

Федеральное Агентство Научных Организаций
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ им. Г.К. СКРЯБИНА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Лаборатория биохимии клеточной поверхности микроорганизмов

Кудрякова Ирина Валерьевна

**ЛИТИЧЕСКАЯ ЭНДОПЕПТИДАЗА L5
LYSOBACTER SP. XL1: ПЕРСПЕКТИВЫ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ**

Поверхностных и
глубоких гнойных
ран

Гнойно-
воспалительных
заболеваний
кожи

Лизоамидаза
(ферменты Л1-Л5
***Lysobacter sp. XL1*)**
для лечения

Ангины

Различных
заболеваний
полости рта

Везикулы *Lysobacter* sp. XL1



Везикулы
Lysobacter sp. XL1 лечат
различные формы модельной
сибирской язвы

↓
однократное введение
везикул излечивало
животных даже при
значительной дозе
заражения
(ЛД₅₀ составил 1×10^8
спор).

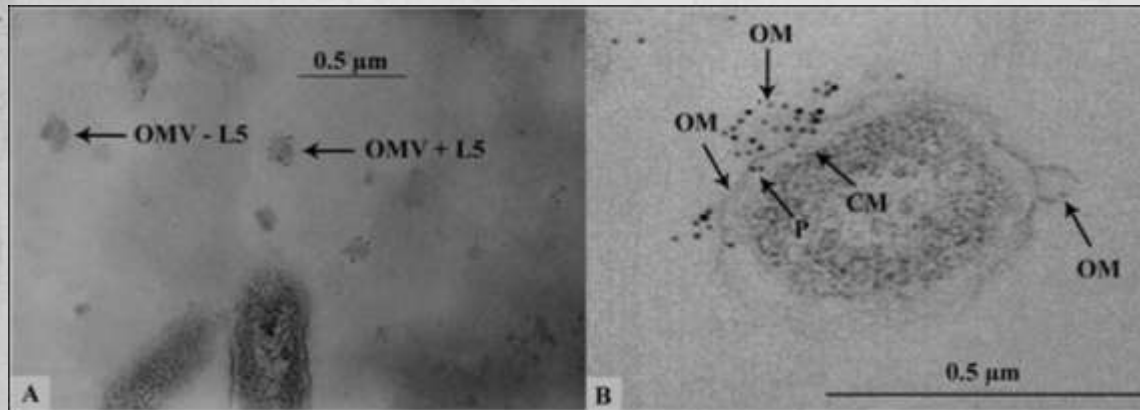
Электронная микроскопия.
Lysobacter sp. XL1.



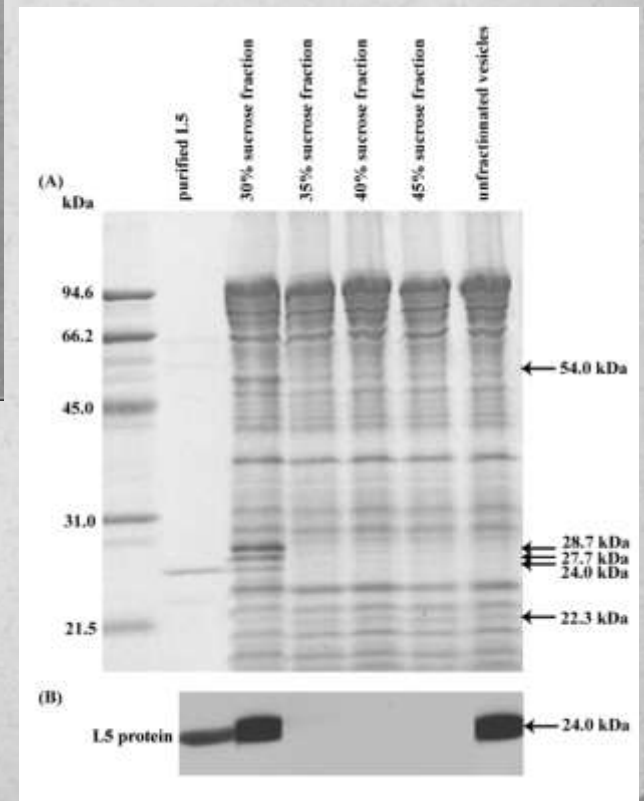
Литическая эндопептидаза Л5 является одним из факторов биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1

*Kudryakova IV, Suzina NE, Vasilyeva NV (2015)
Biogenesis of Lysobacter sp. XL1 vesicles. FEMS
Microbiol lett in the press.*

*Биохимическая
характеристика везикул
Lysobacter sp. XL1.*



*Электронно-микроскопическая
иммуноцитохимия ультратонких срезов
клеток Lysobacter sp. XL1.*



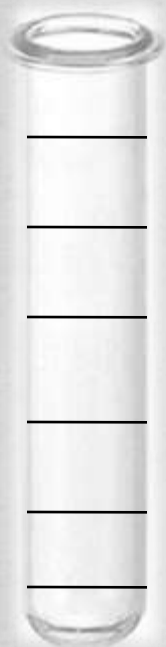
Цель: изучить особенности биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1, а также бактериолитический эффект везикулярной формы рекомбинантного белка Л5 на разные таксоны бактерий.

Задачи:

1. Провести сравнительный анализ фосфолипидного состава внешних мембран и везикул *Lysobacter* sp. XL1.
2. Изучить спектр литического действия везикулярной формы рекомбинантного белка Л5 по отношению к живым клеткам грамотрицательных и грамположительных бактерий.
(совместно с Центром прикладной микробиологии, г. Оболенск).

Фракционирование препарата суммарных мембран *Lysobacter* sp. XL1 в плотностном градиенте сахарозы

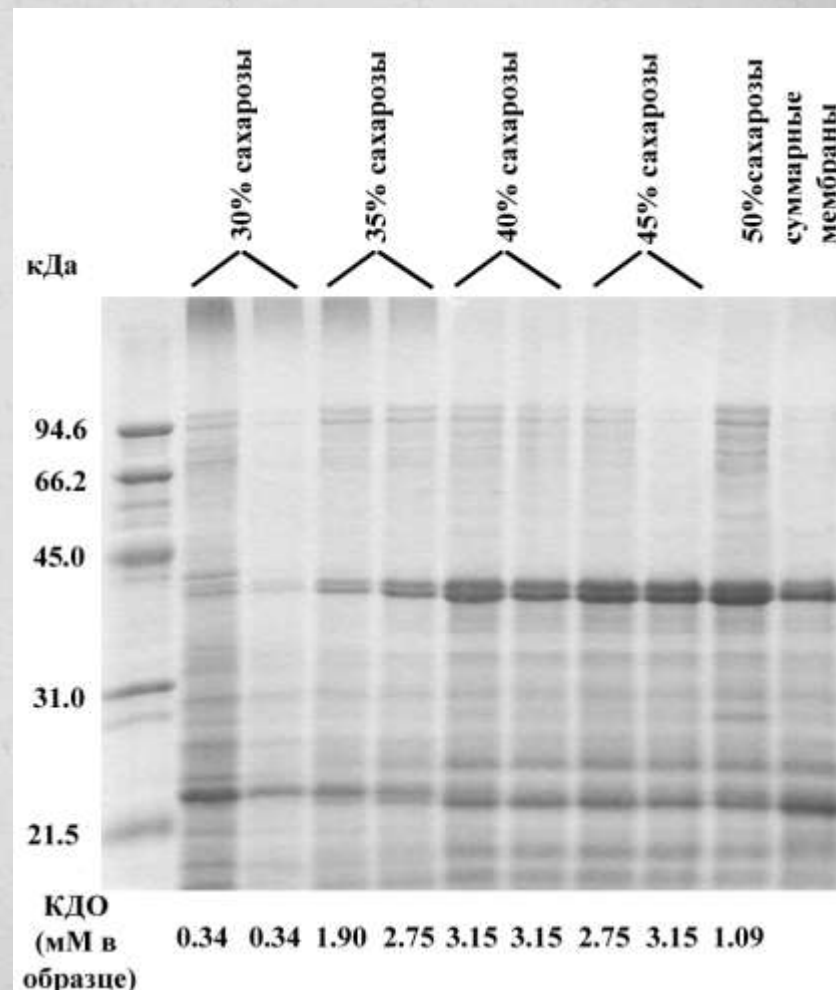
Ультрацентрифугирование
при 106 500 g, 14 ч



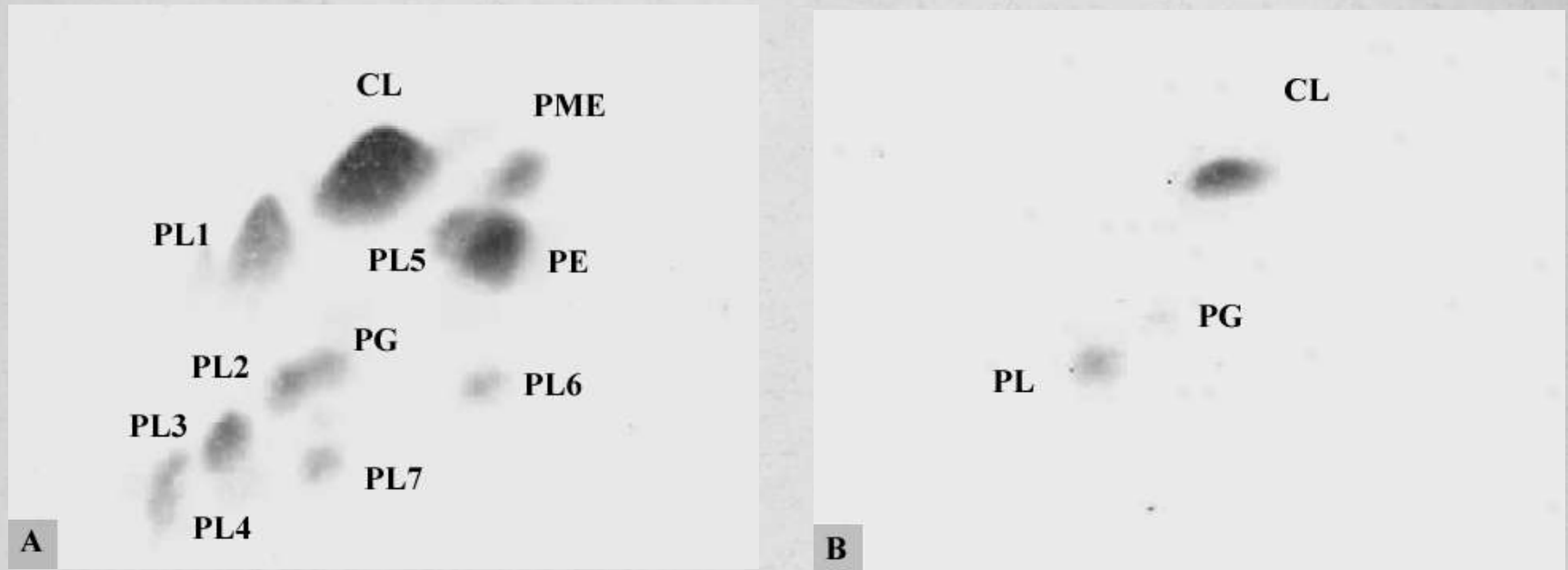
30%
35%
40%
45%
50%
55%

Отобранные фракции

- 1 – фракция 30 % сахарозы;
- 2 – фракция 35 % сахарозы;
- 3 – фракция 40 % сахарозы;
- 4 – фракция 45 % сахарозы;
- 5 – фракция 50 % сахарозы.



Фосфолипидный состав внешних мембран и везикул *Lysobacter* sp. XL1



Двумерная тонкослойная хроматография (A) – липидов внешних мембран; (B) – липидов везикул. Разделяющая система 1: хлороформ:метанол:вода (32.5:12.5:1.9). Разделяющая система 2: хлороформ:уксусная кислота:метанол:вода (40:7.5:6:1.8).

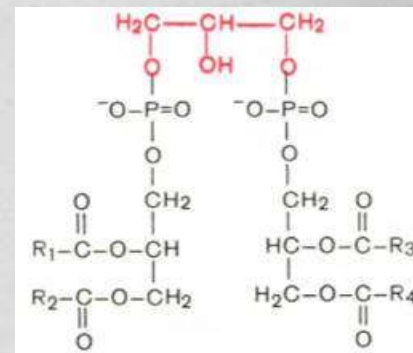
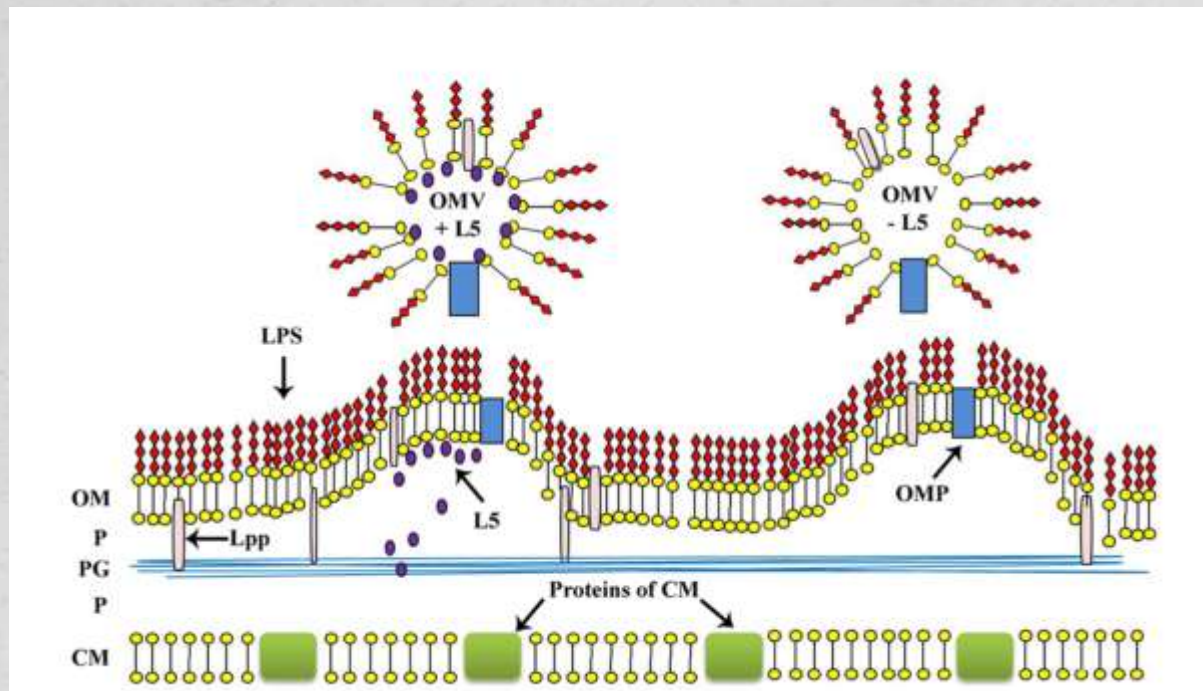
CL – кардиолипин; **PME** – фосфатидилмонометилэтаноламин;
PE – фосфатидилэтаноламин; **PG** – фосфатидилглицерин;
PL – PL7 – неидентифицированные фосфолипиды.

Модель биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1

Нарушение жесткости внешней мембраны

1. Давление белка L5 на внешнюю мембрану

2. Структура кардиолипина



Модель биогенеза везикул Lysobacter sp. XL1.

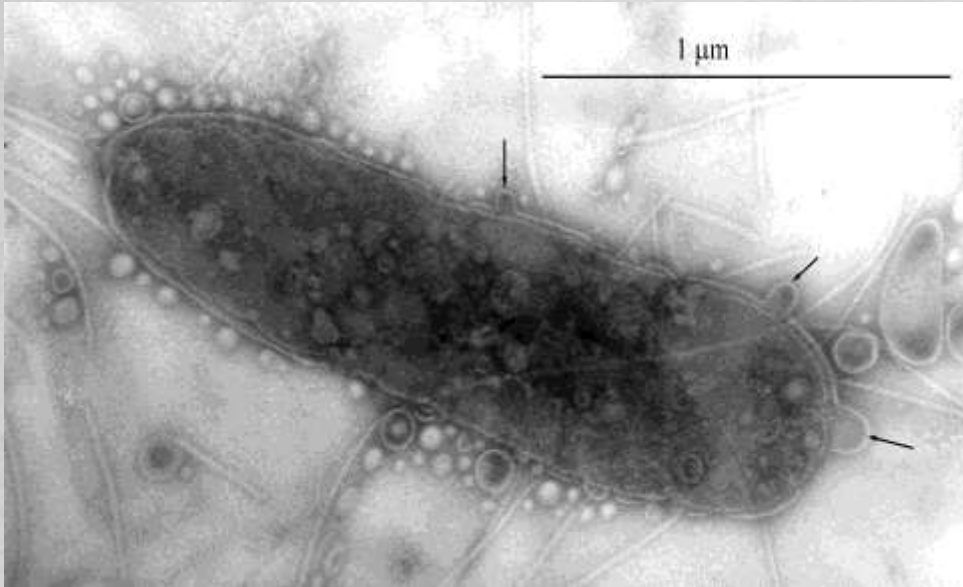
CM - цитоплазматическая мембрана; **P** - периплазма; **PG** - пептидогликан;

OM - внешняя мембрана; **OMP** - внешнемембранные белки; **L5** - белок L5;

Lpp - липопротейн; **LPS** - липополисахарид;

OMV+ L5 - везикулы, содержащие белок L5; **OMV- L5** - везикулы, не содержащие белок L5.

**Штамм *P. fluorescens* Q2-87/B,
экспрессирующий рекомбинантный белок Л5**



*Электронная микроскопия.
Pseudomonas fluorescens* Q2-87/B.
Метка 1 μm.



Л5 1

Иммуноферментный анализ с антителами к бактериолитическому ферменту Л5.

1 – везикулы Q2-87/B.

Спектр литического действия препарата везикул Q2-87/В

Микроорганизмы	Действие везикул
Грамположительные бактерии	
<i>Bacillus subtilis</i> W23	++
<i>Bacillus cereus</i> 217	++
<i>Micrococcus roseus</i> В 1236	++
<i>Micrococcus luteus</i> В1819	++
<i>Corynebacterium xerosis</i>	++
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	++
<i>Rathayibacter tritici</i>	++
Грамотрицательные бактерии	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1472	++
<i>Pseudomonas putida</i>	+
<i>Proteus vulgaris</i> H-19	+
<i>Proteus mirabilis</i> N2	+
<i>Escherichia coli</i> K12	++
<i>Erwinia caratovora</i> В15	++
<i>Alcaliganes faecalis</i>	+

Дрожжи	Действие везикул
<i>Torulaspota delbrueckii</i> ВКМ Y-706	+-
<i>Candida utilis</i> ВКМ Y-74	+-
<i>Candida boidinii</i> ВКМ Y-34	+-
<i>Candida guilliermondii</i> ВКМ Y-41	+-
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> M660	+-
<i>Pseudozyma fusiformata</i> ВКМ Y-2821	+-



Литический эффект Q2-87/В в отношении *Bacillus anthracis* 71/12



Литический эффект Q2-87/В в отношении *Staphylococcus aureus* 55 MRSA

Липосомальный препарат на основе фосфолипидов везикул и литической эндопептидазы Л5 *Lysobacter* sp. XL1. Метод гидратации липидных пленок.

Фосфолипиды из везикул экстрагированы методом Эймса.



Роторный испаритель – высушивание липидных пленок

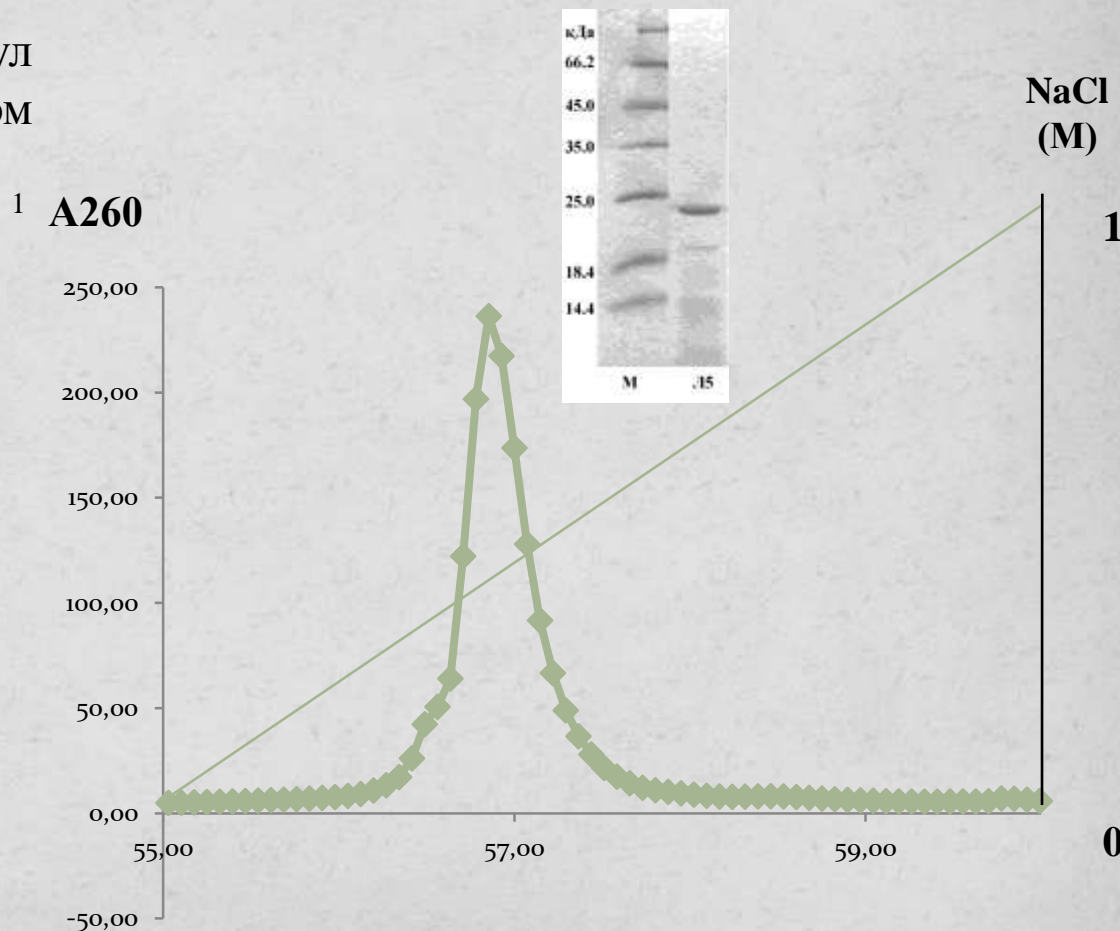
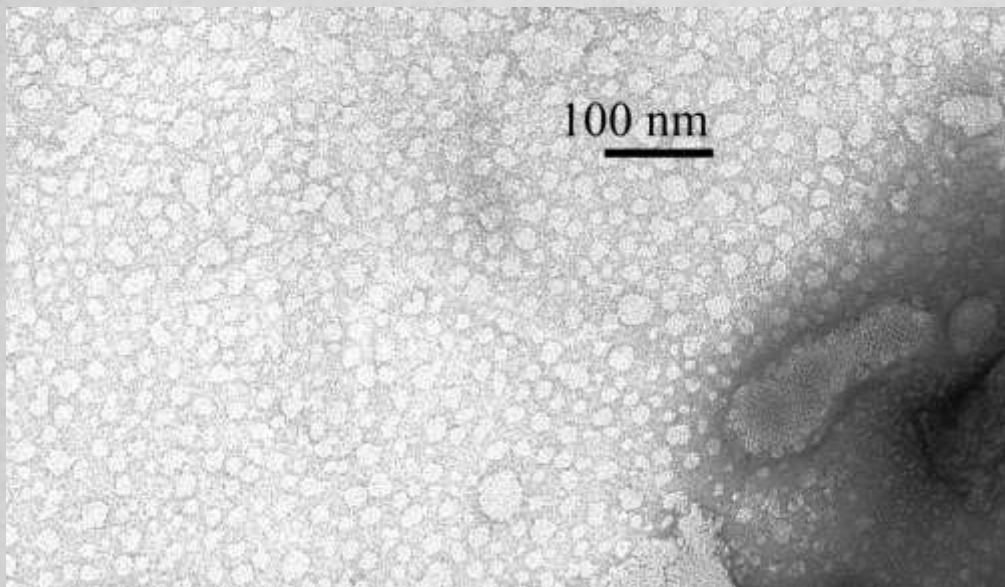


График элюции. Очистка белка Л5 на колонке MonoS.

Липосомальный препарат на основе фосфолипидов везикул и литической эндопептидазы Л5 *Lysobacter* sp. XL1



Электронная микроскопия.
Метка 100 нм.

*Литический эффект липосомального
препарата в отношении S. aureus 209P*



Выводы:

1. Кислый фосфолипид – кардиолипин - является одним из факторов биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1;
2. Везикулярная форма белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1 обладает бактериолитической активностью в отношении живых условно - патогенных и патогенных бактерий, включая и множественноустойчивые штаммы.

Полученные результаты могут способствовать исследованию возможности использования искусственных везикулярных структур – липосом – в качестве высокоэффективных антимикробных препаратов.

Публикации:

Vasilyeva NV, Tsfasman IM, Kudryakova IV, Suzina NE, Shishkova NA, Kulaev IS, Stepnaya OA (2013) The role of membrane vesicles in secretion of Lysobacter sp. bacteriolytic enzymes. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 23,142 – 151.

Шишкова Н.А., Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Цфасман И.М., Васильева Н.В. (2013) Лечебное и профилактическое действие внешнемембранных везикул, содержащих литический фермент Л5 Lysobacter sp. XL. Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты 5, 538 – 547.

Kudryakova IV, Suzina NE, Vasilyeva NV (2015) Biogenesis of Lysobacter sp. XL1 vesicles. FEMS Microbiol lett in the press.

Работа поддержана грантом РФФИ №11-04-01937-а и Министерством Образования и Науки № 14.607.21.0013.



Лаборатория биохимии клеточной поверхности микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина

Email:

vasilyevanv@rambler.ru

(Васильева Наталья Валерьевна)

kudryakovairina@yandex.ru

(Кудрякова Ирина Валерьевна)

Васильева Наталья Валерьевна,
к.б.н., заведующая лабораторией биохимии клеточной поверхности микроорганизмов



Лаборатория биохимии клеточной поверхности микроорганизмов, ИБФМ РАН