

УДК 577.322.4

К.А. Мирошников<sup>1</sup>, М.Н. Симакова<sup>2</sup><sup>1</sup> Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН<sup>2</sup> Военно-космическая академия им. А. Ф. Можайского  
(филиал, г. Ярославль)

## СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА gp181 БАКТЕРИОФАГА phiKZ

В данной работе исследован белок gp181 бактериофага phiKZ *Pseudomonas aeruginosa*, который является пептидогликановой гидролазой (структурным лизином). Изучение белка проводилось с помощью направленного делеционного мутагенеза. Экспериментально подтверждено предположение о том, что С-концевая часть белка gp181 может участвовать в процессе инфицирования бактериофагом phiKZ клетки как сенсорная молекулярная игла для протыкания клеточной стенки бактерии.

СТРУКТУРНЫЙ ЛИЗИН, БАКТЕРИОФАГ, PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ЛИТИЧЕСКИЙ ФЕРМЕНТ gp181, ДЕЛЕЦИОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ.

### Введение

Бактериофаг phiKZ семейства *Myoviridae* — это вирус, который инфицирует бактерию *Pseudomonas aeruginosa* (далее *P.aeruginosa*), известную своими патогенными свойствами для человека. Геном такого вируса имеет размер 280334 пар оснований в виде линейной, (A+T)-богатой двухнитевой молекулы ДНК [1, 2].

Структура вириона phiKZ была определена с помощью криоэлектронной микроскопии [3]. Он имеет большой икосаэдрический капсид диаметром около 1450 Å, содержащий двухнитевую ДНК, и сократимый хвост длиной приблизительно 2000 Å, заканчивающийся базальной пластинкой [2, 4].

Бактерия *P.aeruginosa* — один из основных патогенов в ICU-пневмонии, в первичной бактериемии при СПИДе и кистозном фиброзе. Она устойчива почти ко всем общеизвестным антибиотикам [5].

Бактериофаг phiKZ эффективно инфицирует различные штаммы бактерии

*P.aeruginosa*. Поэтому он может быть полезен для разработки фаговой терапии — способов борьбы с бактериальными инфекциями, которые не лечатся с помощью антибиотиков. Но в указанной терапии имеется несколько ограничений: трудность доставки фага к инфицированной области организма, иммуногенность фаговых частиц, потенциально патогенные участки ДНК в составе фагов. Так, в бактериофаге phiKZ обнаружены белки, которые имеют значительное сходство с белками опасных вирусов.

Другим новым методом борьбы с бактериальными инфекциями, в том числе с *P.aeruginosa*, является использование энзимов — литических ферментов бактериофагов, что было показано в работах [6 – 10].

Геном phiKZ кодирует два литических фермента: литическую трансгликозилазу (gp144) и пептидогликановую гидролазу (структурный лизин gp181), разрушающих пептидогликановый слой бактериальной

клетки *P.aeruginosa* в процессе ее инфицирования фагом.

Таким образом, исследование литического фермента gp181 фага phiKZ является актуальной задачей молекулярной биологии и медицины.

Цель данной работы – выяснение роли белка gp181 в процессе инфицирования клетки с помощью направленного делеционного мутагенеза.

### Материалы и методы исследования

Перед началом исследований предполагалось, что белок gp181 по структуре и функциям может иметь сходство с белком gp5 – литическим ферментом бактериофага T4. Белок gp5 имеет лизоцимный домен и следующий за ним C-концевой домен, который формирует иглу, протыкающую мембрану [11]. Предполагалось, что C-концевая часть белка gp181 также участвует в процессе инфицирования бактериофагом phiKZ клетки как сенсорная молекулярная игла для протыкания клеточной стенки бактерии.

**Штаммы бактериальных культур.** Для экспрессии гена 181 бактериофага phiKZ, клонированного в плазмидный вектор pQE-30 *E.coli* (QIAGEN, США) с промотора фага T5, нами был использован штамм *E.coli* AD494(DE3) (Novagen, США). Для наработки плазмидных конструкций со вставкой гена 181 был использован штамм *E.coli* Top10 (Invitrogen, США).

**Среды для выращивания бактерий.** Использовалась жидкая питательная среда 2xTY: 16 г триптона (ДИА-М, Россия), 10 г дрожжевого экстракта (DIFCO, США) и 5 г NaCl (Реахим, Россия) на 1 л воды. В качестве твердой питательной среды использовали 2xTY среду, содержащую 1,5 % агара (DIFCO, США). Все среды стерилизовали автоклавированием.

**Векторы для клонирования. Плазмиды.** Для клонирования и экспрессии гена 181 использовался вектор pQE-30 (QIAGEN, США). Данный вектор имеет «гистидиновый хвост» (His-tag), состоящий из шести остатков гистидина (His). Белок, экспрессированный в таком векторе, будет содержать на своем N-конце шесть дополнительных

остатков гистидина, а это облегчает процесс очистки белка с помощью аффинной никель-хелатной хроматографии.

В процессе исследований нами получены следующие плазмиды с фрагментами ДНК (векторы pQE-30 со вставками по сайтам *Bam*HI-*Hind*III, содержащими соответствующие гены):

pl\_g181M, с геном g181M;

pl\_g181MA, с геном g181MA;

pl\_g181E, с геном g181E.

**Ферменты.** В работе использовались рестриктирующие эндонуклеазы *Nco*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Xho*I, *Bgl*II и ДНК лигаза фага T4 (фирма Fermentas, Литва), ДНК полимеразы *Thermophilus aquaticus* (Taq-полимераза) (фирма New England Biolabs, США).

Реакции рестрикции и лигирования проводили согласно рекомендациям фирм-изготовителей с использованием прилагаемых буферов.

**Олигонуклеотиды.** Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) были использованы следующие праймеры:

прямой (g181M-FOR): 5'-aga gga tcc gct caa gct aca-3';

прямой (g181E-FOR): 5'-tat gga tcc atg gag aat aag-3';

обратный (g181-REV): 5'-tat aag ctt acc aag tga ttg act att-3'.

**Реактивы.** Использовали агарозу, акриламид, ТЕМЕД, PMSF, ампициллин, фенол, хлороформ, IPTG, бромистый этидий (фирма Sigma, США), бакто-триптон, дрожжевой экстракт (фирма Difco, США), SDS (Serva, Германия), Coomassie R (Sigma, США), уксусную кислоту (Реахим, Россия), Tris-HCl (Sigma, США), EDTA (Serva, Германия), лизоцим (Serva, Германия). Растворы приготавливались с использованием воды Milli-Q, полученной на установке Millipore (США).

**Экспрессия клонированных генов в *E.coli*.** Экспрессию генов, клонированных в плазмидный вектор pQE-30 и находящихся под контролем промотора фага T5, осуществляли по методу Стадиера [12]. Сконструированными плазмидами pl\_g181E, pl\_g181M и pl\_g181MA трансформировали компетентные клетки AD494(DE3), имеющие генетическую устойчивость к канамицину. Затем

клетки, трансформированные плазмидами соответственно pl\_g181M, pl\_g181MA и pl\_g181E, высевали на чашки Петри с агаром, содержащим ампициллин (100 мкг/мл) и канамицин (50 мкг/мл). Чашки с содержимым инкубировали при 37 °С в течение 12 – 18 ч. Затем колонии трансформантов, несущих плазмиды pl\_g181M, pl\_g181MA и pl\_g181E, инокулировали в 150 мл среды 2xTY, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и канамицин (50 мкг/мл). Нарастивали при 37 °С до плотности  $A_{600}$ , примерно равной 0,6 о.е. Для индукции экспрессии добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ и продолжали инкубацию в течение ночи при 18 °С. Клетки осаждали центрифугированием при частоте вращения 3000 об/мин в течение 10 мин. Для препаративной обработки полноразмерных рекомбинантных gp181MA и gp181E объем среды культивирования увеличивали до 500 мл.

**Выделение белков и их анализ на растворимость.** После центрифугирования клетки ресуспендировали в 20 мл буфера (25 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 10 % сахарозы, 0,2 % Tween 20), добавляли 1 мМ RMsF. Детергент Tween 20 и сахарозу использовали для улучшения солюбилизации. Клеточную суспензию обрабатывали в течение 2 – 3 мин на ультразвуковом дезинтеграторе UD-20 (Techrap, Польша) за несколько циклов: разрушение – в течение 15 с, затем перерыв – в 15 – 20 с. Остатки клеточных стенок удаляли центрифугированием при 15000  $g$  в течение 15 мин (J2-21, Beckman, Германия). Супернатант и осадок анализировали в 12 %-ном SDS-ПААГ.

**Очистка белков.** После выделения растворимые белки gp181MA и gp181E очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке (High-Trap chelating Ni, 5 мл, фирмы Pharmacia Biotech, Швеция) при скорости  $v = 2$  мл/мин в ступенчатом градиенте имидазола (0–50 мМ–200 мМ) в буфере 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl.

Белок gp181M при экспрессии в системе *E.coli* AD494(DE3) давал нерастворимые тельца включения. Поэтому данный белок, содержащийся в промытом осадке телец включения, ресуспендировали в 10 мл 8 М мочевины (pH 8,1). После удаления нерас-

творившихся частиц центрифугированием солюбилизированный белок очищали на колонке с носителем Ni-NTA agarose (QIAGEN, США), элюируя его натрий-фосфатным буфером в ступенчатом градиенте pH (pH = 8,1 – 6,3 – 5,0): 100 мМ фосфата натрия, 10 мМ Tris HCl, 8 М мочевины. Искомый белок gp181M элюировали мочевиной при pH 5,0.

Затем все белки диализовали в буфере, содержащем 20 мМ Tris HCl (pH 7,5), 200 мМ NaCl, 0,5% Tween 80, 0,1 % сахарозы. Диализ проводили в течение ночи. Продукты диализа анализировали в 12 %-ном SDS-ПААГ.

**Условия взаимодействия белков с различными штаммами.** В исследовании взаимодействия белков с различными штаммами бактерии *P. aeruginosa* использовалось три штамма: PAO, 1 и 37. К 200 мкл суспензии клеток добавляли 10 мкл белка gp181E, центрифугировали в течение 6 мин при частоте вращения 11 000 об/мин. Супернатант и осадок анализировали в 12 %-м SDS-ПААГ.

**Спектроскопия кругового дихроизма.** Очень важную роль в определении вторичной структуры белков играет метод кругового дихроизма (КД). Он не требует знания общей пространственной структуры белка. Наоборот, структурное исследование белка обычно начинается с получения спектров КД. Метод КД основан на различии в поглощении право- и лево-поляризованного света в спиральях различной закрученности. Из-за этого различия в поглощении плоскополяризованный свет превращается в эллиптически-поляризованный [13]. Для белков gp181E и gp181MA на спектрополяриметре Jasco J-500 (Япония) были зарегистрированы спектры эллиптичности в ультрафиолетовой области 190 – 250 нм. Белки gp181E и gp181MA имели концентрацию 1,38 и 0,98 мг/мл соответственно.

**Определение олигомерности гель-фильтрацией.** Препарат очищенного белка gp181E наносили на колонку Superose12 HR10/30 (Pharmacia Biotech, Швеция), уравновешенную буфером, содержащим Tris-HCl (pH 8,0), и элюировали со скоростью 0,5 мл/мин. Предварительно колонку

калибровали стандартами белков. По графику зависимости логарифма молекулярной массы белка от объема элюции определяли наблюдаемую молекулярную массу белка gp181E.

#### Результаты исследования и их обсуждение

**Расчет спектра Фурье для белка gp181 бактериофага phiKZ.** Как было установлено в работе [14], в спектре Фурье для С-концевой части литического фермента gp5С (структурного лизоцима бактериофага T4) имеют место повторы с периодом  $T = 8$  а.о. (аминокислотных остатков), образующие уникальный паттерн. При исследовании данного белка с помощью рентгеноструктурного анализа эта периодичность тоже была выявлена. Кроме того, в структуре gp5 был обнаружен уникальный мотив – тримерная  $\beta$ -спираль [11]. Результаты, полученные при исследовании gp5, явились новыми и интересными для фундаментальной и прикладной наук.

Поэтому нам представлялось целесообразным изучить литический фермент gp181 (структурный лизоцим бактериофага phiKZ) с целью обнаружить в нем аналогичную периодичность, а также проанализировать его структуру для выяснения механизма его действия при инфицировании клетки бактериофагом phiKZ. В исследовании применялись как теоретические (преобразование Фурье [14]), так и экспериментальные методы, описанные выше.

На рис. 1 приведен Фурье-спектр для группы гидрофобных аминокислот белка gp181, полученный для С-концевой части полипептидной цепи длиной  $L = 1570$ .

Самым интенсивным в этом спектре оказался пик с периодом  $T = 7,7 \pm 0,4$  а.о.  $\cong 8$  а.о. Этот результат практически совпадает с периодом  $T = 8$  а.о., полученным для gp5. Но при выравнивании аминокислотной последовательности по выявленному периоду  $T = 8$  а.о. не было найдено набора аминокислот, аналогичного обнаруженному в С-концевой части gp5 бактериофага T4.

**Экспериментальные результаты по направленному делеционному мутагенезу.** Исследование белка gp181 проводилось с помощью направленного делеционного

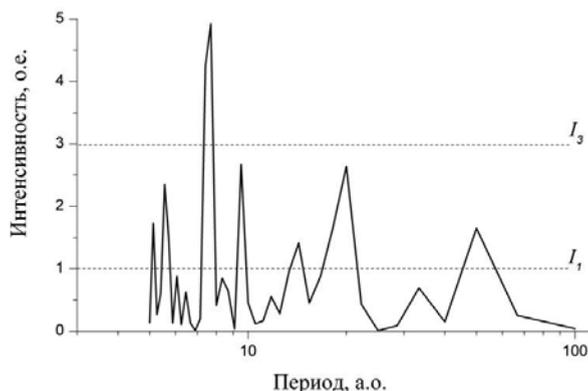


Рис. 1. Спектр Фурье для группы гидрофобных аминокислот в белковой последовательности gp181C; самый интенсивный пик отмечается при значении  $T = 7,7 \pm 0,4$  а.о.;  $I_1$ ,  $I_3$  – уровни интенсивности, вероятность случайного превышения которых составляет 16,00 и 0,13 %, соответственно

мутагенеза. Ген 181 имеет размер 6726 п.н. (пар нуклеотидов), а белок gp181, кодируемый этим геном, – соответственно, 2242 а.о.; вычисленная же молекулярная масса белка составляет 246,6 кДа.

Прежде чем приступить к исследованию gp181 с помощью делеционного мутагенеза, мы проанализировали его аминокислотную последовательность с помощью программы BLAST [15] с целью выявить консервативные домены в структуре этого белка. Используя эту программу, нам удалось предсказать, что в С-концевой части (672 – 2242 а.о.) белка gp181 находится домен пептидогликановой гидролазы или лизоцимный домен.

С учетом этих данных, а также данных об одинаковой периодичности в С-концевых частях gp181 и gp5 (т. е. с учетом имеющейся аналогии этих белков), были получены три делеционных мутанта гена 181, а именно: ген g181MA (582 п.н.), кодирующий лизоцимный домен; ген g181E (603 п.н.), кодирующий С-концевую часть белка gp181, расположенную после лизоцимного домена, а также ген g181M, который представляет собой объединение генов g181MA и g181E (рис. 2).

Нами были созданы три плазмидные конструкции с использованием вектора

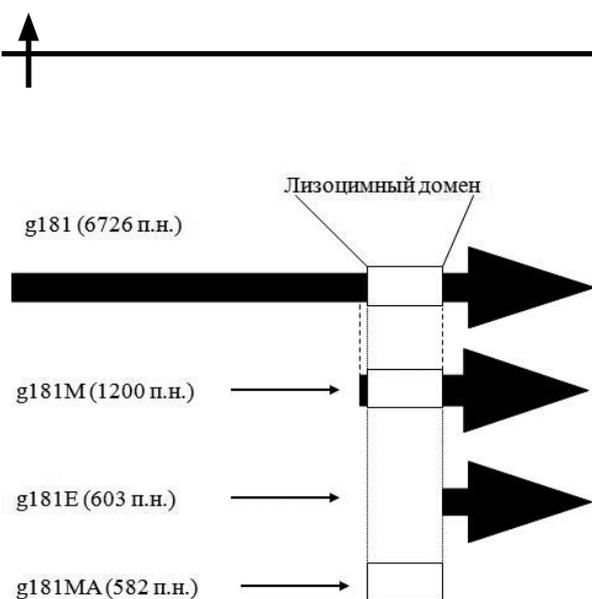


Рис. 2. Полученные делеционные мутанты гена *g181*. Стрелки указывают направление транскрипции

*pQE-30 E.coli*, содержащие гены *g181M*, *g181MA* и *g181E* бактериофага *phiKZ*, — это, соответственно, *pl\_g181M*, *pl\_g181MA* и *pl\_g181E*.

Гены были амплифицированы с помощью ПЦР, в качестве матрицы использовалась ДНК фага *phiKZ*. ПЦР-продукты были клонированы в вектор *pQE-30* по сайтам *Bam*HI и *Hind*III.

Вектор и вставка были линейаризованы с помощью рестрикции по сайтам *Bam*HI и *Hind*III, соответственно. Затем была проведена реакция лигирования.

После лигирования полученными плазмидными конструкциями трансформировали компетентные клетки *Top10* и отбирали клоны, содержащие вставку. Клонами со вставкой *g181M*, *g181MA* и *g181E* был трансформирован экспрессионный штамм *AD494(DE3) E.coli*, содержащий ген РНК-полимеразы T5.

Затем был проведен анализ рекомбинантных белков на растворимость, который показал, что при температуре 37 °C белок *gp181M* экспрессируется полностью в нерастворимой форме, белок *gp181E* частично находится в супернатанте, а белок *gp181MA* полностью растворим. При проведении экспрессии при пониженной температуре (18 °C) белок *gp181M* по-прежнему экспрессировался в нерастворимой форме, однако доля белка *gp181E*, экспрессирован-

шегося в растворимой форме, существенно повысилась.

На рис. 3 представлены картины электрофореза белков из экстракта клеток в 12 %-м SDS-ПААГ. Видно, что *gp181M* находится во фракции осадка, а *gp181E* — во фракции супернатанта.

Известно, что белки, которые экспрессируются в виде телец включения, можно перевести в растворимую форму с помощью рефолдинга. Поэтому последний был проведен для белка *gp181M*, предварительно очищенного в денатурирующих условиях с целью получения этого белка в растворимой форме. Белок *gp181M* диализовали в буфере, содержащем 20 мМ Tris HCl (pH 7,5), 200 мМ NaCl, 0,5 % Tween 80, 0,1 % сахарозы. После диализа, проведенного против использованного буфера в течение ночи, продукт рефолдинга *gp181M* оказался нерастворимым.

Белки *gp181MA* и *gp181E* диализовали для того, чтобы избавиться от избытка имидазола в буфере. Поскольку диализ белков *gp181MA* и *gp181E* прошел успешно, было проведено их концентрирование с помощью концентратора *Centricon10* (фирма *Amicon*, США). Для этого белковые растворы были четыре раза центрифугированы на

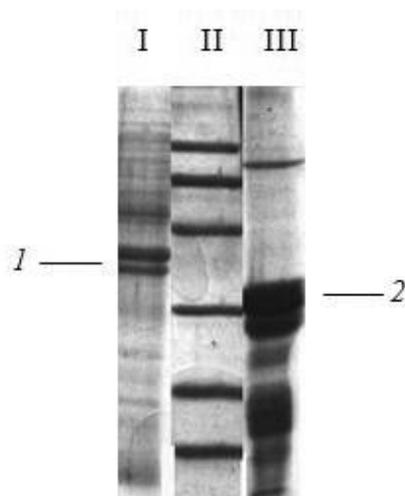


Рис. 3. Картина электрофореза при экспрессии белков:  
 1 — *gp181M*, 2 — *gp181E*. Номерам дорожек (обозначены римскими цифрами) соответствуют:  
 I — осадок белка 1, II — белковый маркер,  
 III — супернатант белка 2

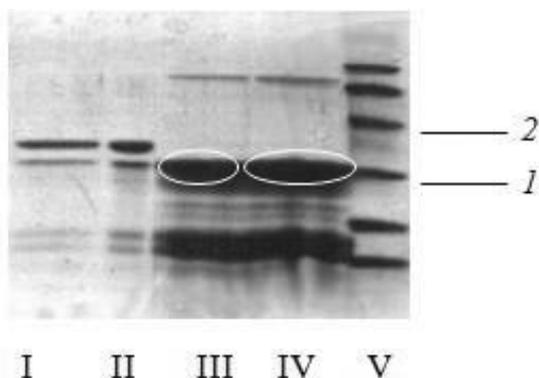


Рис. 4. Картина электрофореза при концентрировании двух белков: I, II – для белка gp181MA до (I) и после (II) концентрирования; III, IV – то же для белка gp181E; V – белковый маркер: значения 30 кДа (1) и 43 кДа (2).

Белыми овалами разделены две разные области, соответствующие белку gp181E до и после концентрирования

частоте 3000 об/мин (каждый раз в течение 15 мин). При этом белки сконцентрировались в 2,5 раза.

На рис. 4 представлена картина электрофореза белков в 12%-м SDS-ПААГ до и после концентрации. Белки gp181E и

gp181MA имели расчетный молекулярный вес 21,3 и 21,4 кДа, соответственно. Но из рисунка видно, что их подвижность в SDS-ПААГ соответствует молекулярному весу около 30 кДа. Это можно объяснить устойчивостью этих белков к SDS и тем, что они не являются мономерами.

После концентрирования также был проведен анализ взаимодействия белков с различными штаммами бактерии *P.aeruginosa*. Белок gp181MA, являясь цитолитическим ферментом, а именно пептидогликановой гидролазой, лизирует клетки. Белок gp181E взаимодействует со всеми тремя штаммами бактерии, но не лизирует их. На рис. 5 представлена картина электрофореза в 12 %-м SDS-ПААГ. Белок gp181E находится во фракции осадка при взаимодействии со штаммом PAO *P.aeruginosa*. В качестве контроля использовали бактерию *E.coli*; при ее добавлении к gp181E взаимодействия не наблюдается: на рис. 5 белок gp181E находится полностью во фракции супернатанта.

Как отмечалось выше, во введении, перед началом экспериментальных исследований белка gp181 предполагалось, что его С-концевая часть (gp181E) может играть

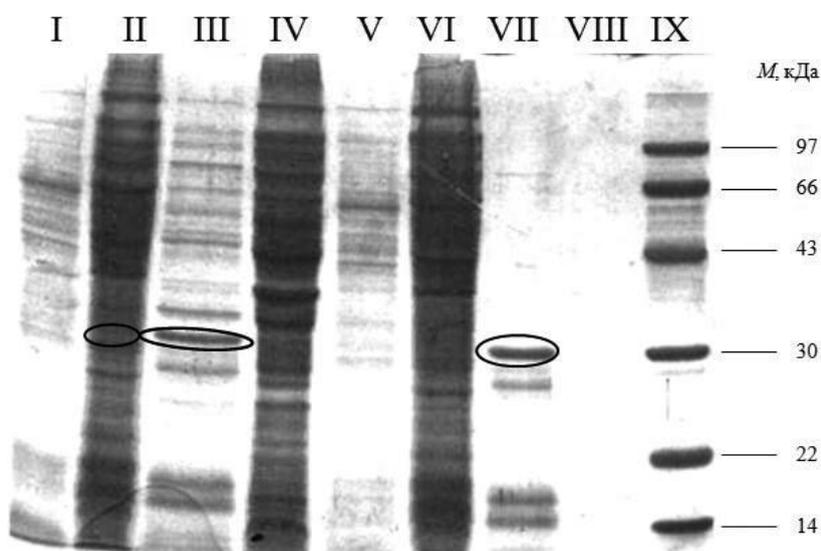


Рис. 5. Картина электрофореза при взаимодействии белка gp181E со штаммом PAO бактерии *P.aeruginosa*: VII, VIII – супернатант (gp181E) и его осадок; V, VI – супернатант PAO и его осадок; I, II – супернатант (gp181E + PAO) и его осадок; III, IV – супернатант (gp181E + *E.coli*) и его осадок; IX – белковый маркер.

Справа дана шкала молекулярных весов *M*. Черными овалами отмечены данные о взаимодействии белка gp181E со штаммом PAO и бактерией *E.coli*

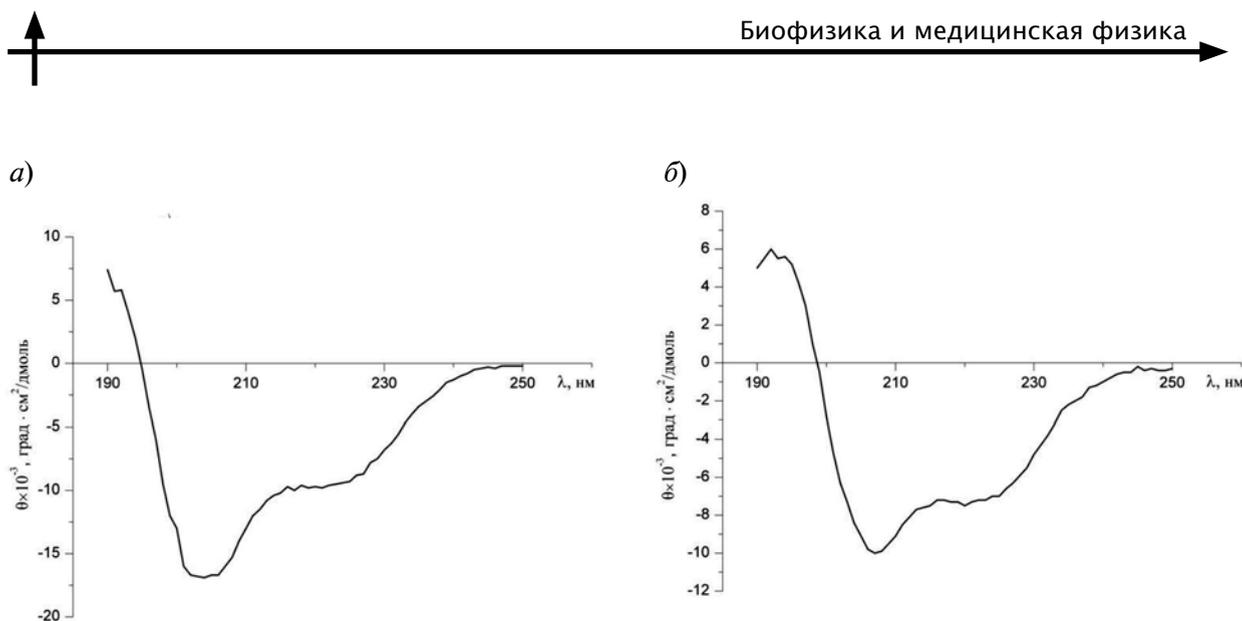


Рис. 6. Спектры кругового дихроизма белков gp181E (а) и gp181MA (б) (представленные спектры – это зависимости эллиптичности света от его длины волны)

роль сенсорной «молекулярной иглы». Это предположение согласуется с наблюдавшимся взаимодействием gp181E с клетками *P.aeruginosa*.

Однако вторичная структура С-концевого домена не является родственной β-спирали белка gp5 бактериофага Т4, а представляет собой, вероятно, свернутую α-спираль (coiled coil), что было установлено при анализе приведенных здесь КД-спектров. Указанное отличие вторичных структур этих белков может определять различие механизмов их взаимодействия с клетками. Можно предположить, что gp181 представляет собой не функциональный гомолог gp5 бактериофага Т4, а довольно распространенный альтернативный случай, когда структурный литический фермент является продолжением «белка-рулетки», который определяет длину хвоста вируса. Однако механизм взаимодействия gp181 с клетками до конца еще не исследован.

Необходимо отметить, что недавно в работах [16, 17] был приведен вывод о роли С-концевого домена gp181 как сенсорной «молекулярной иглы», аналогичный тому, что был сделан ранее на основании описанных здесь исследований. В статьях [16, 17] приводятся данные о том, что указанный вывод о роли gp181 подтвержден в других исследованиях методами масс-спектрометрии [18] и криоэлектронной микроскопии [19].

Для белков gp181E и gp181MA были получены спектры кругового дихроизма. Они представлены на рис. 6. Для оценки вкладов вторичных структур (α-спиралей, β-структур и неупорядоченных структур) нами было использовано программное обеспечение CDPro (Colorado State University, Fort Collins, CO), алгоритм CONTINLL с набором базисных белков IBasis7 [SDP48] (λ = 240 – 190 нм). Результаты приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Контрольные наборы белков SDP48 при расчетах по программе CONTINLL

Белок	Доля элемента структуры в белке; СКО							
	$H(r)$	$H(d)$	$S(r)$	$S(d)$	Turn	Unrd	СКО	Норма СКО
gp181E	0,375	0,340	0,002	0,000	0,077	0,207	0,414	0,041
gp181M	0,390	0,289	0,000	0,001	0,098	0,222	0,186	0,030

Обозначения:  $H(r)$ ,  $H(d)$  – регулярные и нерегулярные α-спирали;  $S(r)$ ,  $S(d)$  – регулярные и нерегулярные β-структуры; Turn – изгибы, Unrd – неупорядоченные структуры; СКО – среднеквадратичное отклонение.

Таблица 2

Результаты расчетов структуры белков gp181E и gp181M, полученные из КД-спектров

Величина	Значение	
	gp181E	gp181M
Количество сегментов спиралей (на 100 остатков)	8,493	7,223
Количество тяжей (на 100 остатков)	0,000	0,047
Средняя длина спиралей, а.о.	8,419	9,402
Средняя длина тяжей, а.о.	0,000	2,000
Доля $\alpha$ -спиралей, %	71,5	68,0
Средняя длина $\alpha$ -спиралей, а.о.	Около 8	

Обработка спектров показала, что вторичная структура исследованных белков состоит в основном из  $\alpha$ -спиралей (gp181E – на 71,5 %, gp181MA – на 68 %) длиной около 8 а.о. Это обстоятельство указывает на их существенное сходство с многими внутриклеточными белками, например тропомиозином, миозином, кератином, фибриногеном, трансмембранным белком оболочечных вирусов и с некоторыми глобулярными белками.

Наше предположение о том, что вторичная структура C-концевого домена белка gp181 может представлять собой свернутую  $\alpha$ -спираль (coiled coil), сделанное нами после анализа КД-спектров, также высказывалось в работах [17, 20]. Однако процентное содержание  $\alpha$ -спиралей в этих работах не было указано.

**Заключение**

Таким образом, в результате комплексного исследования продукта гена 181 бактериофага phiKZ и его делеционных мутантов получены следующие результаты.

Установлено наличие периодичности в белке gp181 бактериофага phiKZ с тем же периодом  $T = 8$  а.о., который был обнаружен авторами работы [14] в белке gp5 бактериофага T4.

Созданы плазмидные векторы для экспрессии трех делеционных мутантов гена 181 в клетках кишечной палочки *E. coli*.

Выделены и очищены три полученных рекомбинантных белка.

Экспериментально установлены свойства растворимости белков: белок gp181M экспрессируется в нерастворимой форме –

в виде телец включения (перевести его в растворимую форму не удалось), а белок gp181MA полностью растворим. Белок gp181E экспрессируется при пониженной температуре и становится растворимым в присутствии детергента и сахара; солиubilization в присутствии детергента и сахара косвенно свидетельствует об аффинности этого белка к полисахаридным (LPS) рецепторам клеточной стенки бактерии.

Экспериментально установлены другие физические свойства белков, например, белок gp181E является гидрофобным и взаимодействует с различными штаммами клеточек *Pseudomonas aeruginosa*, но не лизирует их, в отличие от gp181MA.

Получена информация о степени полимеризации белка gp181E: он не является мономером, а представляет собой димер или тример (это установлено с помощью гель-фильтрации).

Установлено, что вторичная структура белков gp181E и gp181MA состоит в основном из  $\alpha$ -спиралей (результат анализа КД-спектров), что указывает на их существенное сходство с многими внутриклеточными белками, например тропомиозином, миозином, кератином, фибриногеном, трансмембранным белком оболочечных вирусов и с некоторыми глобулярными белками.

Получено дополнительное экспериментальное подтверждение выдвинутой нами гипотезы относительно того, что C-концевой домен белка gp181 может играть роль сенсорной «молекулярной иглы» в процессе инфицирования клетки бактериофагом phiKZ. Предположение вы-



двинуто с учетом установленной периодичности аминокислотной последовательности этого домена ( $T = 8$  а.о.).

Итак, предположение о том, что С-концевая часть белка gp181 может уча-

ствовать в процессе инфицирования бактериофагом phiKZ клетки как сенсорная молекулярная игла для протыкания клеточной стенки бактерии, нашло экспериментальное подтверждение в описанном здесь исследовании.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тяглов Б.В., Крылов В.Н., Плотникова Т.Г., Минаев И.Е., Пермогоров В.И. Некоторые физико-химические свойства бактериофага phiKZ // Молекулярная биология. 1980. Т. 14. № 5. С. 1019–1022.
2. Mesyanzhinov V.V., Robben J., Grymonprez B., Kostyuchenko V.A., Bourkaltseva M.V., Sykilinda N.N., Krylov V.N., Volckaert G. The genome of bacteriophage phiKZ of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Mol. Biol. 2002. Vol. 317. No. 1, pp. 1-19.
3. Fokine A., Kostyuchenko V.A., Efimov A.V., Kurochkina L.P., Sykilinda N.N., Robben J., Volckaert G., Hoenger A., Chipman P.R., Battisti A.J., Rossmann M.G., Mesyanzhinov V.V. A three-dimensional cryo-electron microscopy structure of the bacteriophage phiKZ head // J. Mol. Biol. 2005. Vol. 352. No. 1, pp. 117-124.
4. Крылов В.Н., Смирнова Т.А., Ребентиш Б.А., Миненкова И.Б. Структура частиц бактериофага phiKZ // Вопросы вирусологии. 1978. № 5. С. 568–571.
5. Giamarellou H. Therapeutic guidelines for *Pseudomonas aeruginosa* infections // Int. J. Antimicrob. Agents. 2000. Vol. 16. No. 2, pp. 103-106.
6. 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. Vol. 98. No. 7, pp. 4107-4112.
7. Loeffler J.M., Nelson D., Fischetti V.A. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with bacteriophage cell wall hydrolase // Science. 2001. Vol. 294. Iss. 5549, pp. 2170-2172.
8. Loeffler J.M., Fischetti V.A. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains // Antimicrob. Agents Chemoter. 2003. Vol. 47. No. 1, pp. 375-377.
9. Jado I., Lopez R., Garcia E., Fenoll A., Casal J., Garcia P. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in murine sepsis model // J. Antimicrob. Chemoter. 2003. Vol. 52. No. 6, pp. 967-973.
10. Schuch R., Nelson D., Fischetti V.A. Bacteriolytic agent that detects and kill *Bacillus anthracis* // Nature. 2002. Vol. 418. No. 6900, pp. 884-889.
11. Kanamaru S., Leiman P.G., Kostyuchenko V.A., Chipman P.R., Mesyanzhinov V.V., Arisaka F., Rossmann M.G. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4 // Nature. 2002. Vol. 415. Iss. 6871, pp. 553-557.
12. Studier F.W., Moffatt B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // J. Mol. Biol. 1986. Vol. 189. No. 1, pp. 113-130.
13. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка. Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями; 2-е изд., испр. и доп. М.: Книжный дом «Университет», 2002. 376 с.
14. Симакова М.Н., Симаков Н.Н. Исследование периодичности расположения аминокислот в фибриллярных белках бактериофага T4 // Молекулярная биология. 2005. Т. 39. № 2. С. 321–329.
15. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. 1997. Vol. 25. No. 17, pp. 3389-3402.
16. Fokine A., Miroshnikov K.A., Shneider M.M., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. Structure of the bacteriophage phiKZ lytic transglycosylase gp144 // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. No. 11, pp. 7242-50.
17. Briers Y., Miroshnikov K., Chertkov O., Nekrasov A., Mesyanzhinov V., Volckaert G., Lavigne R. The structural peptidoglycan hydrolase gp181 of bacteriophage phiKZ // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. Vol. 374. No. 4, pp. 747-51.
18. Briers Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagert S., Michiels C.W., Hertveldt K., Lavigne R. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL // Mol. Microbiol. 2007. Vol. 65. No. 5, pp. 1334-1344.
19. Fokine A., Battisti A.J., Bowman V.D., Efimov A.V., Kurochkina L.P., Chipman P.R., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. Cryo-EM study of the *Pseudomonas* bacteriophage phiKZ // Structure. 2007. Vol. 15. No. 9, pp. 1099-1104.
20. Tang L., Marion W.R., Cingolani G., Prevelige P.E. Jr., Johnson J.E. Three-dimensional structure of the bacteriophage P22 tail machine // EMBO J. 2005. Vol. 24. No. 12, pp. 2087-2095.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**МИРОШНИКОВ Константин Анатольевич** — доктор химических наук, старший научный сотрудник, и.о. руководителя лаборатории молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

117997, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
kmi@bk.ru

**СИМАКОВА Мария Николаевна** — преподаватель кафедры физики Военно-космической академии имени А.Ф. Можайского Министерства обороны РФ (филиал, г. Ярославль).

150001, Россия, г. Ярославль, Московский пр., 28  
m\_simakova@mail.ru

### *Miroshnikov K.A., Simakova M.N. THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF gp181 LYTIC ENZYME OF phiKZ BACTERIOPHAGE.*

In this paper the gp181 peptidoglycan hydrolase (structural lysin) of phiKZ bacteriophage *Pseudomonas aeruginosa* has been investigated. The study of gp181 was performed using directed deletion mutagenesis. The assumption that the C-terminal part of gp181 may be involved in the infection process as the sensory molecular needle-like cell-puncturing device of phiKZ was experimentally confirmed.

STRUCTURAL LYSIN, BACTERIOPHAGE, PSEUDOMONAS AERUGINOSA, gp181 LYTIC ENZYME, DELETION MUTAGENESIS.

### REFERENCES

1. Tyaglov B.V., Krylov V.N., Plotnikova T.G., Minaev I.E., Permogorov V.I. Nekotorye fiziko-khimicheskie svoystva bakteriofaga phiKZ [Some physical and chemical properties of bacteriophage phiKZ]. *Molecular Biology*, 1980, Vol. 14, No. 5, pp. 1019-1022. (rus)
2. Mesyanzhinov V.V., Robben J., Grymonprez B., Kostyuchenko V.A., Bourkaltseva M.V., Sykilinda N.N., Krylov V.N., Volckaert G. The genome of bacteriophage phiKZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.*, 2002, Vol. 317, No. 1, pp. 1-19.
3. Fokine A., Kostyuchenko V.A., Efimov A.V., Kurochkina L.P., Sykilinda N.N., Robben J., Volckaert G., Hoenger A., Chipman P.R., Battisti A.J., Rossmann M.G., Mesyanzhinov V.V. A three-dimensional cryo-electron microscopy structure of the bacteriophage phiKZ head. *J. Mol. Biol.*, 2005, Vol. 352, No. 1, pp. 117-124.
4. Krylov V.N., Smirnova T.A., Rebentish B.A., Minenkova I.B. Struktura chastits bakteriofaga phiKZ [The structure of particles of bacteriophage phiKZ]. *Problems of Virusology*, 1978, No. 5, pp. 568-571. (rus)
5. Giamarellou H. Therapeutic guidelines for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000, Vol. 16, No. 2, pp. 103-106.
6. Nelson D., Loomis L., Fishetti 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, Vol. 98, No. 7, pp. 4107-4112.
7. Loeffler J.M., Nelson D., Fischetti V.A. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*, 2001, Vol. 294, Iss. 5549, pp. 2170-2172.
8. Loeffler J.M., Fischetti V.A. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 2003, Vol. 47, No. 1, pp. 375-377.
9. Jado I., Lopez R., Garcia E., Fenoll A., Casal J., Garcia P. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in murine sepsis model. *J. Antimicrob. Chemoter*, 2003, Vol. 52, No. 6, pp. 967-973.
10. Schuch R., Nelson D., Fischetti V.A. Bacteriolytic agent that detects and kill *Bacillus anthracis*. *Nature*, 2002, Vol. 418, Iss. 6900, pp. 884-889.
11. Kanamaru S., Leiman P.G., Kostyuchenko V.A., Chipman P.R., Mesyanzhinov V.V., Arisaka F., Rossmann M.G. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T 4. *Nature*, 2002, Vol. 415, Iss. 6871, pp. 553-57.
12. Studier F.W., Moffatt B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, 1986, Vol. 189, No. 1, pp. 113-130.
13. Finkel'shteyn A.V., Ptitsyn O.B. *Fizika*

*belka. Kurs lektiy s tsvetnymi i stereoskopicheskimi illyustratsiyami* [Protein physics: a course of lectures with colour and stereoscopic illustrations]. 2<sup>nd</sup> edition. Moscow, Knizhnyy dom Universitet, 2002, 376 p. (rus)

14. **Simakova M.N., Simakov N.N.** Issledovanie periodichnosti raspolozheniya aminokislot v fibrillyarnykh belkakh bakteriofaga T4 [Investigation of periodic distributions of amino acids in the sequences of fiber proteins of bacteriophage T4]. *Molecular Biology*, 2005, Vol. 39, No. 2, pp. 321-329. (rus)

15. **Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database searchprograms. *Nucleic Acids Res.*, 1997, Vol. 25, No. 17, pp. 3389-3402.

16. **Fokine A., Miroshnikov K.A., Shneider M.M., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G.** Structure of the bacteriophage phiKZ lytic transglycosylase gp144. *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, No. 11, pp. 7242-50.

17. **Briers Y., Miroshnikov K., Chertkov O., Nekrasov A., Mesyanzhinov V.V., Volckaert G., Lavigne R.** The structural peptidoglycan hydrolase gp181 of bacteriophage phiKZ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, Vol. 374, No. 4, pp. 747-51.

18. **Briers Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagaert S., Michiels C.W., Hertveldt K., Lavigne R.** Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL. *Mol. Microbiol.*, 2007, Vol. 65, No. 5, pp. 1334-1344.

19. **Fokine A., Battisti A.J., Bowman V.D., Efimov A.V., Kurochkina L.P., Chipman P.R., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G.** Cryo-EM study of the *Pseudomonas* bacteriophage phiKZ. *Structure*, 2007, Vol. 15, No. 9, pp. 1099-1104.

20. **Tang L., Marion W.R., Cingolani G., Prevelige P.E. Jr., Johnson J.E.** Three-dimensional structure of the bacteriophage P22 tail machine. *EMBO J.*, 2005, Vol. 24, No. 12, pp. 2087-2095.

#### THE AUTHORS

##### **MIROSHNIKOV Konstantin A.**

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences.*

16/10 Miklukho-Maklaya St., Moscow, 117997, Russian Federation

kmi@bk.ru

##### **SIMAKOVA Maria N.**

*A.F. Mozhaiskiy Military Space Academy of Ministry of Defense of the Russian Federation (the Yaroslavl branch).*

28 Moskovskiy prospect, Yaroslavl, 150001, Russian Federation

m\_simakova@mail.ru