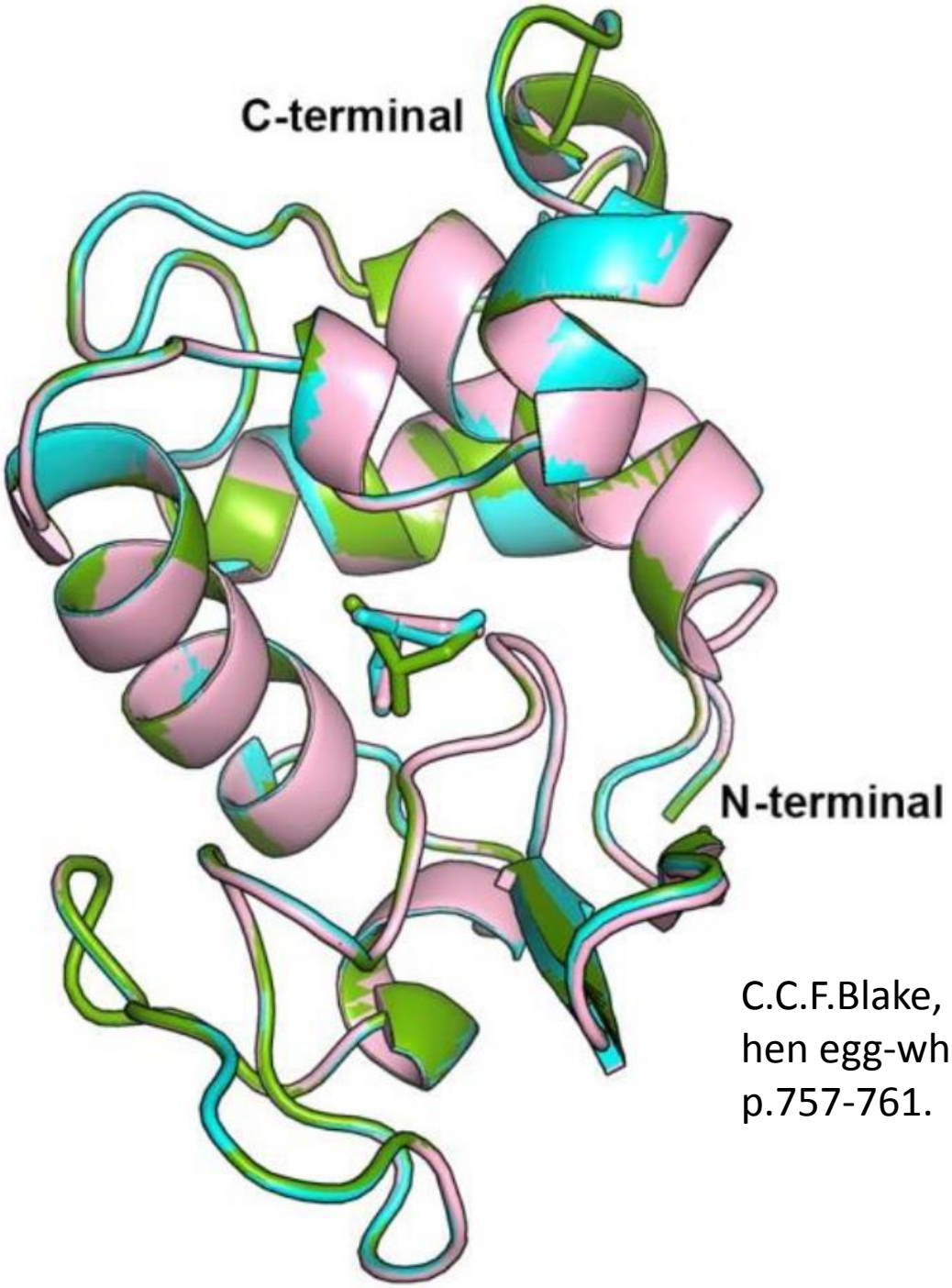
Результаты показали, что пациенты с мультирезистентными штаммами *Staphylococcus aureus* показали улучшение на 42% по сравнению со стандартным лечением антибиотиками.

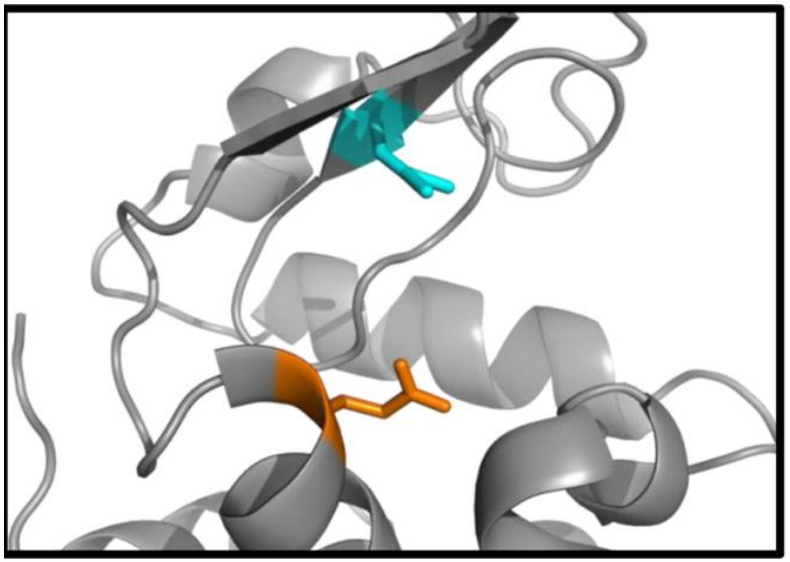
V.A.Fischetti. Phage lysins: novel alyetnative to antibiotics. – in: Phage Therapy:
A practical approach (A.Gorsky et al, Eds), Springer Nature Switzerland AG, 2019.

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

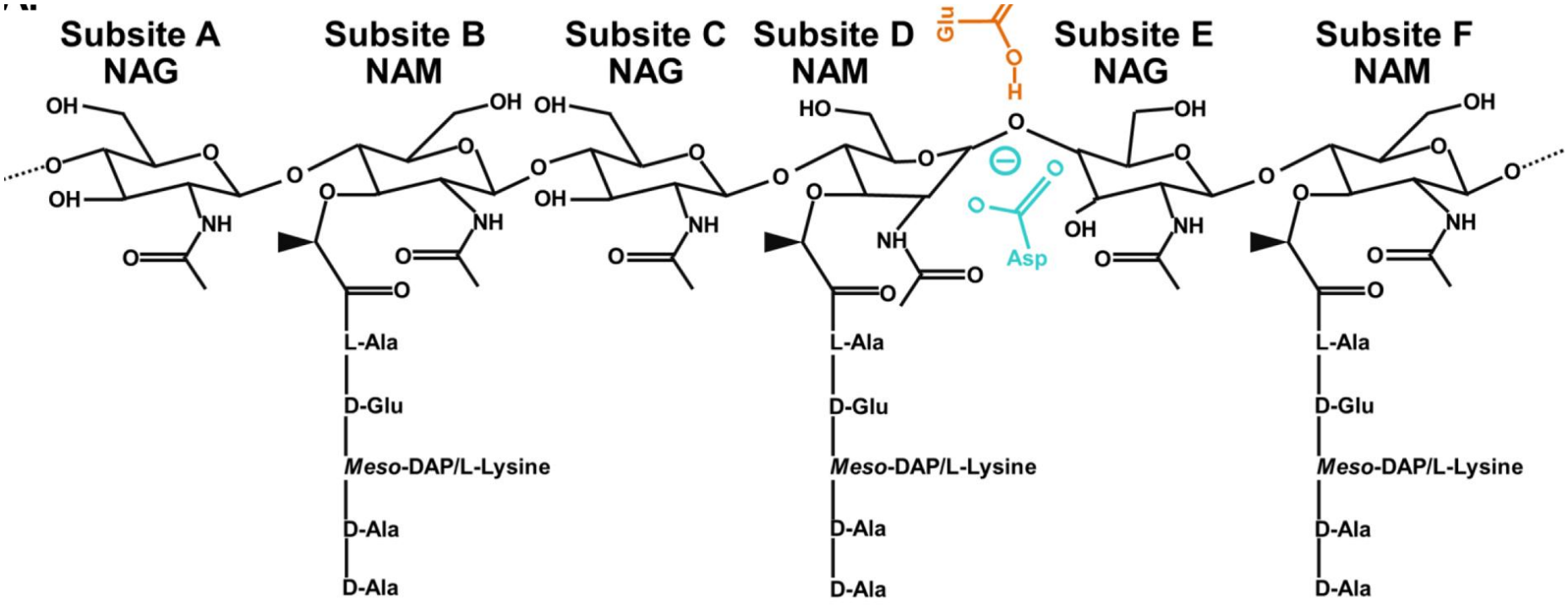
A. Fleming. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. – J. Biol. Chem., 1922, pp. 306–317

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



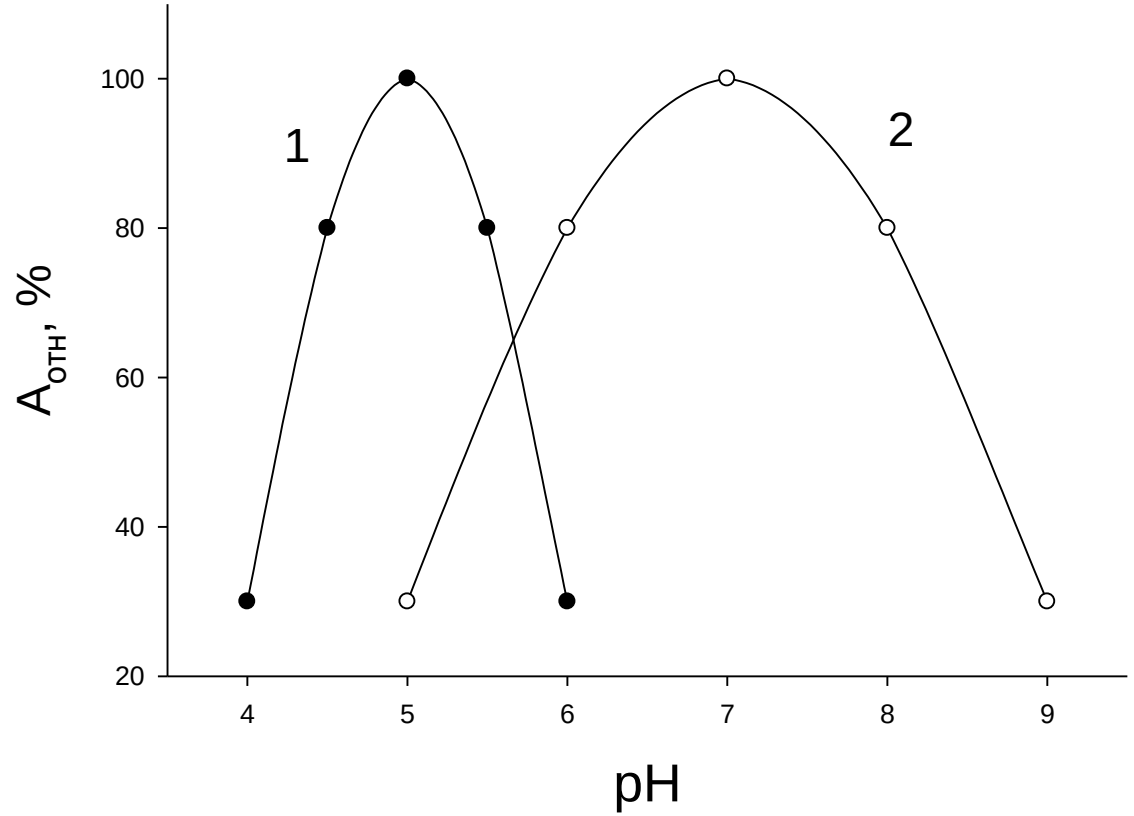


C.C.F.Blake, D.F.Koenig, G.A.Mair et al. Structure of hen egg-white lyzozyme. – Nature, 1965, v.206, p.757-761.



https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006512.g002

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



pH-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.

pH-оптимум действия лизоцима при лизисе различных бактериальных клеток

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

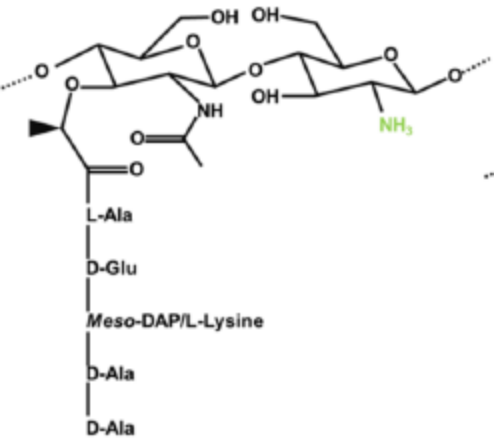
P.A.Levashov, E.D.Ovchinnikova, O.A.Morozova et al. Human interleukin-2 and hen egg white lyzozyme: screening for bacteriolytic activity against various bacterial cells. – Acta Naturae, 2016, v.8, p.98-102

Субстратная специфичность лизоцима

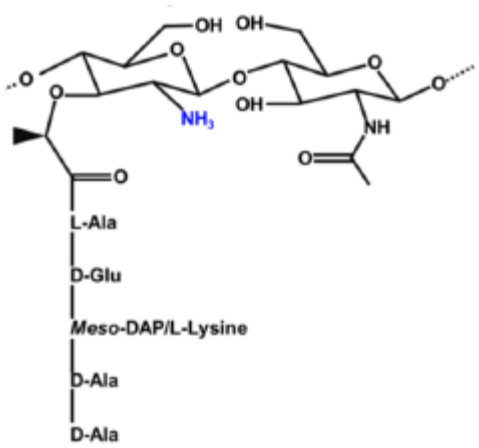
Escherichia coli	100
Micrococcus luteus	75
Bacillus subtilis	50
Pseudomonas aeruginosa	17,5
Serratia marcescens	15,4
Bacillus mycoides	9,4
Bacillus cereus	9,4
Pseudomonas fluorescens	5,8
Bacillus megaterium	5,4
Lactobacillus plantarum	3,7
Lactobacillus acidophilus	3,3
Streptococcus agalactiae	3,0
Staphylococcus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

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

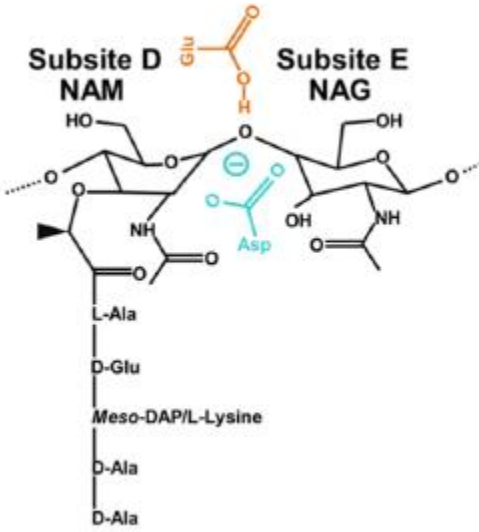
Защитные механизмы бактерий от лизиса лизоцимом

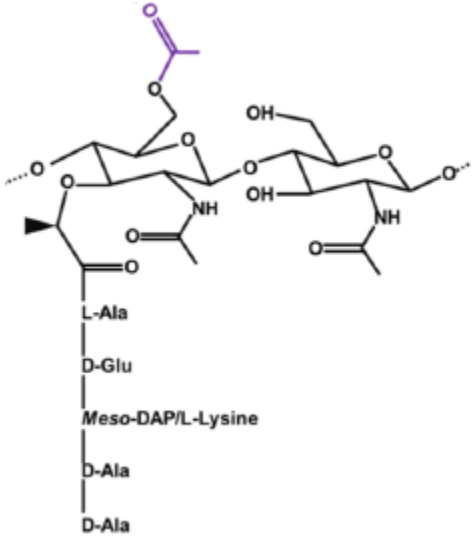


Деацетилирование NAG

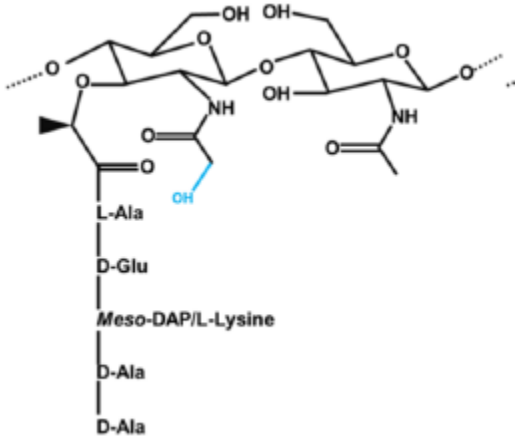


Деацетилирование NAM

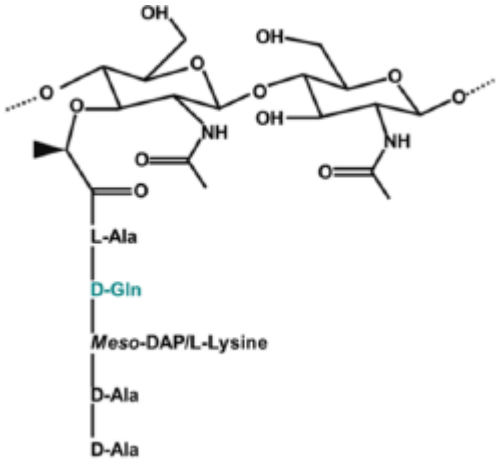




O-ацетилирование NAM



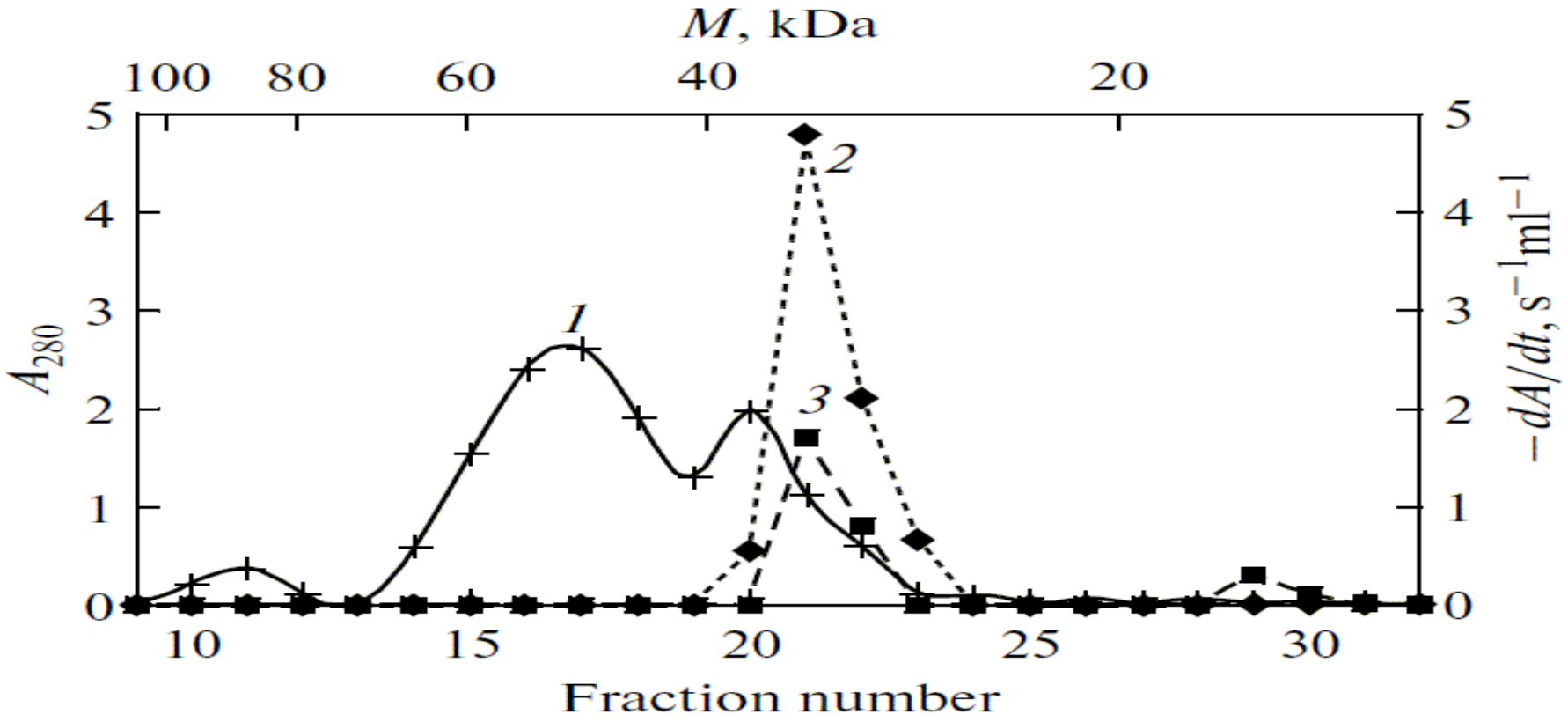
N-гликолирование NAM



Амидирование
глутаминовой кислоты

Эндогенные бактериолитические факторы

Хроматография белков плазмы крови барана на колонке Sephadex G75.
На осях: (1) A280, (2) активность в отношении *Micrococcus luteus*,
(3) активность в отношении *Escherichia coli*.
Один из бактериолитических агентов – интерлейкин-2.

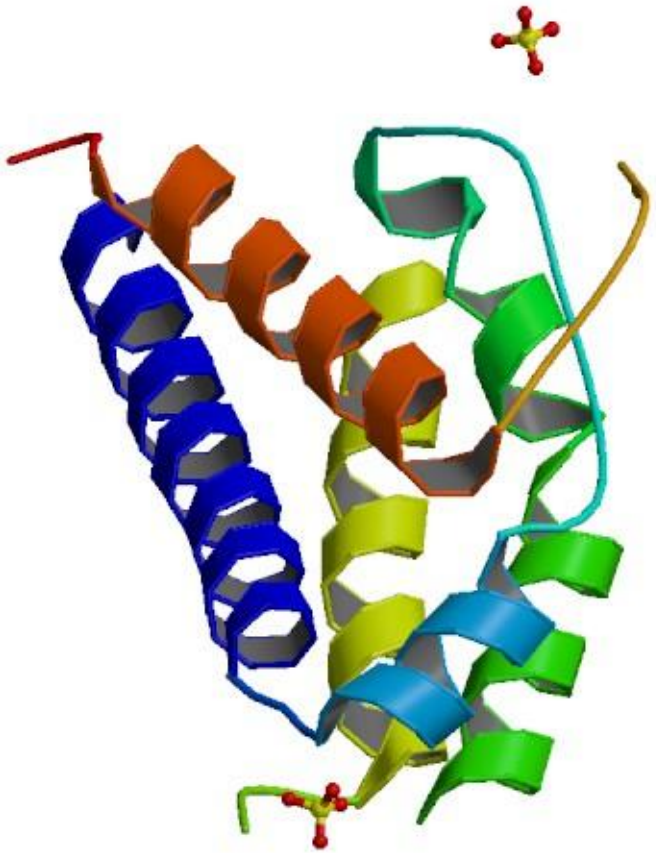


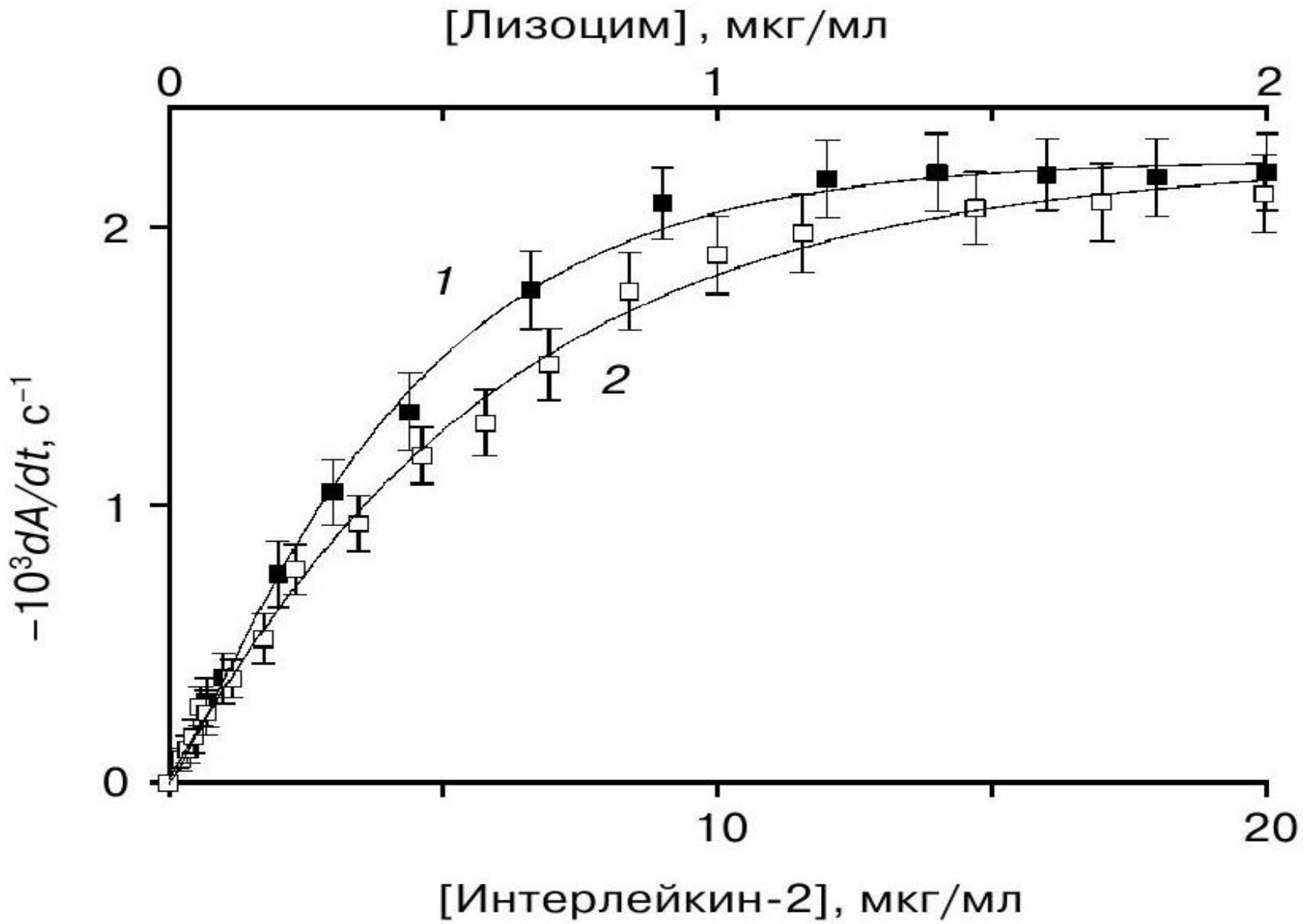
С.А.Седов, Н.Г.Белогурова, С.В.Шиповсков и др. Бактериолитические ферменты из плазмы крови барана. – Биоорг. химия, 2012, т.38, с.315-323

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

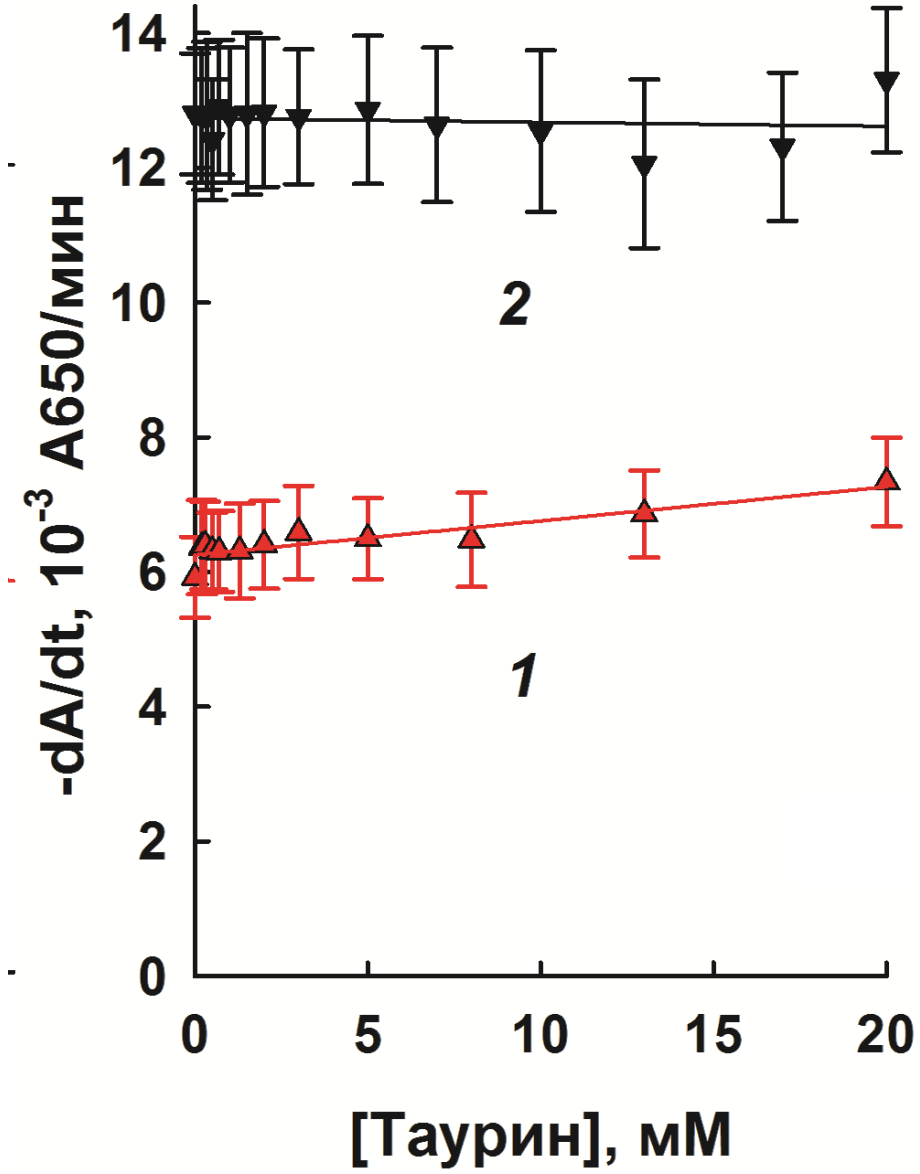
Субстратная специфичность интерлейкина-2 человека
(pH-оптимумы бактериолитической активности совпадают с pH-оптимумами лизоцима)

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

P.A.Levashov, E.D.Ovchinnikova, O.A.Morozova et al. Human interleukin-2 and hen egg white lyzozyme: 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 lyzozyme 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

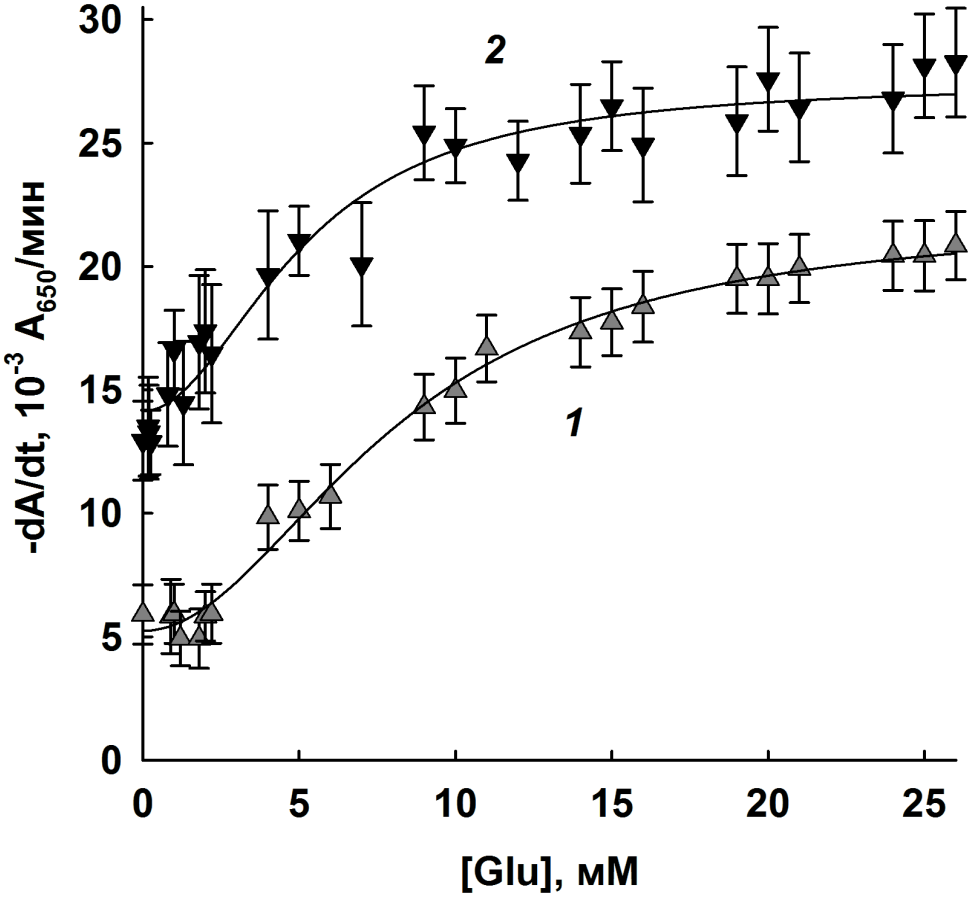
Интерлейкин-2

Лизоцим

Фенилаланин
Тирозин
Триптофан
Таурин

Глицин
Лизин

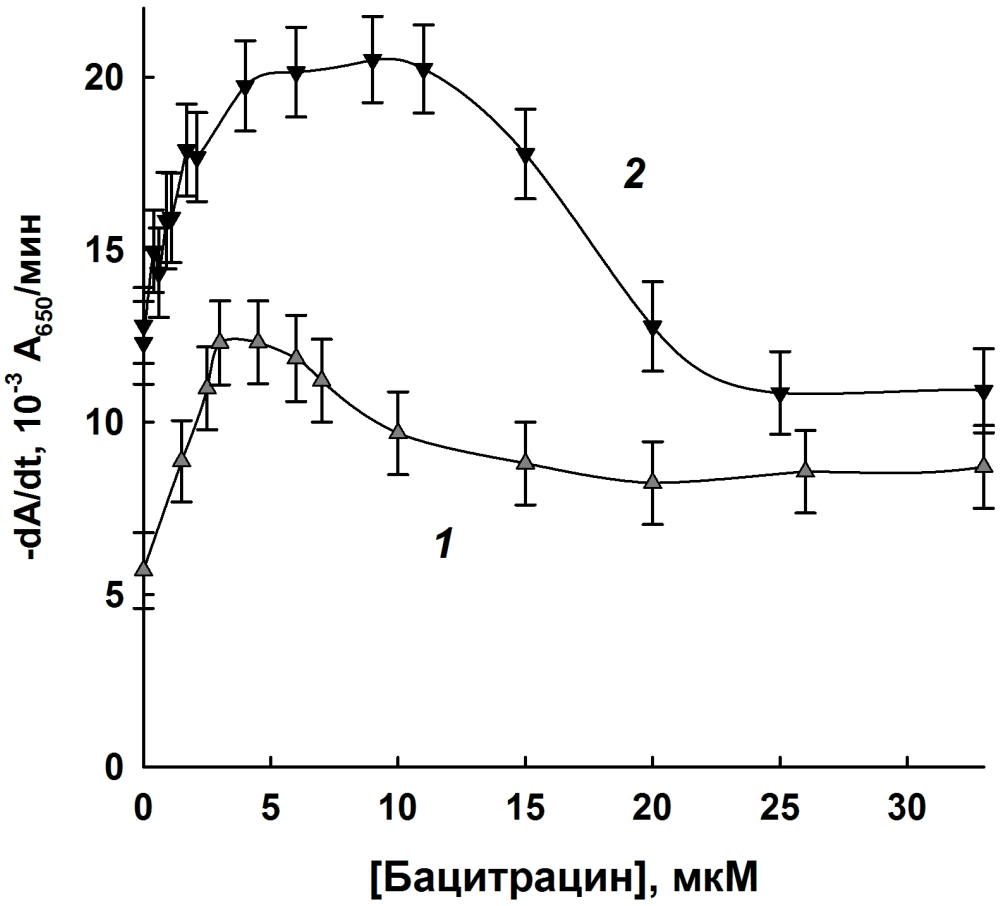
Тирамин
Милдронат



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

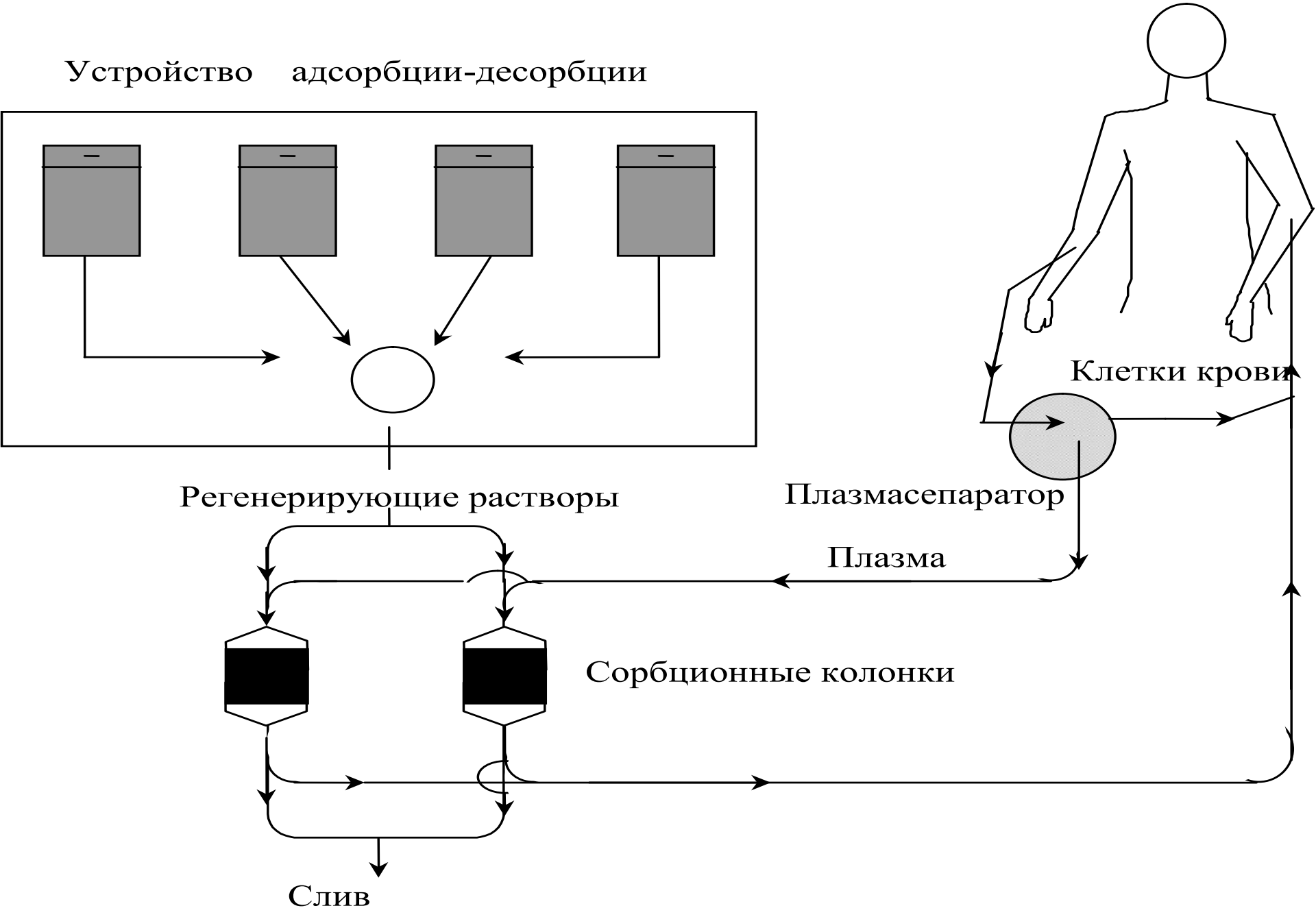
БАВ, влияющие на скорость лизиса в виде кривой с максимумом

	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 1мМ
Полимиксин	кривая с максимумом	
Бацитрацин	кривая с максимумом	
Милдронат	кривая с максимумом	нет эффекта
Таурин	нет эффекта	

Иммобилизация бактериолитических ферментов

экстракорпоральная очистка крови



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 lyzozyme for removal of bacterial lipopolysaccaride (endotoxin) from biological fluids. – Biochemistry-Moscow, 2019, v.84, p.33-39

Бактериальные эндотоксины представляют собой структурные компоненты клеточной стенки бактерий, которые образуются при лизисе и состоят из полисахаридного и липидного фрагментов (липополисахарид, ЛПС). Участие избытка ЛПС в патогенезе различных заболеваний называют «эндотоксиновой агрессией».

Эффективность удаления эндотоксинов из 1 литра раствора сорбентом разного объёма

Объём сорбента, мл	Удаление эндотоксина *E.coli*, %	Удаление эндотоксина *P.aerugenosa*, %
50	79	72
100	88	84
200	94	91

Патенты РФ 2 736 149 C1 и 2 736 150 C1 (2020) описывают способы получения сорбента на основе ковалентно иммобилизованного и химически модифициованного лизоцима для сорбции бактериальных эндотоксинов .